



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras distribuir, combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial y, a pesar que son nuevas obras deben siempre rendir crédito y ser no comerciales, no están obligadas a licenciar sus obras derivadas bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUIS GONZAGA
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



CONSTANCIA

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de **Informe final de tesis** es:

Efectividad nematocida In Vitro del alga marina *Lessonia nigrescens* sobre el nemátodo *Meloidogyne spp.* en plantas de *Solanum lycopersicum* en el distrito de Ica.

Presentado por:

OCHOA LIZARZABURO, ARIANA DEL CARMEN

De la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es 1% por el cual se otorga el calificativo de:

APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.

Ica, 25 de Junio de 2024

.....
Dra. JOSEFA BERTHA PARI OLARTE
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Efectividad nematicida In Vitro del alga marina *Lessonia nigrescens*
sobre el nemátodo *Meloidogyne spp.* en plantas de *Solanum*
lycopersicum en el distrito de Ica.

Línea de investigación
Salud Pública y Conservación del Medio Ambiente

INFORME FINAL DE TESIS

Bach. Ariana Del Carmen Ochoa Lizarzaburo

Ica, Perú

2024

DEDICATORIA

Los tiempos de Dios son perfectos. Dios me ha guiado y me ha dado la fortaleza para seguir adelante.

A mis padres, por su apoyo incondicional y haberme formado con buenos valores, hábitos y convicciones lo cual me ha ayudado a seguir adelante en los momentos difíciles.

A mi hermana y mi ángel, quienes son mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ella.

AGRADECIMIENTO

Mis cordiales y profundos agradecimiento a la Asociación Científica de Investigación Farmacéutica (ACIF), Dra. Haydee Chávez Orellana fundadora de este prestigioso semillero, Dr. Felipe Surco Laos y el Ing. Ricardo Espino Caballero; a cada uno de los docentes que han sido parte de toda mi vida universitaria compartiendo sus conocimientos profesionales y de vida.

Asimismo, mi enorme agradecimiento a cada hermano egresado acifano y a mis compañeros de promoción por el apoyo incondicional brindado en este camino de formación universitaria.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	8
ABSTRACT	9
I. INTRODUCCIÓN	10
1.1. Descripción de la Realidad Problemática	10
1.2. Formulación del problema	10
1.3. Justificación e importancia del problema	10
1.4. Objetivos	11
1.5. Hipótesis y variables de la investigación	12
1.6. Marco teórico	12
1.6.1. Antecedentes de la investigación	12
1.6.2. <i>Lessonia nigrescens</i>	16
1.6.3. <i>Meloidogyne</i> spp	19
1.6.4. Extractos vegetales	19
1.6.5. Cromatografía de capa fina	21
II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA	22
2.1. Tipo y diseño de la investigación	22
2.2. Lugar de la investigación	22
2.3. Materiales y métodos	22
2.4. Población	24
2.5. Muestra	24
2.6. Metodología	24
2.6.1. Recolección y preparación de las muestras	24
2.6.2. Identificación de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> (arcanto)	25
2.6.3. Ensayos in vitro	28
2.6.4. Prueba de Bioensayo en las plantas de tomate	29
III. RESULTADOS	35
IV. DISCUSIÓN	51
V. CONCLUSIONES	53
VI. RECOMENDACIONES	54
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
VIII. ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación Taxonómica	17
Tabla 2. Tratamientos usados para el control del nemátodo <i>Meloidogyne spp</i> en plantas de tomate.	31
Tabla 3. Porcentajes de mortandad de <i>Meloidogyne spp</i> producida por el extracto etanólico de las hojas de <i>Lessonia nigrescens</i> a diferentes concentraciones.	44
Tabla 4. Concentración Letal Media del extracto etanólico de las hojas de <i>Lessonia nigrescens</i> en el ensayo in vitro.	44
Tabla 5. Efectos biométricos sobre plantas de tomate de los extractos etanólicos de las hojas y talos de <i>Lessonia nigrescens</i> a diferentes concentraciones, tratamiento químico, orgánico, inoculado en comparación con el testigo control.	46
Tabla 6. Concentración Letal Media del extracto etanólico de las hojas de <i>Lessonia nigrescens</i> en el bionsayo en plantas de tomate.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Lessonia nigrescens</i> .	16
Figura 2. Distribución geográfica del género <i>Lessonia</i> .	18
Figura 3. Identificación de flavonoides en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	36
Figura 4. Identificación de Aminoácidos en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	36
Figura 5. Identificación de Grupos fenólicos libres en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	37
Figura 6. Identificación de taninos en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	38
Figura 7. Identificación de triterpenos y/o esteroides en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	38
Figura 8. Identificación de alcaloides en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	39
Figura 9. Identificación de leucoantocianidinas y catequinas en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	40
Figura 10. Identificación de antraquinonas en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	40
Figura 11. Identificación de cardenólicos en los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	41
Figura 12. Identificación de saponinas en las muestras de <i>Lessonia nigrescens</i> .	42
Figura 13. Identificación de principales familias de metabolitos secundarios en los extractos de <i>Lessonia nigrescens</i> .	42
Figura 14. Porcentajes de mortandad in vitro de <i>Meloidogyne spp</i> por el efecto nematicida de los extractos de <i>Lessonia nigrescens</i> (hojas y talos).	43
Figura 15. Porcentajes de mortandad de <i>Meloidogyne spp</i> producida por el extracto etanólico de las hojas de <i>Lessonia nigrescens</i> a diferentes concentraciones.	45
Figura 16. Porcentaje de mortandad del bioensayo en plantas de tomate de <i>Meloidogyne spp</i> producida por los extractos etanólicos de hojas y talos del alga <i>Lessonia nigrescens</i> a diferentes concentraciones.	47
Figura 17. Número de individuos J2 de <i>Meloidogyne spp</i> / 100 cc de suelo en las 3 evaluaciones del tratamiento con mayor efectividad nematicida en comparación con el testigo químico, orgánico e inoculado.	47
Figura 18. Resultados del peso de las raíces de tomate (g) que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico.	48
Figura 19. Resultados de la longitud de las raíces de tomate que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de <i>Lessonia nigrescens</i> (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico.	49

- Figura 20.** Resultados del peso del follaje fresco de tomates que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico. 49
- Figura 21.** Resultados de la longitud del follaje fresco de tomates que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico. 50

RESUMEN

En la actualidad, para llevar un control en las plagas existentes en los cultivos, se utilizan métodos químicos, siendo esto muy perjudicial para el ecosistema y la salud de la población. El principal responsable de afectar estos cultivos es el nematodo *Meloidogyne spp*, encontrándose distribuido en todos los campos de la región. El objetivo de nuestra investigación fue evaluar el efecto nematicida in vitro del alga marina *Lessonia nigrescens* sobre el nematodo *Meloidogyne spp* en plantas de tomate, siendo estas muy susceptibles a su infestación, ya que en estudios previos se ha demostrado que las algas marinas ofrecen un potencial sostenible para disminuir el uso de pesticidas químicos, por ser estas un recurso abundante en nuestra región.

Como resultado del presente trabajo se ha demostrado el efecto nematicida del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* (a concentraciones de 1, 10, 50, 100%), siendo las hojas las de mayor efecto a la concentración del 50%, no habiendo diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) con las concentraciones más elevadas.

En el ensayo realizado en las plántulas de tomate, el extracto a la misma concentración ocasionó mayor efecto mortal para *Meloidogyne spp* y mayor efecto biofertilizante para los estos cultivos.

Como conclusión podemos indicar que el alga *Lessonia nigrescens* es una muy buena alternativa para el control del nematodo *Meloidogyne spp*, determinándose su efectividad in vitro.

Palabras claves: Alga, *Lessonia nigrescens*, *Meloidogyne spp*, nematicida, extracto etanólico.

ABSTRACT

Currently, to control pests in crops, chemical methods are used, which is very harmful to the ecosystem and the health of the population. The main person responsible for affecting these crops is the nematode *Meloidogyne spp*, which is distributed in all fields in the region. The objective of our research was to evaluate the in vitro nematicidal effect of the seaweed *Lessonia nigrescens* on the nematode *Meloidogyne spp* in tomato plants, these being very susceptible to its infestation, since previous studies have shown that seaweeds offer a potential sustainable to reduce the use of chemical pesticides, as these are an abundant resource in our region.

As a result of this work, the nematicidal effect of the ethanolic extract of *Lessonia nigrescens* has been demonstrated (at concentrations of 1, 10, 50, 100%), with the leaves having the greatest effect at a concentration of 50%, with no statistically significant differences. ($P>0.05$) with the highest concentrations.

In the test carried out on tomato seedlings, the extract at the same concentration caused a greater lethal effect for *Meloidogyne spp* and a greater biofertilizing effect for these crops.

In conclusion we can indicate that the algae *Lessonia nigrescens* is a very good alternative for the control of the nematode *Meloidogyne spp*, determining its effectiveness in vitro.

Keywords: Seaweed, *Lessonia nigrescens*, *Meloidogyne spp*, nematicide, ethanolic extract.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción de la Realidad Problemática

La región de Ica ha sido impulsada por numerosos sectores económicos, uno de los más importantes, y con un notable crecimiento año a año, es la agroexportación.

Esta actividad ha significado una importante fuente de empleo para los ciudadanos tratando de sumarse a una de las grandes soluciones para disminuir la pobreza en el Perú.

Ica cuenta con 254 mil hectáreas de tierras con aptitud agrícola, pero sola una fracción de éstas son destinadas a los productos de la agroexportación. Destacan muchos cultivos de exportación entre ellas es la uva, cultivo que representa significativamente a esta región con más de 17 mil hectáreas cosechadas en el 2020, así como también cultivos de espárragos, algodón, maíz, palta, cebolla y tomate¹, sobre todo éste último se ha visto afectado enormemente por el nematodo *Meloidogyne*, debido a que éste género se encuentra distribuido en todos los campos agrícolas de la región y del mundo causando numerosos daños y pérdidas en los cultivos.

Este nematodo fitoparásito puede generar deformaciones en las raíces (nódulos) variando su tamaño dependiendo del hospedero, también ocasiona lesiones necróticas, rajadura en órganos subterráneos, entre otros².

1.2. Formulación del problema

Frente a todo lo mencionado, el planteamiento del problema para la presente investigación respondió a la pregunta: ¿Tendrá el extracto etanólico del alga *Lessonia nigrescens* efecto nematocida in vitro sobre *Meloidogyne spp* en plantas de *Solanum lycopersicum*?

1.3. Justificación e importancia del problema

A lo largo de los años se ha cuestionado el control que han tenido los nematodos fitopatógenos con agentes biocidas químicos en las plantaciones del cultivo debido principalmente a estas razones: su alto costo y los efectos adversos por su toxicidad que genera en el ecosistema y en los productos que se obtiene de ellos para el consumo humano³.

En diversas investigaciones se han obtenido información sobre sustancias en distintas plantas que presentan efecto nematocida o nematostático identificadas como: alcaloides, que produce un bloqueo de la trasducción de la señal neuronal de insectos y vertebrados; los terpenoides, que forman una masa

semicristalina que sella la herida y atrapa al microorganismo patógeno y a los fenilpropanoides, que en su forma insoluble refuerza la pared celular de las plantas en respuesta de un ataque.

Una de las principales propiedades de los metabolitos secundarios presentes en las plantas es su defensa frente a los predadores lo que les permite resistir a la agresión de cualquier plaga⁴.

Debido al conocimiento de antemano sobre el control de plagas a nivel mundial con los extractos de algas por la presencia de los siguientes compuestos: ácidos algínicos, kaínicos, terpenos, isotiocianatos, alcaloides, etc., se justifica el estudio ya que a nivel local se tiene poca información y uso, teniendo un valor agregado de ser utilizado como biofertilizante y contribuirá a una agricultura más orgánica⁵.

Importancia

El desarrollo de la presente investigación permitirá adquirir conocimientos básicos sobre el efecto nematocida de la especie *Lessonia nigrescens*, ya que todo ello supone un esfuerzo por despertar un interés por parte de la industria agrícola, para el uso de pesticidas naturales; así como en industrias agroexportadoras, debido a que cada vez existe una mayor demanda de alimentos de origen orgánico libres de pesticidas químicos, permitiendo a las empresas tener menor costo en los tratamientos de sus cultivos y mayor ingreso impulsando la economía del sector.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Determinar el efecto nematocida in vitro del alga marina *Lessonia nigrescens* en plantas de *Solanum lycopersicum*

1.4.2. Objetivos Específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico del alga *Lessonia nigrescens* mediante un screening fitoquímico.
- Evaluar la actividad nematocida in vitro del extracto del alga marina y extractos vegetales a diferentes concentraciones sobre *Meloidogyne spp.*

1.5. Hipótesis y variables de la investigación

1.5.1. Hipótesis

El extracto etanólico del alga marina *Lessonia nigrescens* posee efecto nematicida o nematostático sobre *Meloidogyne spp.*

1.5.2. Variables:

1.5.2.1. Variables dependientes

- Eficacia nematicida
- Metabolitos secundarios
- Indicadores de variables dependientes
- Juveniles 2 y huevos de *Meloidogyne spp.*

1.5.2.2. Variables independientes

- Extractos etanólico del alga *Lessonia nigrescens*.
- Indicadores de variables independientes.
- Metabolitos secundarios del alga *Lessonia nigrescens*.

1.6. Marco teórico

1.6.1. Antecedentes de la investigación

Internacional:

- Dina SS Ibrahim, et al. En el 2021, realizó una investigación titulada “Propiedades nematicidas de extractos metanólicos de dos algas marinas contra el nematodo agallador de la raíz del tomate, *Meloidogyne incognita*”, en donde evaluaron dos algas para el control de la infección en plantas de tomate: el alga roja *Phacelocarpus tristichus* J. Agardh y el alga parda *Turbinaria ornata* J. Agardh en 3 concentraciones (0.5; 1.0 y 2%). Teniendo como resultado que los extractos metanólicos de las dos especies mejoraron los parámetros de crecimiento de las plantas infectadas y no infectadas, asimismo, manifestaron actividades nematicidas contra *M. incognita*. Sin embargo, *Turbinaria ornata* superó a *Phacelocarpus tristichus*, recomendándose como biofertilizantes en el manejo integrado del *M. incognita*⁶.

- Ping Zou et al. En el 2019 realizaron este estudio titulado “Polisacáridos derivados del alga parda *Lessonia nigrescens* mejoran la tolerancia al estrés abiótico de las plántulas de trigo al mejorar el sistema antioxidante y modulación de la concentración de iones intracelulares”, concluyendo que los polisacáridos del alga parda *Lessonia nigrescens* (LNP) mejoraron el crecimiento de los cultivos y la resistencia de las plantas al estrés abiótico. Obtuvieron y caracterizaron dos polisacáridos ácidos a partir del extracto crudo de LNP. Demostrando que esta promueve el crecimiento de las plantas, disminuye la peroxidación lipídica de la membrana, aumentando el contenido de clorofila, mejorando las actividades antioxidantes, coordinando la salida y la compartimentación de iones intracelulares. Estos polisacáridos inducen la resistencia de las plantas al estrés salino⁷.

- El-Eslamboly et al. En el 2019 realizaron un estudio titulado “Aplicación de algas como método de control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* en pepino en condiciones de cultivo protegidas y su impacto en el rendimiento y la calidad de la fruta”, con la finalidad de controlar el nematodo agallador *Meloidogyne incognita* en pepino, probaron varios tratamientos con las algas *Spirulina* y *Amphora*, después de 15 días desde el trasplante, aplicaron nuevamente los tratamientos 2 veces al mes durante 3 meses.
 Como resultado, el suelo tratado con los extractos de *Amphora* o *Spirulina* tuvo incrementos significativos en el crecimiento vegetativo y la calidad del fruto. Sin embargo, el tratamiento con *Amphora* fue más efectivo en el control de nematodos o en potenciar resistencia de las plantas a los nematodos.
 Concluyendo la efectividad, de las algas para el control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne spp*⁸.

- Chao Zhao et al. En el 2017 realizaron el estudio titulado “Eficacia regulatoria del extracto de alga parda *Lessonia nigrescens* en el perfil de expresión genética y la microflora intestinal en ratones diabéticos tipo 2”, investigaron la actividad antidiabética del extracto etanólico (LNE) de *Lessonia nigrescens* en ratones diabéticos tipo 2, demostraron que los niveles de glucosa en sangre en ayunas disminuyeron significativamente después de la administración de LNE, indicando que podría proteger la arquitectura celular del hígado y el riñón. El tratamiento con LNE aumenta significativamente las poblaciones de Bacteroidetes y disminuye las

Firmicutes en la microflora intestinal. Considerando a LNE como un alimento funcional para reducir la glucosa en sangre y regular la microflora intestinal⁹.

- Iler Iler Diana Carolina en el 2017 en su tesis titulada “Evaluación de la actividad nematocida in vitro de aceites esenciales frente a *Meloidogyne*.”, tuvo como objetivo evaluar la actividad nematocida in vitro de los aceites esenciales de eucalipto, romero, tomillo, orégano, demostrando que el aceite de tomillo y romero presentaron una mortalidad del 100 % a las 24 y 8 horas de exposición respectivamente frente a nematodos juveniles en segundo estadio extraídos de raíces de tomate¹⁰.
- Martinotti, Marcelos Diego et al. En el 2016 realizaron el estudio titulado “ Efecto Nematicida de extractos de ajo, orujos de uva y alperujo de aceituna; sobre *Meloidogyne incognita*”, compararon el efecto de extractos acuosos de bulbillos de ajo, de compost inmaduro de alperujo de aceituna, de compost inmaduro de orujo de uva fresca y de compost inmaduro de orujo de uva agotado, sobre el índice de agallamiento, el índice de reproducción de huevos y juveniles J₂ y la población final de hembra de *M. incognita*, en plantas de vid; obteniendo como resultado que el extracto de los bulbillos de ajo tuvo una disminución notable en todos los parámetros que se quisieron demostrar en el presente estudio¹¹.

Nacional:

- De la revisión bibliográfica realizada a nivel nacional no se encontró trabajos sobre la evaluación del uso de extractos de algas sobre nematodos. Sin embargo, existen numerosos trabajos en donde se ha utilizado nematocidas biológicos a base de plantas, hongos, etc. para el control de poblaciones del género *Meloidogyne* presentes en diferentes cultivos de: quinua, maíz, entre otros cultivos.^{12 13}
- Cruzados-Campos Jackeline en el 2021 en su tesis titulada “Aplicación foliar de algas marinas en el Rendimiento y la calidad en dos cultivares de melón (*Cucumis melo L.*) en la Molina”, determinó el efecto de la aplicación foliar de algas marinas Fertimar (100% a base de algas *Lessonia nigrescens* y *Lessonia trabeculata*) en el desarrollo fenológico, rendimiento, calidad y viabilidad económica, en dos cultivares de melón Rina F1 (var. *reticulatus*) y Steego F1 (var. *inodorus*), en Costa Central, bajo riego por goteo. La respuesta en rendimiento comercial y no comercial, calidad del fruto,

crecimiento y desarrollo de ambos cultivares fue significativa, asimismo, incrementó el índice de rentabilidad, convirtiéndose en una alternativa orgánica económicamente viable¹⁴.

Local:

- Solier Allcca Sonia y Rimache Allcca Wilson en el 2019 en su trabajo de tesis titulada “Efecto de la aplicación foliar de tres fuentes de algas marinas en diferentes dosis en el cultivo de sandía (*Citrullis lanatus* L.) híbrido Santa Amalia en la zona media de valle de Ica”, determinaron el mejor producto y dosis de extracto de algas marinas, aplicados al área foliar. En el rendimiento de sandía, encontraron diferencia estadística, en los tratamientos en estudio destacando los productos Algas (*Ascophyllum nodosum*) y Algamar (*Lessonia nigrescens*) con la dosis de 6.0 L/ha, observándose el efecto positivo, superando ampliamente al testigo quien obtuvo una baja producción. La mayor rentabilidad desde el punto de vista económico la obtuvo el tratamiento (Algax, *Ascophyllum nodosum* 6.0 L/ha)¹⁵.

- Huaroto Palacios Lorena y Valdivia Pillaca María en el 2018 en su trabajo de tesis titulada “Efectividad Nematicida de *Paecilomyces lilacinus* sobre el cultivo de *Vitis vinífera* y *Capsicum annum*, infestados con *Meloidogyne spp.* “Nematodo del Nódulo” Mayo a Agosto del 2018”, evaluaron a través de ensayos in vitro la reducción de la población de *Meloidogyne spp* en un 47% de J2, huevos en un 73% y hembras en 28% a un nivel manejable. Se tuvo como conclusión que *Paecilomyces lilacinus* es eficaz para el control de *Meloidogyne* en la prueba de campo¹⁶.

- Galindo, Ruth en el 2011, en su trabajo de tesis titulada “Efecto nematicida in vitro y en plantas de tomate de algas marinas *Colpomenia sinuosa*, *Gracilariopsis lemaneiformis* y *Ulva papenfussii* de la Bahía de Paracas sobre *Meloidogyne incognita*” evaluó el efecto de diversos extractos de las algas: *Colpomenia sinuosa*, *Gracilariopsis lemaneiformis* y *Ulva papenfussii* a concentraciones de 10, 50 y 100 %, como una alternativa más ecológica para el control del nematodo *M. incognita*, encontrando acción nematicida in vitro en las tres especies, teniendo un mayor efecto la *Ulva papenfussii*, con la concentración más efectiva del 10 % para los extractos probados (metanólico, acuoso y etanólico)¹⁷.

- Varas, Noemí en el 2011, en su tesis titulada “Evaluación de la efectividad de extracto de *Bidens pilosa* L. para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en *Lycopersicum esculentum* variedad Rio Grande tomate in vitro y el tinglado en el Valle de Ica” realizó el estudio fitoquímico de extracto y actividad nematóxica de extractos de *Bidens pilosa* L. para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood, In vitro y el tinglado con tomate variedad Rio Grande, en donde se identificó los siguientes metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides catequinas grupos fenólicos libres y triterpenoides y/o esteroides, atranquinonas, leucoantocianidinas, siendo negativo para taninos y saponinas. Encontró que en la efectividad in vitro existe diferencia significativa entre cada dosis y los tipos de extracción, por lo que demostró su eficiente actividad tanto en el estadio juvenil como huevo, resultando ser más efectiva, el extracto por flujo etanólico (ERE) desde las dosis 1.5% en las tres pruebas de comparación con los demás tratamientos¹⁸.

1.6.2. *Lessonia nigrescens*:

- **Generalidades**

Es una macroalga parda que alcanza hasta 4 metros de longitud y pertenece a la familia *Lessoniaceae*, más conocida en el Perú como arcanto, negra o cabeza, que pertenecen al orden de laminariales que geográficamente se encuentran ubicadas en las costas del Océano Pacífico de Sudamérica.^{14 19}

Presenta un rizoide de hasta 20 cm de diámetro de donde nacen uno o más ejes principales surgiendo de cada eje, láminas²⁰.

Estas algas se han caracterizado por presentar una gran cantidad de proteínas, oligoelementos, mucílagos y vitaminas; siendo su principal empleo en la alimentación humana.¹⁹



Figura 1. *Lessonia nigrescens*

- **Clasificación botánica**

La identificación botánica fue realizada por el biólogo David Miranda Huamán de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga; según el sistema de Clasificación de Guiry, M.D, & Guiry, G.M, (2018). (Ver anexo 1.)

Tabla 1. Clasificación Taxonómica *Lessonia nigrescens* Bory de Sant-Vincent

TAXONOMÍA	
Reino	PROTISTA
División	OCHROPHYTA
Clase	PHAEOPHYCEAE
Orden	LAMINARIALES
Familia	LESSONIACEAE
Género	Lessonia
Especie	<i>Lessonia nigrescens</i> Bory de Sant-Vincent
Nombre vulgar: arcanto negro	

- **Distribución Geográfica**

Se encuentra ubicado en Sudamérica en la costa de Océano Pacífico Este del hemisferio sur, distribuida desde la provincia de Callao (Perú), hasta el cabo de

Hornos (Chile). Domina las aguas frías de ambos hemisferios, ubicándose en las Islas Malvinas, Islas Heard y Kerguelen.^{21 22}

- **Hábitat**

Su distribución es intermareal y se localiza con mayor frecuencia en la zona marítima de las regiones de Ica, Arequipa, Moquegua y Tacna¹⁴.

Modifican la estructura y funcionamiento de la biodiversidad en los sistemas costeros someros donde se desarrollan, por lo que son considerados ingenieros ecosistémicos estructuradores de hábitats, que proveen sustrato para el asentamiento larval, reclutamiento de juveniles, región y hábitat para especies de macro invertebrados y peces²⁰.

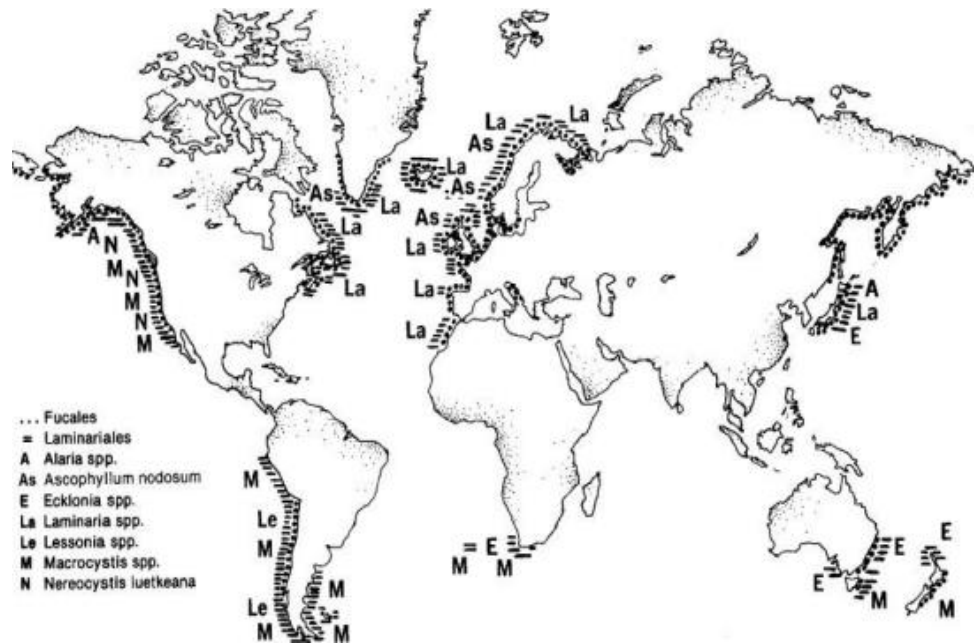


Figura 2. Distribución geográfica del género Lessonia

Fuente. Clare (1993)²³

- **Usos**

Esta alga como recurso biológico es de suma importancia debido a la extracción de alginatos, así como también en la industria alimentaria, textil, cosmética y farmacéutica. Asimismo, cumple con un rol ecológico ya que su función principal es la de protección brindando un lugar seguro a invertebrados marinos y peces ante la presencia de otros depredadores.²²

- **Estudios terapéuticos**

Un estudio realizado demostró la actividad antidiabética del extracto etanólico de *Lessonia nigrescens* (LNE) en ratones diabéticos tipo 2 inducidos por estreptozotocina (SZT). Sus niveles de glucosa en sangre en ayunas disminuyeron significativamente después de la administración de LNE, demostrando que podría proteger la arquitectura celular del hígado y el riñón. El tratamiento con LNE aumenta significativamente las poblaciones de Bacteroidetes y disminuye las Firmicutes en la microflora intestinal. Se podría considerar a LNE como un alimento funcional para reducir la glucosa en sangre y regular la microflora intestinal.⁹

1.6.3. *Meloidogyne spp*

Es un nematodo fitoparásito, microscópico y polífago capaz de parasitar más de 2000 especies de plantas, tiene una amplia distribución debido a que no existe suelo con cultivos infestados de estos parásitos. Su erradicación viene a ser difícil ya que al adaptarse rápidamente a las condiciones climáticas se establecen permanentemente en los suelos.

Se encuentra en el grupo de los endoparásitos sedentarios y se le caracteriza por presentar un estilete poco robusto en la cual ingresan a los tejidos de las plantas tornándose inmóviles para producir una proliferación celular mediante su alta actividad enzimática generando la formación de nódulos y heridas en la raíz del hospedero.²

- **Características morfológicas**

Este género de *Meloidogyne* presenta las siguientes dimensiones: la hembra mide 700 μ de largo y 400 μ de diámetro, el macho 1 400 μ de largo y 30 μ de diámetro, el juvenil dos (J2) 400 μ de largo y 15 μ de diámetro y un huevo 95 μ de largo y 40 μ de diámetro.

Las formas de las hembras son diferentes, mayormente ensanchadas y toman formas diferentes que se conocen como dimorfismo sexual, en cuanto a los machos se mantienen en su misma forma: delgados y cilíndricos.

Su ciclo de vida es muy breve alcanzando los 25 días a una temperatura de 27° en plantas de vid. En casos que hubiera condiciones desfavorables como la falta de alimentos (diapausa), puede cambiar de sexo de hembra a macho debido a que en este estado no se alimenta.²

1.6.4. Extractos vegetales:

Son caracterizados por tener metabolitos secundarios que cumplen la función defensiva de las plantas o algas tales como compuestos nitrogenados, fenólicos, terpenoides que presentan diversas funciones para la utilización en las áreas de la salud, agrícola e industrial principalmente.²⁴

Son obtenidos por el uso de un solvente (alcohol, agua, mezcla de estos u otro solvente selectivo) y un proceso de extracción adecuado, el uso del solvente y de la técnica de extracción, podremos obtener una diferente gama de sustancias.²⁵

- **Metabolitos secundarios:**

Son compuestos bioactivos de bajo peso molecular que se sintetizan y acumulan en respuesta a la defensa química contra el daño que ocasionan las heridas y el ataque de microorganismos patógenos. Su síntesis deriva del metabolismo primario dependiendo también de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos solo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico; éste aumento es importante para la supervivencia de las plantas. Es notable mencionar que tanto su biosíntesis y almacenamiento ocurren en diferentes lugares de la célula vegetal.⁴

- **Métodos de extracción:**

En la actualidad el aislamiento de los principios activos está vinculado a ensayos farmacológicos, no solo con el fin de su uso terapéuticos sino también para el análisis y estudio de una nueva sustancia activa.²⁶

• **Extracción Discontinua²⁷**

Este método sumerge la droga en el solvente en su totalidad, produciéndose la extracción y difusión de los principios activos en todas las direcciones alcanzando el equilibrio. Presenta diversos métodos variando su temperatura, tiempo y solventes utilizados.

✓ **Maceración:**

Indicada para la extracción de principios activos a temperatura ambiente, utilizando como solventes principales el agua o mezclas hidroalcohólicas,

asimismo el tiempo empleado oscila entre horas a días, debiendo mantener en constante agitación y en un ambiente oscuro.

- **Extracción Continua**

Este método pone en contacto la droga con el solvente adecuado en todo momento manteniendo el desequilibrio entre los metabolitos secundarios de la droga y en el solvente lo cual permite que se produzca la difusión celular. Los principales métodos de extracción continua son: Percolación y Soxhlet.²⁷

- ✓ **Soxhlet**

Es un proceso de extracción sólido-líquido. La temperatura que se utiliza es alta conllevando a ser un principal inconveniente, sin embargo, facilita la solubilización de las sustancias usando principalmente disolventes de punto de ebullición bajo, ejemplo: diclorometano, metanol o hexano.

La extracción se realiza en un aparato que consta de tres partes: matraz de fondo plano, un cuerpo extractor y un refrigerante. En el cuerpo del extractor se coloca el disolvente orgánico a utilizar que se llevará a ebullición y los vapores ascienden por el tubo lateral y llegan al refrigerante en donde se condensan y caen sobre la droga situada en el cuerpo del extractor, cuando este se llena de líquido extractivo, se vacía por el sifón lateral interno y desemboca en el matraz inferior. El disolvente se va reciclando durante el proceso mientras que los principios activos se concentran en el matraz inferior.²⁶

Culminada la extracción es necesario esperar un determinado tiempo hasta que el sistema se enfríe en su totalidad para poder manipularlo.²⁸

1.6.5. Cromatografía de capa fina (CCF)²⁹

Es una técnica analítica en la que consiste en la separación de los componentes de una mezcla en donde la fase estacionaria puede migrar sobre un soporte plano, visualizando los componentes mediante reveladores físicos tales como la lámpara con emisión de luz UV y reveladores químicos como son las sustancias químicas con reactividad.

II. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

2.1. Tipo y diseño de la investigación:

2.1.1. Tipo de investigación: Aplicada

Se caracteriza por dar solución a un determinado problema o planteamiento específico, en donde se enfoca en la búsqueda y consolidación del conocimiento para su posterior aplicación fortaleciendo el desarrollo cultural y científico.

2.1.2. Diseño de investigación:

Diseño experimental: es aquella donde el investigador manipula una variable y control o aleatoriza el resto de variables.

2.2. Lugar de investigación:

El presente trabajo de investigación se realizó en la región Ica, Departamento Ica, Distrito Ica, Av, Los Maestros s/n Ciudad Universitaria, durante los meses de enero 2023 y mayo del 2023 y los ensayos se ejecutaron en el Instituto de Investigación y el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Materiales de laboratorio

- Probetas
- Tubos de ensayo
- Gradillas
- Embudos
- Baguetas
- Pipetas volumétricas (5 ml)
- Pipetas Pasteur
- Pipetas capilares
- Placas Petri de plástico 5cm de diámetro 0,4 de alto
- Pizetas
- Tamiz de acero inoxidable 25 micras de diámetro
- Placas de reacción de porcelana

2.3.2. Material biológico

- Hojas y talos de *Lessonia nigrescens* Bory de Sant-Vicent “aracanto negro”
- Semillas de tomate variedad “Río grande”
- Raíces de plantas de tomate infestadas con el nematodo *Meloidogyne spp.*
- Tierra infestada con el nematodo *Meloidogyne spp.*

2.3.3. Equipos

- Balanza analítica
- Microscopio con cámara integrada MODELO: PRIMOSTAR HD Marca: ZEISS
- Equipo Soxhlet.
- Evaporador rotatorio marca HEIDOLPH modelo LABOROTAA 4000.
- Estufa

2.3.4. Reactivos

- Agua destilada
- Etanol 96°
- Diclorometano
- Anhidrido acético
- Hidróxido de amonio
- Sulfato de sodio anhidro
- Cloruro de sodio
- Cloruro Férrico
- Reactivo de Ninhidrina
- Solución de metionina
- Ácido clorhídrico concentrado
- Limaduras de magnesio.
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico.
- Hidróxido de sodio.
- Metanol
- Hidróxido de potasio
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Mayer
- Alcohol amílico
- Cloroformo

2.3.5. Otros

- Papel de filtro
- Papel de aluminio
- Papel toalla
- Tubos PVC
- Malla 50 cm
- Lejía
- Barra de silicona
- Envases pequeños de plástico
- Pistola de silicona
- Tapers de plástico grande
- Macetas pequeñas
- Licuadora
- Regla
- Aguja
- Plumón indeleble

2.4. Población

- Nemátodos de *Meloidogyne spp* en dos estadios (huevos y Juveniles 2).

2.5. Muestra

- Muestra botánica de Hojas y Talos de la especie marina *Lessonia nigrescens*
- Cantidad de semillas de *Solanum lycopersicum* (tomate) de la especie “Río Grande”.

2.6. Metodología

2.6.1. Recolección y preparación de las muestras:

- **Recolección:**

Para la elaboración del presente estudio, las algas de *Lessonia nigrescens* fueron recolectadas en la Bahía de Paracas ubicada en la provincia de Pisco (Enero del 2023)

Fueron lavadas con agua de mar para remover el exceso de arena, epífitos y sal. Posteriormente transportadas en bolsas herméticas hasta la ciudad de Ica. Una parte de lo recolectado fue enviado al laboratorio de Biología de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga para su clasificación taxonómica. (Anexo N° 1). El resto de la

muestra fresca fue llevada al Instituto de Investigación para la ejecución del presente estudio.

- **Tratamiento de la Muestra Vegetal:**

El alga fue lavada manualmente con agua destilada para poder eliminar cualquier residuo que haya quedado del mar, repitiendo este proceso hasta drenar el exceso de agua.

Las algas se colocaron en un ambiente seco y ventilado, sin luz directa al sol para que se sequen de manera natural durante 15 días.

Pasado este tiempo se cortaron en pequeños trozos de 2 cm y se almacenaron en bolsas de papel kraft, separando las hojas y los talos. (Anexo N° 2)

- **Obtención de extractos.** Para obtener el extracto se utilizó 1 Kg de las muestras secas y molidas macerándolos durante 15 días con 4 litros de etanol de 96° y renovando el solvente cada 7 días.

Culminado el tiempo se pasó a filtrar, seguidamente el marco de ambos macerados (hojas y talos) fueron llevados a extracción por el método de Soxhlet con etanol de 96° hasta llegar al agotamiento de la muestra.

- Los filtrados obtenidos se concentraron a presión reducida utilizando un evaporador rotatorio. (Anexo N° 3)

2.6.2. Identificación de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (arcanto)

Para la realización de este procedimiento se utilizó los extractos etanólicos de hojas y talos de *Lessonia nigrescens* con el fin de identificar los metabolitos secundarios presentes en el alga.

- **Identificación de Flavonoides**

- **Reacción de Shinoda:** en una placa de reacción de porcelana se colocaron 3 gotas de cada extracto etanólico, posteriormente se agrega 5 limaduras de Mg y 5 gotas de HCl, dejando reposar por unos segundos.

- **Identificación de Aminoácidos**
 - **Reacción Ninhidrina:** en tiras de papel de filtro se colocaron con ayuda de una pipeta capilar una gota de cada extracto etanólico y una gota del reactivo de Ninhidrina al 2%, dejándose a secar a temperatura ambiente y posterior a eso se colocaron en la estufa a 120°C.

- **Identificación de Grupos fenólicos**
 - **Reacción de Cloruro Férrico:** en una placa de reacción se colocaron 5 gotas de los extractos etanólicos agregándose 3 gotas de solución acuosa de FeCl₃, dejándose reposar por unos segundos.

- **Identificación de Taninos:**
 - **Reacción de Gelatina-sal:** se colocaron en 4 tubos de ensayo los extractos etanólicos (1mL) en donde se agregaron 1 mL de agua, se agita y se filtra, posteriormente se agrega 1 ml de solución de gelatina-sal y por último se verifica el precipitado.

- **Identificación de Triterpenos y/o Esteroides**
 - En cada muestra se agregó 1 ml de diclorometano, llevándose a baño maría y procedimos a filtrar.
 - Se procedió colocarse todas las muestras y se agregaron 5 gotas de anhídrido acético y 5 gotas de ácido sulfúrico, dejándose reposar por unos segundos.

- **Identificación de Alcaloides**
 - En cada muestra se agregó 1 ml de HCl, llevándose a baño maría y procedimos a filtrar.
 - Los 4 tubos que contienen los extractos con HCl se dividen en dos tubos más colocando en cada tubo 3 gotas de Reactivo de Mayer y 3 gotas de Reactivo Dragendorff respectivamente y por último se verifica el precipitado.

- **Identificación de Leucoantocianidinas y catequinas:**
 - **Reacción de Rosenheim:** se colocó en 4 tubos las muestras con 1 ml de etanol en cada uno, luego se le agregó 0,5 ml de HCl concentrado, posterior a ello se

llevó a baño maría por 10 min a 100 °C, se deja enfriar y se le añadieron 3 ml de agua destilada, por último, se le añadió 3 ml de alcohol amílico y agitamos.

- **Identificación de Antraquinonas**

- **Reacción de Bornträger:** colocar en 4 tubos de ensayo las muestras y agregamos 2 mL de diclorometano y luego se añadió 4 mL de NaOH 5%, agitándose suavemente.

- **Identificación de Cardenólidos**

- **Reacción de Kedde:** colocar en 4 tubos de ensayo las muestras y agregamos 1 ml de metanol a cada uno. Asimismo, se prepara en otro tubo una mezcla de 2 ml de hidróxido de potasio al 5.7% y 2 ml de ácido 3,5- dinitrobenzoico al 2%. Por último, se agrega 5 gotas de esta mezcla a cada tubo.

- **Identificación de Saponinas**

- **Prueba de espuma:** Se pesa 1g de muestra (hojas y talos) y se agregó 20 ml de agua destilada, se puso a hervir durante 15 min y se filtró en caliente, enrasamos a 20 ml con agua destilada y dejamos enfriar. Medimos 2,5 ml del preparado y se colocó en un tubo agitándose por 1 min, por último, se dejó reposar 15 min y se mide la espuma.

- **Cromatografía**

Se realizó la mezcla entre una pequeña muestra (4 muestras) con 1 ml de etanol y haciendo uso del tubo capilar se deposita en las tiras de papel cromatográfico para llevarlo a sumergir en 2 ml de éter de petróleo en un vaso de precipitado y se tapó con papel aluminio. Cuando se secó se llevó a la lámpara ultravioleta (254 / 360). Así se realizó el mismo procedimiento cambiando el solvente en donde se sumerge la muestra (diclorometano y acetato de etilo)

Por último, se realizó una mezcla de 10 ml de éter de petróleo y acetato de etilo (6:4) y se colocó la tira con las muestras sembradas.

2.6.3. Ensayos In Vitro

- **Obtención de *Meloidogyne spp.* (J2)** (Anexo N° 4)

Los nematodos en estadio Juveniles (J2) que se necesitan para realizar los ensayos se obtuvieron a partir de la tierra adyacente a raíces de tomates y paltas que presentaron nódulos, característica principal de la infestación de *Meloidogyne spp.*

Para realizar el aislamiento del nematodo *M. spp.*, se utilizó el método de la bandejita (método del embudo de Baermann Modificado)². Esta bandejita fue confeccionada mediante un tamiz a partir de un tubo de PVC (6 cm de alto y 6 pulgadas de diámetro) y malla de plástico (1 mm de trama), en donde se colocó una capa de papel toalla y sobre esta se depositó 50 cc de suelo de los campos infestados con *Meloidogyne spp.*, seguidamente se depositó el anillo de PVC con la malla en un taper de plástico sin que el anillo de PVC haga contacto con el fondo. Posterior a ello se agregó agua de caño limpia con la pizeta por el espacio comprendido entre el anillo de PVC y el taper de plástico hasta que el agua llegue a la muestra de suelos por filtración. La cantidad de agua que se ha agregado fue hasta que se observe la muestra de suelo completamente húmeda (50 ml aproximadamente).

Estas bandejas fueron cubiertas con una tapa para darles condiciones de oscuridad y evitar que caigan partículas extrañas del exterior. Pasando las 48 horas, se retiró la malla que contiene el suelo y el agua que ha sobrado en el fondo del taper fue recolectado en una placa Petri con ayuda de una pipeta.

Después del traspaso de los nematodos, fueron identificados por observación directa con el uso de un microscopio con cámara integrada a escala de 40X.

Este método se basa en la capacidad de la movilidad de los nematodos en el agua para atravesar los filtros del papel toalla y la malla de plástico, siendo un indicador de su viabilidad.

- **Prueba de mortandad de *Meloidogyne spp.* (J2)** (Anexo N° 5)

• **Determinación de la efectividad de las hojas y talos de *Lessonia nigrescens***

En una gradilla se colocaron 10 tubos de ensayo estériles que contenían los extractos de hojas y talos de *Lessonia nigrescens* a las concentraciones de 1, 50 y 100 % usando agua potable como vehículo y un testigo (agua potable), en

donde se transfirieron con la pipeta Pasteur aproximadamente 100 individuos de *Meloidogyne spp* en estadio J2 con la ayuda del microscopio con cámara integrada a escala de 40X, permaneciendo por un espacio de 24 h. Pasado este tiempo se transfirieron a otro tubo de ensayo estériles conteniendo agua potable dejándose por un tiempo de 24 horas más; al término de este tiempo se realizó el primer conteo de los individuos muertos y después de 24 horas más se realizó un conteo definitivo para verificar los resultados.

- **Ensayos con el extracto etanólico más efectivo**

El extracto etanólico disuelto en agua, se ensayó a diferentes concentraciones (0.1, 1, 10, 50, 100%), siendo el testigo agua potable. Se procedió con el mismo procedimiento descrito en el punto anterior.

- **Concentración letal media (CL 50)³⁰**

Para la concentración letal media, se utilizó el extracto etanólico que presentó mayor efecto nematocida a diferentes concentraciones (100, 50, 10 y 5 mg/mL) en la cual estuvo en contacto por 72 horas los J2. Pasado este tiempo se procedió a contar los individuos muertos de cada tubo. Este procedimiento se realizó por triplicado.

Los datos se procesaron haciendo uso del método Probit descrito por FINNEY, dando como resultado el valor de CL 50, es decir, la concentración en la que se produce la muerte del 50% de la población de la *Meloidogyne spp*, teniendo un intervalo de confianza de 95%.

- **Prueba estadística³¹**

Los datos fueron analizados haciendo uso de los procedimientos de análisis de varianza y comparación de medias (LSD, $P < 0.05$).

2.6.4. Prueba de Bioensayo en las plantas de tomate

- **Tratamientos en estudio y diseño experimental**

Para el presente ensayo se ha empleado como tratamientos los extractos etanólicos de las hojas y los talos del alga *Lessonia nigrescens* a concentraciones determinadas por los resultados obtenidos del ensayo in vitro, en los que fueron comparados con

cuatro testigos: testigo químico “Vydate® L”, testigo orgánico “Nema 100”, testigo inoculado y un testigo control sin inoculación. (Tabla 2).

Se ha realizado este trabajo teniendo tres momentos de aplicación utilizando el diseño aleatorizado, en macetas, teniendo como sistema de riego la regadera para evitar una contaminación cruzada entre los tratamientos.

Tabla 2. Tratamientos usados para el control del nemátodo *Meloidogyne spp* en plantas de tomate.

Tratamiento	Descripción	Dosis	Código	1° aplicación	2° aplicación	3° aplicación
T1	Extracto etanólico de las hojas de <i>L. nigrescens</i>	1% *	EEHLN 1%	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T2	Extracto etanólico de las hojas de <i>L. nigrescens</i>	10% *	EEHLN 10%	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T3	Extracto etanólico de las hojas de <i>L. nigrescens</i>	50% *	EEHLN 50%	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T4	Extracto etanólico de los talos de <i>L. nigrescens</i>	1% *	EETLN 1%	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T5	Extracto etanólico de los talos de <i>L. nigrescens</i>	10% *	EETLN 10%	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T6	Extracto etanólico de los talos de <i>L. nigrescens</i>	50% *	EETLN 50%	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T7	Vydate ® L (Oxamyl)	4 L/ Ha	TQ	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T8	Nema 100 (Mezcla orgánica)	3 L / Ha	TO	7 días después de la inoculación	7 días después de la 1° aplicación	15 días después de la 1° aplicación
T9	Testigo inoculado	-	TI	-	-	-
T10	Testigo control	-	TC	-	-	-

* Dosis establecidas después de obtener los resultados en los ensayos in vitro

- **Preparación de los almácigos**

Los almácigos fueron preparados haciendo uso de las semillas de tomate de la especie “Río Grande”, siendo estas muy comerciales y susceptibles a la infestación del nemátodo *Meloidogyne spp*; en la cual se utilizaron bandejas de siembra de 50 cm largo x 30 cm de ancho y arena fina, realizando 3 surcos en la misma en donde se colocaron 100 semillas aproximadamente. Las semillas germinaron en el día 7 del sembrado y para el día 20 fueron trasplantadas a macetas individuales.

- **Trasplante de plantines a las macetas**

Una vez pasado los 20 días en el almácigo, los plantines fueron trasplantados en macetas de 1 Kg de capacidad desinfectadas previamente con hipoclorito de sodio al 5 %, siendo posteriormente llenadas con sustrato estéril a concentraciones siguientes: 2 de suelo / 1 arena / 1 compost.

- **Inoculación con huevos de *Meloidogyne spp* a macetas²**

Hussey y Barker (1973) establecieron el método del hipoclorito de sodio al 0,5% para la extracción de huevos en raíces infestadas con *Meloidogyne spp*³¹.

Esta técnica fue realizada haciendo uso de raíces infestadas con el nematodo agallador y cortándose en trozos de 1 cm, depositando 5 g de los mismos a una licuadora y vertiendo 100 ml una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% preparado previamente, procediendo a licuarlo en 3 tiempos de 10 segundos cada uno.

Posteriormente el contenido obtenido se trasvasó a un vaso de precipitado, y seguidamente de pasó por tres tamices de 500, 180 y 38 μ m siendo estos colocados uno encima del otro de mayor a menor por el tamaño de los poros, haciendo un lavado con agua corriente de manera suave para así obtener todo el residuo del tamiz más fino en otro vaso de precipitado y fue enrasado a 100 ml con agua potable homogenizándolo con una bagueta. De la muestra obtenida se tomó una alicuota de 1 ml que se depositó en una placa Petri de plástico (se realizó 10 trazos con plumón indeleble para separar los campos y que facilite el recuento de huevos) y se observó en el microscopio con 40X de aumento (Ver Anexo N° 6).

Este procedimiento se realizó por triplicado para obtener el promedio del resultado de la cantidad de huevos por ml.

Pasados 10 días del trasplante de las plantas de tomate, fueron inoculadas con 1000 huevos por maceta, en donde se abrieron surcos de 5 cm de profundidad.

- **Evaluación N° 1 de la población de *Meloidogyne spp* y primera aplicación de los tratamientos**³¹

Para esta primera evaluación del suelo tuvieron que pasar 7 días de la inoculación realizada, tomando una muestra representativa de 100 cc de suelo a una profundidad de 10 cm por cada maceta.

Estas muestras fueron recolectadas en bolsas impermeables y se analizaron mediante el método de la bandejita (previamente descrita) en donde se obtuvo una población de nematodos en estadio Juveniles 2 (J2). Después del análisis se procedió a humedecer el suelo para realizar la aplicación de los tratamientos sobre las macetas, realizando surcos de 3 cm de profundidad y se finalizó nuevamente con un regado de favorecer la difusión de la aplicación dejando actuar por 7 días.

- **Trasplante y segunda aplicación de los tratamientos**³¹

A raíz que las plantas están crecimiento se procedió a hacer un trasplante a macetas de 2 Kg de capacidad con sustrato estéril (2 suelo/1 arena/ 1 compost) posterior a los 7 días de la primera aplicación de los tratamientos.

Seguidamente se realizó la segunda aplicación de los tratamientos y se dejó actuar por 7 días más.

- **Evaluación N° 2 de la población y tercera aplicación de los tratamientos**³¹

Pasados los 7 días después de la segunda aplicación de los tratamientos se procedió con la evaluación de la población de nematodos en el suelo, haciendo uso del mismo método utilizado para la primera evaluación de los nematodos. Después de realizar el análisis se procedió a realizar la tercera aplicación de los tratamientos.

- **Evaluación N° 3 de la población de *Meloidogyne spp***³¹

Esta última evaluación fue realizada pasados 7 días de la tercera aplicación de los tratamientos, en la que se determinó la población final de nematodos por 100 cc haciendo uso del método utilizado en las evaluaciones anteriores. (Anexo N° 7)

- **Toma de datos biométricos³¹**

Para este procedimiento las plantas fueron retiradas del suelo y lavadas meticulosamente con agua corriente para eliminar cualquier residuo de tierra, el cual sus raíces fueron rotuladas, pesadas y medidas junto con el follaje fresco para su última evaluación.

- **Diseño estadístico en condición semicontrolada**

Para esta condición semicontrolada se utilizó el diseño completo al azar (DCA), realizando la evaluación a tres repeticiones por tratamiento.

Los datos obtenidos fueron llevados a analizar haciendo uso el procedimiento de Análisis de varianza y comparación de medias (LSD, $P < 0,05$).

III. RESULTADOS

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto nematocida de *Lessonia nigrescens* (Arcanto) frente al nematodo agallador *Meloidogyne spp* que fueron obtenidas de suelos y raíces de plantas de tomate infestadas del valle de Ica. La efectividad de los diferentes extractos y concentraciones de los mismos están determinado por la mortandad que se ha ocasionado en los nematodos, expresada en porcentaje.

3.1. Características organolépticas de los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (Arcanto)

El extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* (arcanto) presenta un color verde oscuro, muy viscoso y olor característico.

El extracto etanólico de los talos de *Lessonia nigrescens* (arcanto) presenta un color marrón oscuro, de aspecto viscoso y olor característico.

3.2. Identificación de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (Arcanto)

Obtenido los extractos etanólicos se realizaron la identificación de los metabolitos secundarios obteniendo los siguientes resultados:

3.2.1. Identificación de Flavonoides (Reacción de Shinoda)

Para la identificación de flavonoides y que la reacción sea positiva debe aparecer tonos de color rojo, anaranjado y violeta, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Negativo.
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Positivo.
- Macerado de Talos: Positivo.
- Extracción de Soxhlet de Talos: Positivo.

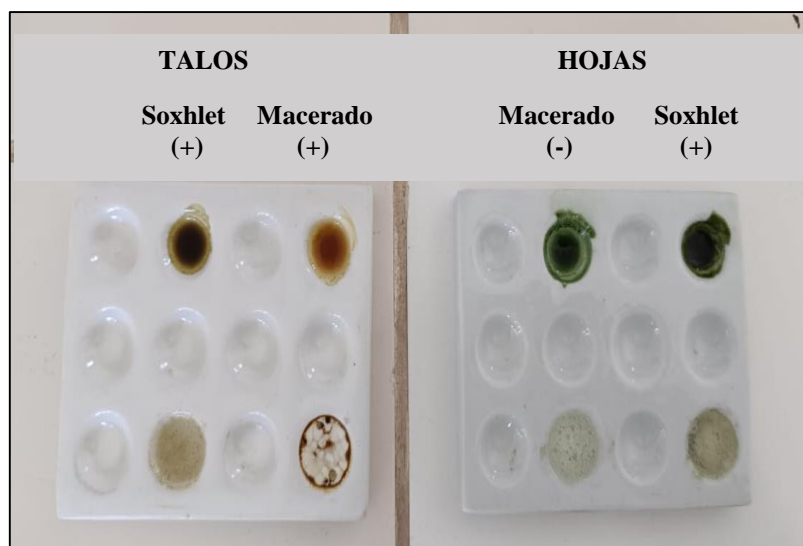


Figura 3. Identificación de flavonoides en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.2. Identificación de Aminoácidos (Reacción de Ninhidrina)

Para la identificación de aminoácidos y que la reacción sea positiva debe apreciarse un color azul violáceo, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Positivo
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Positivo.
- Macerado de Talos: Positivo.
- Extracción de Soxhlet de Talos: Positivo.

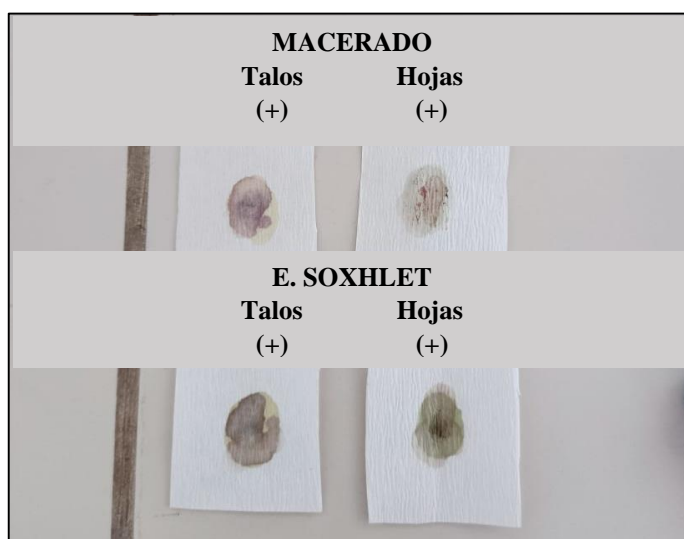


Figura 4. Identificación de Aminoácidos en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.3. Identificación de Grupos fenólicos libres (Reacción de Cloruro Férrico)

Para la identificación de grupos fenólicos libres y que la reacción sea positiva debe apreciarse un color azul-negro, verde o azul verdoso, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Positivo
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Positivo.
- Macerado de Talos: Negativo.
- Extracción de Soxhlet de Talos: Positivo.

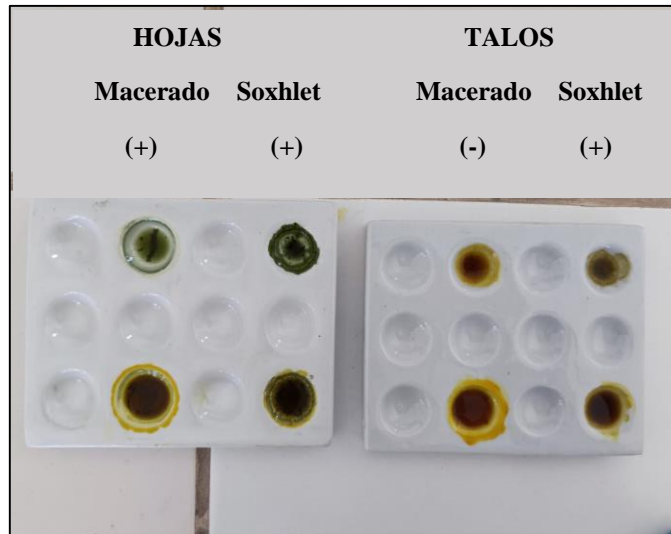


Figura 5. Identificación de Grupos fenólicos libres en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.4. Identificación de Taninos (Reacción de Gelatina-sal)

Para la identificación de taninos y que la reacción sea positiva debe apreciarse un precipitado, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Negativo.
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Negativo.
- Macerado de Talos: Negativo.
- Extracción de Soxhlet de Talos: Negativo.



Figura 6. Identificación de taninos en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.5. Identificación de Triterpenos y/o Esteroides (Reacción de Liebermann Burchard)

Para la identificación de triterpenos y/o esteroides y que la reacción sea positiva debe apreciarse un color verde, azul verdoso (vías rojo o azul), en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Positivo.
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Positivo.
- Macerado de Talos: Positivo.
- Extracción de Soxhlet de Talos: Positivo.

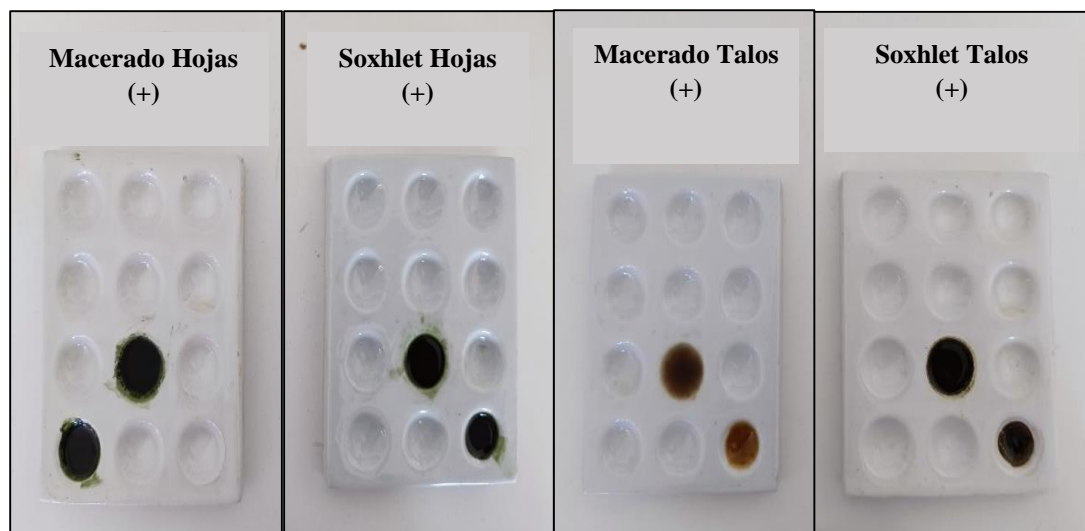


Figura 7. Identificación de triterpenos y/o esteroides en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.6. Identificación de Alcaloides

Para la identificación de alcaloides y que la reacción sea positiva debe apreciarse un precipitado, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Negativo. (Mayer y Drangendorff)
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Negativo. (Mayer y Drangendorff)
- Macerado de Talos: Negativo. (Mayer y Drangendorff)
- Extracción de Soxhlet de Talos: Negativo. (Mayer y Drangendorff)

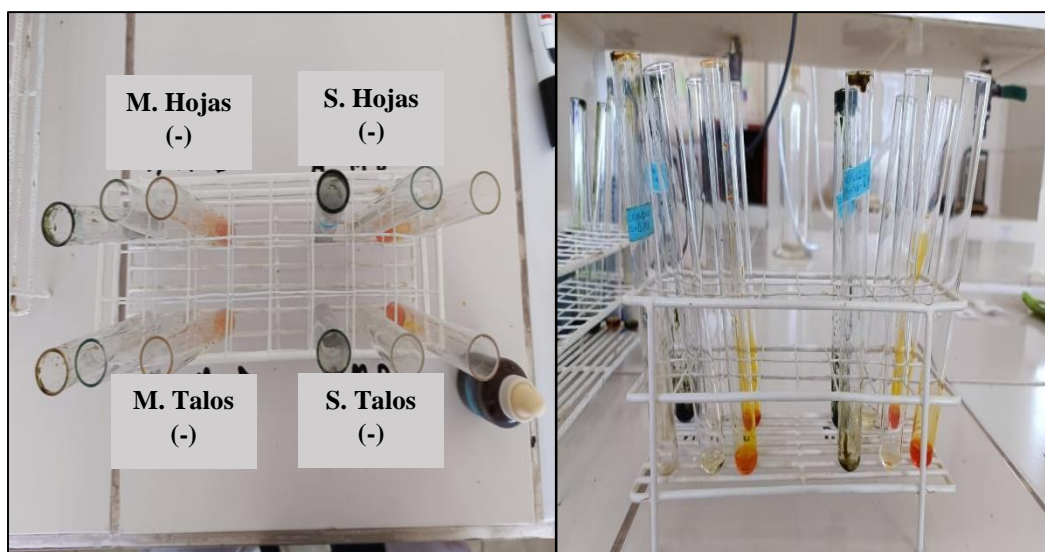


Figura 8. Identificación de alcaloides en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.7. Identificación de Leucoantocianidinas y Catequinas (Reacción de Rosenheim)

Para la identificación de leucoantocianidinas y catequinas y que la reacción sea positiva debe apreciarse un color que va desde el rosado débil hasta carmesí oscuro, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Negativo (Leucoantocianidinas y catequinas).
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Negativo (Leucoantocianidinas y catequinas).
- Macerado de Talos: Positivo. (Catequinas).
- Extracción de Soxhlet de Talos: Positivo. (Catequinas).

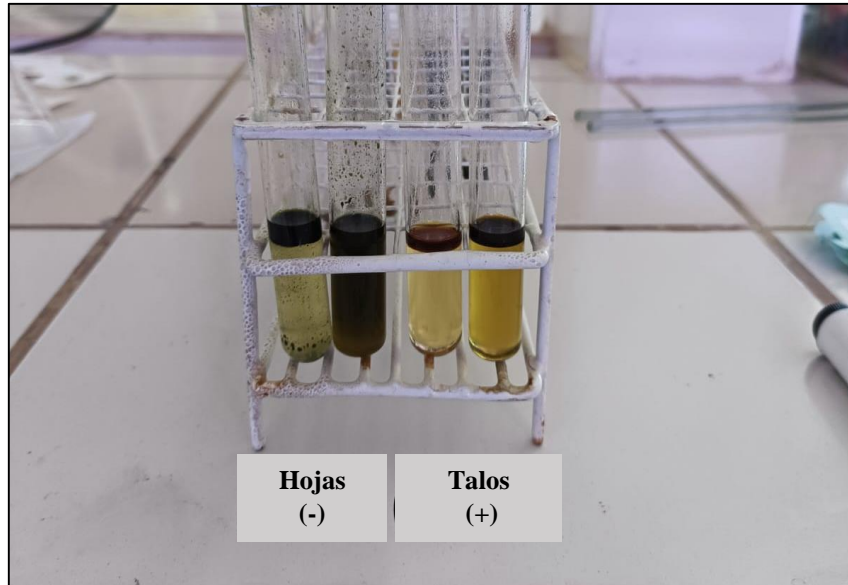


Figura 9. Identificación de leucoantocianidinas y catequinas en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.8. Identificación de Antraquinonas (Reacción de Bornträger)

Para la identificación de antraquinonas y que la reacción sea positiva debe apreciarse que la fase acuosa sea de un color rojo, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Negativo.
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Negativo.
- Macerado de Talos: Positivo.
- Extracción de Soxhlet de Talos: Positivo.

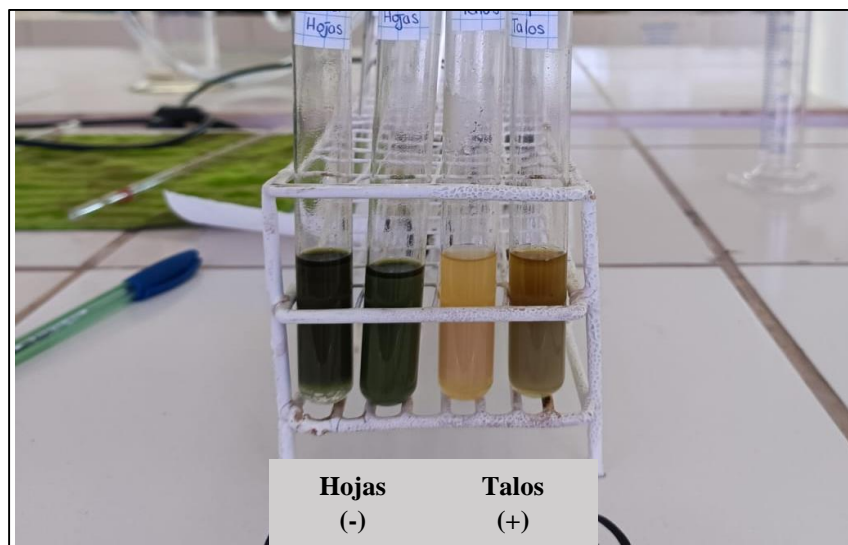


Figura 10. Identificación de antraquinonas en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.9. Identificación de Cardenólicos (Reacción de Kedde)

Para la identificación de cardenólicos y que la reacción sea positiva debe apreciarse que la fase acuosa sea de un color púrpura o violáceo, en donde se observó lo siguiente:

- Macerado de Hojas: Negativo.
- Extracción de Soxhlet de Hojas: Negativo.
- Macerado de Talos: Negativo.
- Extracción de Soxhlet de Talos: Negativo.

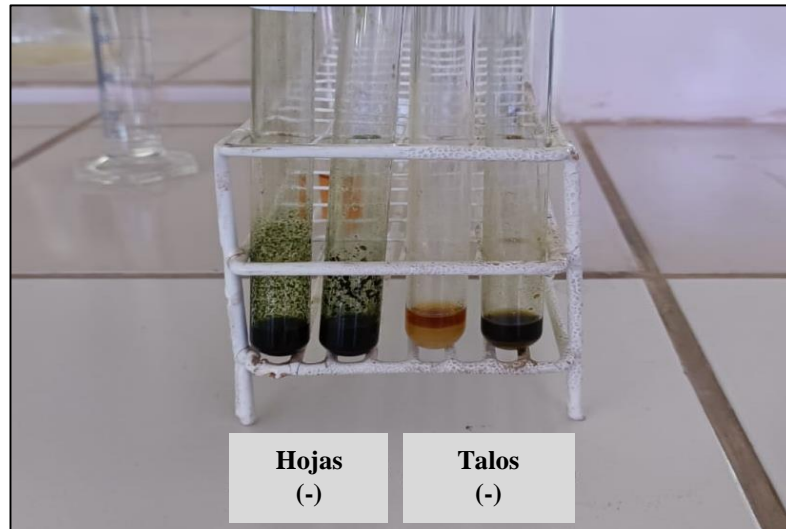


Figura 11. Identificación de cardenólicos en los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*.

3.2.10. Identificación de Saponinas (Prueba de Espuma)

Para la identificación de saponinas y que la reacción sea positiva debe apreciarse que se forme una espuma con una altura mayor de 5 mm, en donde se observó lo siguiente:

- Muestra de Hojas: Positivo.
- Muestra de Talos: Negativo.

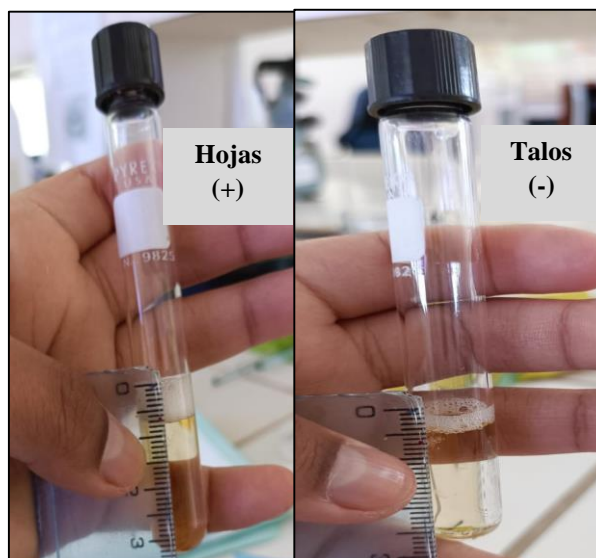


Figura 12. Identificación de saponinas en las muestras de *Lessonia nigrescens*.

3.2.11. Cromatografía

Se utilizó como fase móvil la mezcla compuesta por éter de petróleo y acetato de etilo (6:4), solventes poco polar y muy polar respectivamente; en la cual se identificaron más metabolitos secundarios en el extracto de hojas (macerado y por extracción de Soxhlet).

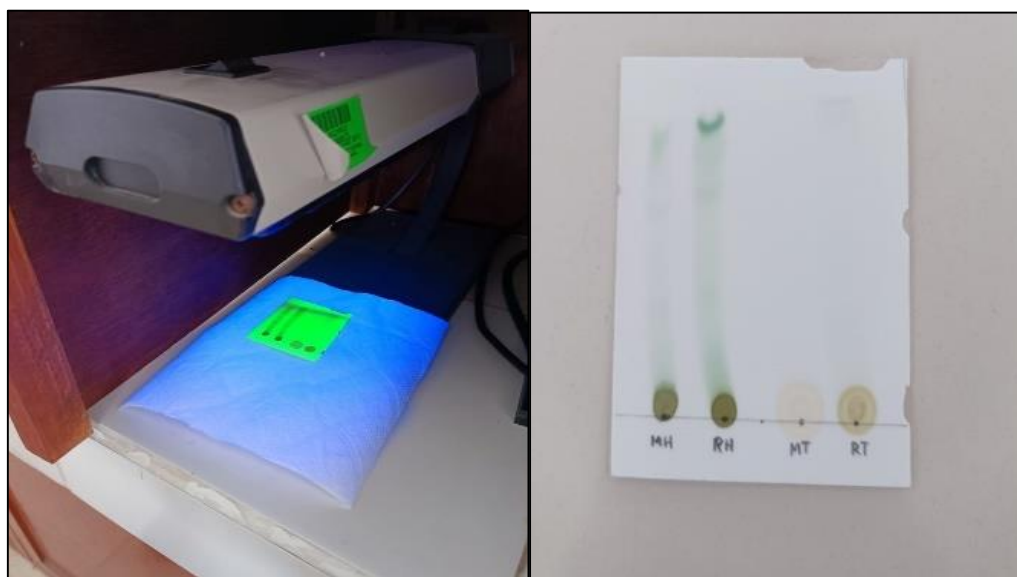


Figura 13. Identificación de principales familias de metabolitos secundarios en los extractos de *Lessonia nigrescens*.

3.3. Ensayos in vitro

3.3.1. Determinación de los extractos de *Lessonia nigrescens* con mayor efecto (hojas y talos)

Los extractos del alga *Lessonia nigrescens* de hojas y talos a concentraciones 1, 50 y 100 % presentaron efecto nematicida sobre *Meloidogyne spp* a comparación al testigo ($P>0,05$). En ambos extractos (hojas y talos) a concentración del 100% produjeron el 100% de mortandad en los nematodos J2; sin embargo, a concentraciones de 50% se obtuvo una mortandad de 70.2% para el extracto de talos y 96.4% para el extracto de hojas.

Por último, para una concentración del 1% se obtuvo una mortandad de 34% Y 55% respectivamente; demostrándose que el extracto de hojas de *Lessonia nigrescens* tiene mayor efecto nematicida. (Fig. 14)

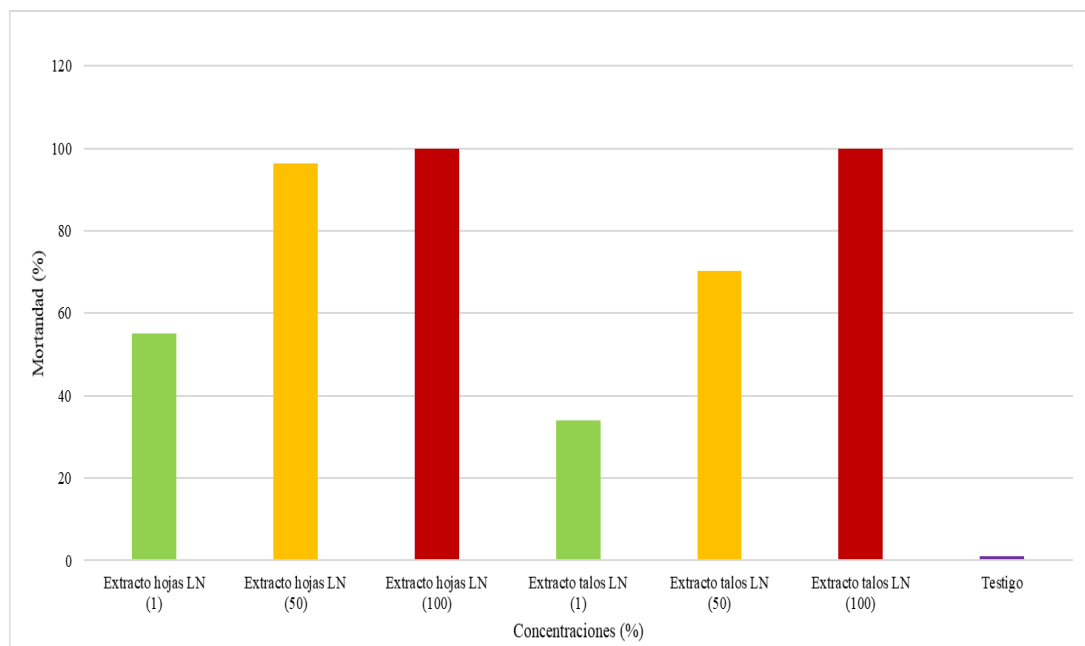


Figura 14. Porcentajes de mortandad in vitro de *Meloidogyne spp* por el efecto nematicida de los extractos de *Lessonia nigrescens* (hojas y talos)

3.3.2. Ensayos con el extracto de hojas de *Lessonia nigrescens* a diferentes concentraciones

La mortandad (expresada en %) producida por el extracto etanólico a diferentes concentraciones se describen en la Tabla 3. A una concentración del 50% se observó un mayor efecto (96.4%). La concentración con mayor efecto nematicida es de 100%, sin embargo, se obtiene efecto significativo con 50% del extracto.

Tabla 3. Porcentajes de mortandad de *Meloidogyne spp* producida por el extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* a diferentes concentraciones.

Concentración (%)	Extracto Etanólico
0.1	23.3
1	55
10	76
50	96.4
100	100.0
Testigo	2.1

Para la concentración letal media para el extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* fue 0.882 mg/mL (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración Letal Media del extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* en el ensayo in vitro.

Extracto	Concentración (mg/mL)	Porcentaje de mortandad (%)	Logaritmo de la concentración	Concentración Letal Media (mg/mL)
Etanólico	100	100	2	0.882580908
	50	91	1.698970004	
	10	78	1	
	5	67	0.698970004	

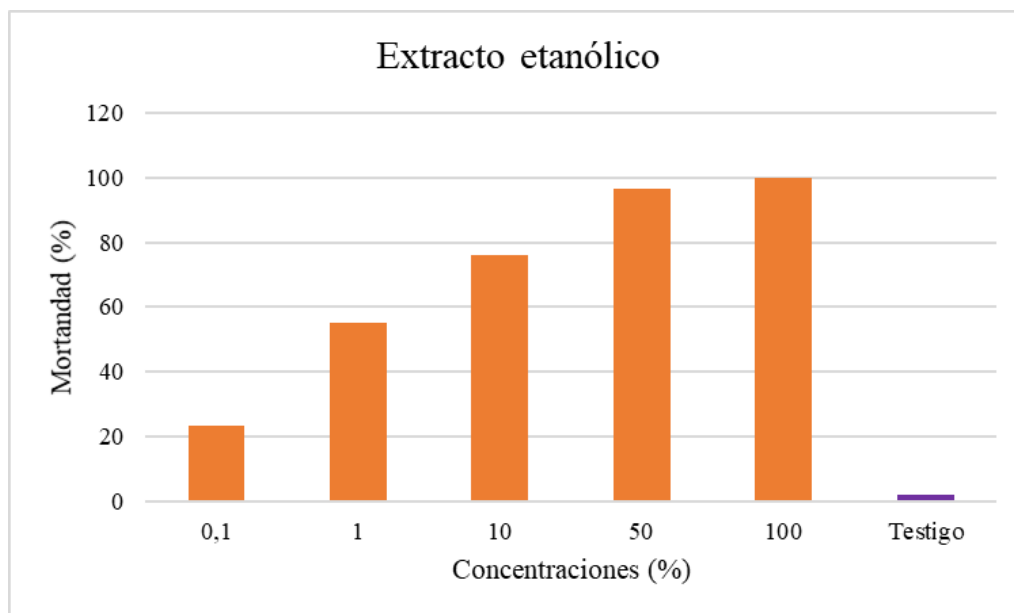


Figura 15. Porcentajes de mortandad de *Meloidogyne spp* producida por el extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* a diferentes concentraciones

3.4. Prueba de Bioensayo en plantas de tomate

3.4.1. Determinación del extracto etanólico con mayor efectividad

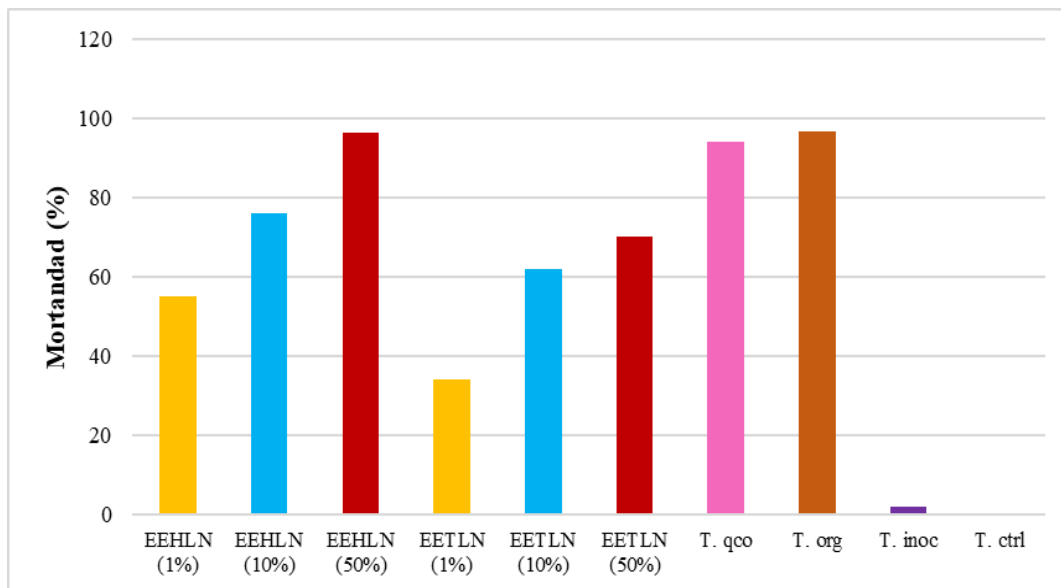
Los extractos etanólicos de las hojas y los talos del alga *Lessonia nigrescens* a concentraciones de 1, 10, 50 % presentaron un mayor efecto nematocida sobre el nematodo *Meloidogyne spp* en comparación al testigo inoculado. En primer lugar, se tiene el extracto etanólico de las hojas al 50% con un efecto nematocida constante. (Tabla 5, Figuras 16 y 17)

Tabla 5. Efectos biométricos sobre plantas de tomate de los extractos etanólicos de las hojas y talos de *Lessonia nigrescens* a diferentes concentraciones, tratamiento químico, orgánico, inoculado en comparación con el testigo control.

Tratamiento		Peso de raíces	Longitud de raíces	Peso de follaje fresco	Longitud de follaje fresco
		(g)	(cm)	(g)	(cm)
T1	EEHLN 1%	6,5	20,2	12,6	37,5
T2	EEHLN 10%	7,2	25,1	13,9	42,1
T3	EEHLN 50%	8,0	26,4	15,0	48,4
T4	EETLN 1%	6,0	18,3	10,7	35,6
T5	EETLN 10%	6,2	21,5	11,3	38,4
T6	EETLN 50%	7,2	24,2	14,2	40,2
T7	Testigo químico	7,0	25,6	13,1	34,5
T8	Testigo orgánico	8,5	15,9	14,8	46,6
T9	Testigo inoculado	3,9	9,8	5,2	31,2
T10	Testigo control	4,5	12,9	7,0	33,4

***EEHLN:** Extracto Etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens*.

***EETLN:** Extracto Etanólico de los talos de *Lessonia nigrescens*.



*EEHTLS: Extracto etanólico de hojas de *Lessonia nigrescens*, *EETLS: Extracto etanólico de talos de *Lessonia nigrescens*, *T. qco: Testigo químico, *T. org: Testigo orgánico, *T. inoc: Testigo inoculado, *T.ctrl: Testigo control.

Figura 16. Porcentaje de mortandad del bioensayo en plantas de tomate de *Meloidogyne spp* producida por los extractos etanólicos de hojas y talos del alga *Lessonia nigrescens* a diferentes concentraciones.

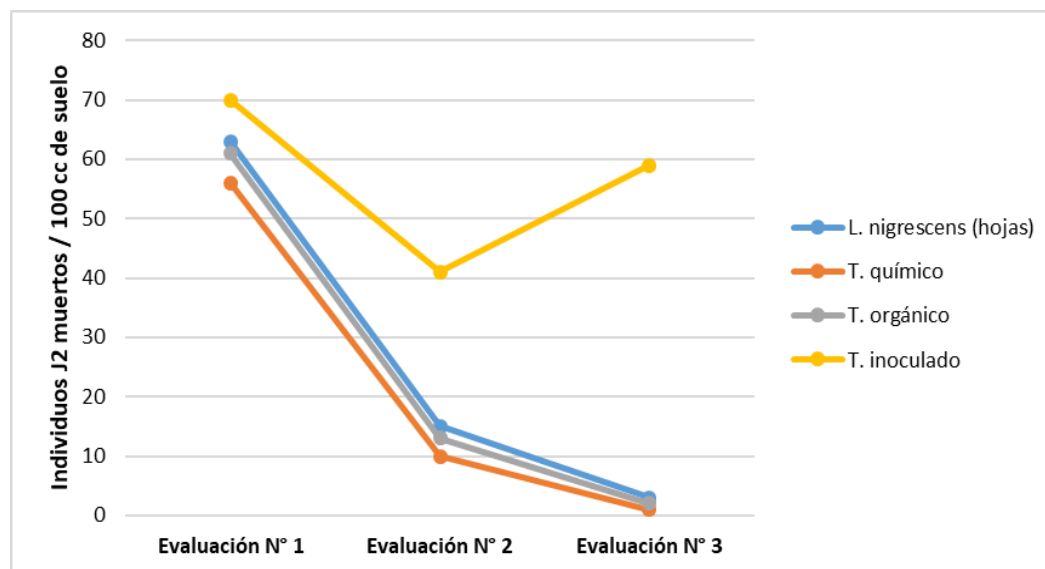
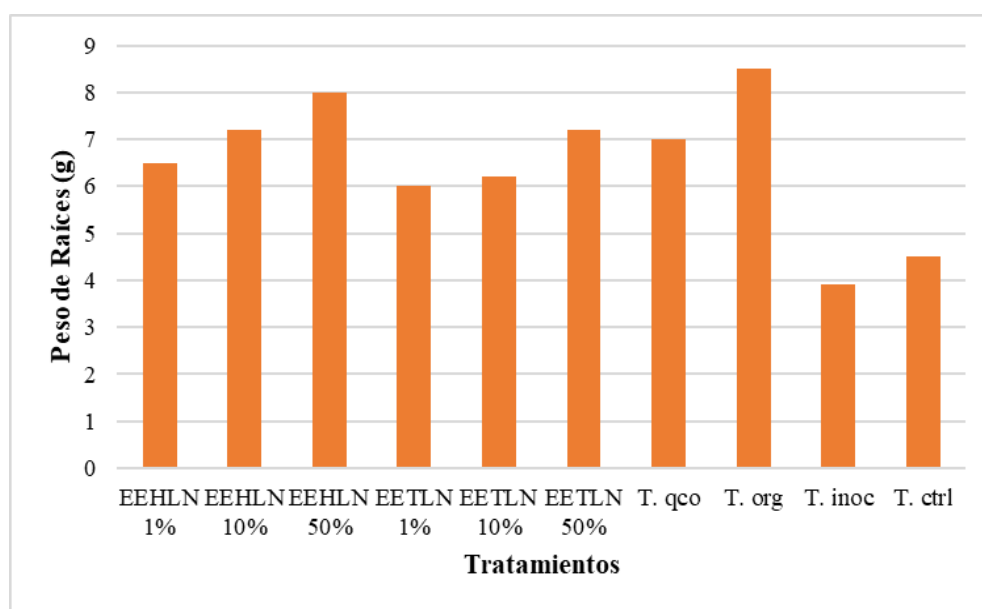


Figura 17. Número de individuos J2 de *Meloidogyne spp* / 100 cc de suelo en las 3 evaluaciones del tratamiento con mayor efectividad nematocida en comparación con el testigo químico, orgánico e inoculado.

Tabla 6. Concentración Letal Media del extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* en el bionsayo en plantas de tomate.

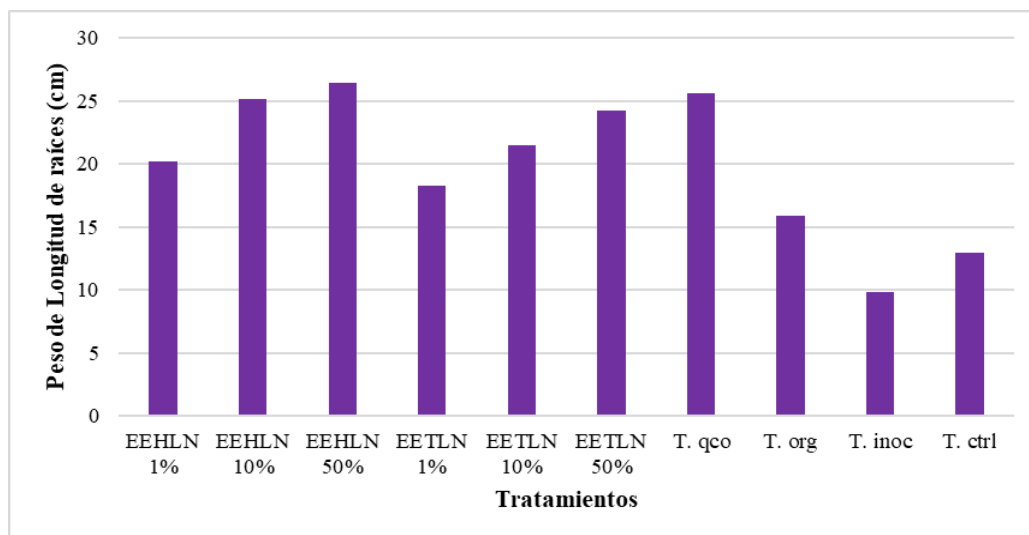
Extracto	Concentración (mg/mL)	Porcentaje de mortandad (%)	Logaritmo de la concentración	Concentración Letal Media (mg/mL)
Etanólico	100	94	2	0.806360234
	50	88	1.698970004	
	10	73	1	

3.4.2. Determinación del efecto potenciador de crecimiento de las plantas del tomate



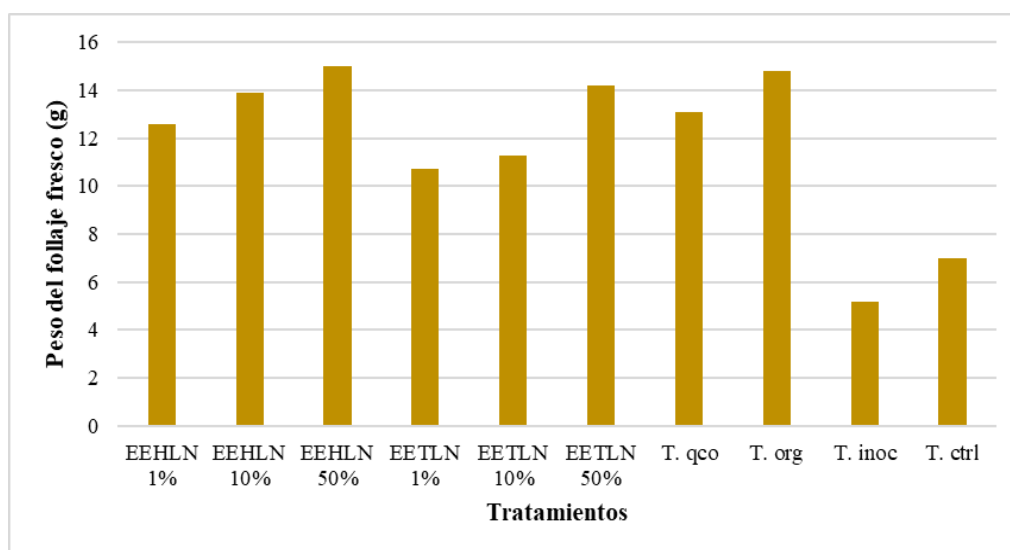
*EEHTLS: Extracto etanólico de hojas de *Lessonia nigrescens*, *EETLS: Extracto etanólico de talos de *Lessonia nigrescens*, *T. qco: Testigo químico, *T. org: Testigo orgánico, *T. inoc: Testigo inoculado, *T.ctrl: Testigo control.

Figura 18. Resultados del peso de las raíces de tomate (g) que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico.



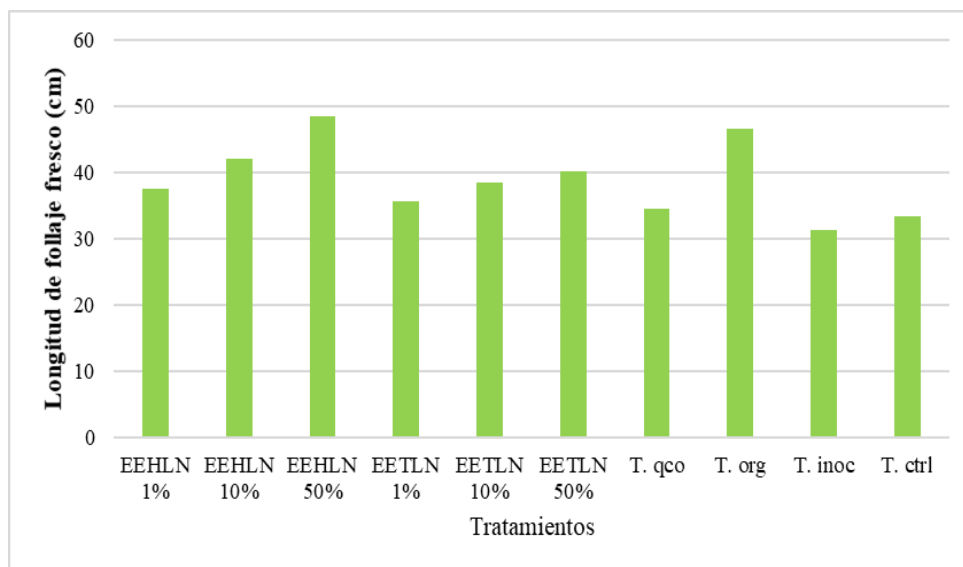
*EEHTLS: Extracto etanólico de hojas de *Lessonia nigrescens*, *EETLS: Extracto etanólico de talos de *Lessonia nigrescens*, *T. qco: Testigo químico, *T. org: Testigo orgánico, *T. inoc: Testigo inoculado, *T.ctrl: Testigo control

Figura 19. Resultados de la longitud de las raíces de tomate que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico.



*EEHTLS: Extracto etanólico de hojas de *Lessonia nigrescens*, *EETLS: Extracto etanólico de talos de *Lessonia nigrescens*, *T. qco: Testigo químico, *T. org: Testigo orgánico, *T. inoc: Testigo inoculado, *T.ctrl: Testigo control

Figura 20. Resultados del peso del follaje fresco de tomates que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico.



*EEHTLS: Extracto etanólico de hojas de *Lessonia nigrescens*, *EETLS: Extracto etanólico de talos de *Lessonia nigrescens*, *T. qco: Testigo químico, *T. org: Testigo orgánico, *T. inoc: Testigo inoculado, *T.ctrl: Testigo control

Figura 21. Resultados de la longitud del follaje fresco de tomates que fueron evaluados al finalizar el tratamiento con los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens* (hojas y talos) en diferentes concentraciones testigo químico y testigo orgánico.

IV. DISCUSIÓN

La macroalga parda *Lessonia nigrescens* presenta metabolitos secundarios con acción nematocida tales como saponinas, flavonoides y triterpenos teniendo efecto inhibitorio en la eclosión de los huevos del nematodo *Meloidogyne spp*³³. Por otro lado, también actúan como reguladores de crecimiento de las plantas cuando se encuentran bajo condiciones de estrés produciendo un mayor rendimiento y productividad en los cultivos.³⁴

Los resultados del extracto etanólico del alga *Lessonia nigrescens* sobre el nematodo *Meloidogyne spp* han demostrado que presentan actividad nematocida siendo las hojas, parte del alga con mayor efecto, debido a que a baja y mediana concentración (1 y 50 %) produjo una tasa de mortandad mayor al 50% siendo superior al extracto etanólico de talos de *L. nigrescens*, por otro lado, en los resultados obtenidos en el bioensayo con las plantas de tomate, el extracto de hojas al 50% coinciden con el ensayo anterior, demostrando así que tiene mayor efecto nematocida sin presentar diferencia estadística significativa con los testigos químico y orgánico. Estudios similares efectuados por Mirella Romero-Bastidas et al (2022) en 3 macroalgas, siendo una de ellas un alga parda de la clase *Phaeophyceae* (*Sargassum spp*), misma clase perteneciente a *L. nigrescens*, encontraron que el *Sargassum spp* a una dosis de 3000 ppm tuvo un mayor efecto nematocida. Asimismo, en el *Sargassum spp* y *Lessonia nigrescens* se identificaron los siguientes metabolitos secundarios: terpenos, saponinas y grupos fenólicos; compuestos que están en abundancia y a los que atribuyen diversas actividades biocidas³⁵. Estos resultados son concordantes con los obtenidos en nuestra investigación.

Por otro lado, los resultados obtenidos en esta investigación se determinó que las hojas de *Lessonia nigrescens* (alga parda) presentan un mayor efecto nematocida y un crecimiento foliar considerable en las plantas de tomate, teniendo similitud con los estudios de Diana SS Ibrahim et al (2021), concluyó que los extractos metanólicos de las algas *Phacelocarpus tristichus* (alga roja) y *Turbinaria ornata* (alga parda) mejoraron los parámetros de crecimiento y manifestaron actividades nematocidas contra *Meloidogyne incognita*, siendo el alga parda el que presenta mayor efectividad; así como Galindo Ruth (2011) con las algas *Colpemenia sinuosa*, *Gracilaria lemaneiformis* y *Ulva papenfussii* redujeron los nódulos en las raíces de tomate infestadas, confirmando la propiedad de estas algas marinas (pardas, rojas y verdes) de inhibir el crecimiento de las especies *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne spp*.

Cabe mencionar que Ping Zhou et al (2019) y Cruzado-Campos Jackeline (2021) realizaron una investigación sobre el efecto bioestimulante de *Lessonia nigrescens* teniendo una respuesta significativa en el rendimiento de los cultivares, esto coincide con los extractos etanólicos de *Lessonia nigrescens*, alga en estudio, que ha presentado un efecto de aplicación foliar teniendo una respuesta significativa en el rendimiento en las plantas de tomate.

Para la determinación de la CL50 de los ensayos in vitro, se evidenció que el extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* posee una mayor efectividad nematicida, debido a que los componentes se consideran biológicamente activos cuando los valores de CL50 expresados en $\mu\text{g/L}$ son inferiores a 1000 ppm.

Asimismo, en las pruebas de bioensayo con las plantas de tomate, CL50 muestra que el extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* posee una importante actividad contra el *Meloidogyne spp.*

V. CONCLUSIONES

Teniendo los resultados completos, se llegaron a las siguientes conclusiones:

Con respecto a los ensayos in vitro:

- El alga *Lessonia nigrescens* presenta efecto nematocida sobre el nematodo *Meloidogyne spp.*
- Los extractos etanólicos (hojas y talos) a la concentración del 100% produjeron el 100% de mortandad en los nematodos J2 (juveniles estadio 2), a concentraciones de 50% se obtuvo una mortandad de 70.2 % para el extracto de talos y 96.4% para el extracto de hojas.
- Se han identificado en el alga *Lessonia nigrescens* los siguientes metabolitos secundarios: triterpenos, saponinas (solo hojas), flavonoides, aminoácidos, grupos fenólicos, catequinas y antraquinonas (solo talos).
- Con respecto al bioensayo de las plantas de tomate, el extracto etanólico de las hojas de *Lessonia nigrescens* presenta mayor efecto nematocida sobre *Meloidogyne spp.* a la concentración del 50% observándose un mayor crecimiento en raíces y follajes frescos.
- La CL 50 obtenido del extracto etanólico de hojas de *Lessonia nigrescens* fue de 0.806mg/mL demostrándose la efectividad nematocida sobre el nematodo *Meloidogyne spp.*
- Los efectos biométricos obtenidos de las plantas de tomate, indican que este extracto es un buen potenciador del crecimiento de las mismas

VI. RECOMENDACIONES

- Proceder a la continuación de estudios similares para el control de nematodos haciendo uso de otras especies de algas marinas.
- Continuar con la investigación haciendo uso de extractos metanólicos y acuosos del alga en estudio y verificar la efectividad de los mismos.
- Realizar estudios comparativos de los efectos que pueden presentar los extractos de algas marinas, extractos botánicos y/o aceites esenciales contra el nematodo *Meloidogyne spp*, teniendo en cuenta su realización en diferentes estaciones del año y condiciones climatológicas.
- Tomar en consideración para la medida del control del nematodo agallador, las características principales del mismo, tales como: morfología, adaptación, comportamiento, ciclo de vida, aspectos climatológicos y plantas con mayor susceptibilidad en infestación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Callupe Francisco, Carrasco Sergio. Caracterización del departamento de Ica. Banco Central de Reserva del Perú Sucursal Huancayo: Dpto. Estudios Económicos; 2021. Disponible en: <https://www.bcrp.gob.pe/docs/Sucursales/Huancayo/ica-caracterizacion.pdf>
2. Espino Caballero Ricardo Florentino. Nematología Agrícola Texto Guía. consulta de nematología agrícola para estudiantes y agricultores. Universidad Nacional San Luis Gonzaga, Facultad de Agronomía, Departamento Académico de sanidad vegetal.2018. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/383076633/Libro-Papa-v1-180402-Imp-02-Abr-2018-Empaste>.
3. Vilchis-Martínez Kathia *, Manzanilla-López Rosa Helena, John Powers Stephen, Montes Belmont Roberto. Efecto de extractos vegetales en crudo en el parasitismo de *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* sobre *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* Vol. 43, No. 2, 2013. Disponible en: <https://journals.flvc.org/nematropica/article/view/82716>
4. Sepúlveda Jiménez, Gabriela; Porta Ducoing, Helena; Rocha Sosa, Mario. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, núm. 3, diciembre, 2003, pp. 355-363. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
5. Surindar P, Tarjan A, Hodgson L. Effective Use of Marine Algal Products in the Management of Plant-Parasitic Nematodes 1. *Journal of Nematology* 19(2):194-200. 1999. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2618630/pdf/194.pdf>
6. Ibrahim, D., Ghareeb, R., Abou El Atta, D., Azouz, H. Propiedades nematocidas de extractos metanólicos de dos algas marinas contra el nematodo agallador de la raíz del tomate, *Meloidogyne incognita*. *Revista de Patología y Protección Vegetal*, 2021; 12(2): 137-144. Disponible en: https://jppp.journals.ekb.eg/article_154414_dff8cd89d7f1896ccc3caa52881e88be.pdf
7. Ping Zou, Xueli Lu, Hongtao Zhao, Yuan Yua, Lei Meng, Chengsheng Zhang, et al. Polysaccharides Derived From the Brown Algae *Lessonia nigrescens* Enhance Salt Stress Tolerance to Wheat Seedlings by Enhancing the Antioxidant System and Modulating

Intracellular Ion Concentration. *Front. Plant Sci.* 2019 Enero; 10:48. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.00048/full>

8. El-Eslamboly, AASA, Abd El-Wanis, MM & Amin, AW. Aplicación de algas como método de control biológico del nematodo agallador *Meloidogyne incognita* en pepino en condiciones de cultivo protegidas y su impacto en el rendimiento y la calidad de la fruta. *Egipto J Biol Pest Control* **29**, 18 (2019). Disponible en: <https://ejbpc.springeropen.com/articles/10.1186/s41938-019-0122-z>
9. Chao Zhao, Chengfeng Yang, Mingjun Chen, Xucong Lv, Bin Liu, Lunzhao Yi, et al. Regulatory Efficacy of Brown Seaweed *Lessonia nigrescens* Extract on the Gene Expression Profile and Intestinal Microflora in Type 2 Diabetic Mice. *Molecular nutrition Food Research*. 2018 febr. 62(4). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mnfr.201700730>
10. Iler Iler Diana Carolina. Evaluación de la actividad nematocida in vitro de aceites esenciales frente a *Meloidogyne*. Tesis para optar el título de Ingeniera Bioquímica. Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. 2017.49 p. Disponible en: <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/26608>
11. Martinotti Marcelo Diego, Castellanos Sergio Juan, González Roxana, Camargo Alejandra, Fanzone Martin. Efecto Nematicida de extractos de ajo, orujos de uva y alperujo de aceituna; sobre *Meloidogyne incognit*, en vid, cv Chardonnay. *Rev. Fac. Cien. Agrar., Univ. Nac. Cuyo*. [Internet]. 2016 Jun [Recuperado 2022 abril 04]; 48 (1): 211-224. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttex&pid=S1853-86652016000100015
12. Lima-Medina Israel, Bravo Rosario Y., Aguilar-Gómez María I. Nemátodos fitoparásitos asociados al cultivo de Maiz (*Zea mais L.*) en las regiones de Puno y Cusco. *Rev. Investiga. Altoandin.* [Internet]. 2018 Ene [citado 2022 Abr 04]; 20(1): 31-38. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.pphp?script=sci_arttext&pid=S2313-29572018000100004&Ing=es. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2018.328>.
13. Lima-Medina Israel*; Bravo-Portocarrero Rosario Ysabel, Mamani-Cano Zhyla Danitza. Nemátodos fitoparásitos asociados al cultivo de quinua en la región de Puno-Perú. *Rev. Investig. Altoandin.* [Internet]. 2019 Oct [citado 2022 Abr 04]; 21 (4): 257-263. Disponible

en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci:_arttext&pid=S2313-29572019000400003&Ing=es. <http://dx.doi.org/10.18271/ria.2019.502>

14. Cruzado Campos Jacqueline Milagros. Aplicación foliar de algas marinas en el Rendimiento y la calidad en dos cultivares de melón (*Cucumis melo L.*) en la Molina. Tesis para optar el título de Ingeniera Agrónoma. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú 2021. 213 p. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/4856/cruzado-campos-jacqueline-milagros.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
15. Solier Allcca Sonia. Rimache Allcca Wilson. Efecto de la aplicación foliar de tres fuentes de algas marinas en diferentes dosis en el cultivo de Sandí (*Citrullus lanatus L.*), híbrido Santa Amalia en la zona media del valle de Ica. Tesis para optar el título de Ingeniero agrónomo. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica, Perú. 2019. 49 p. Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/items/53ddf193-b00c-4b74-8a73-6423568a2ee9>
16. Huaroto Palacios Lorena. Valdivia Pillaca Maria. *Efectividad Nematicida de Paecilomyces lilacinus* sobre el cultivo de *Vitis vinifera* y *Capsicum annum*, infestados con *Meloidogyne spp.* “Nematodo del Nódulo” Mayo a Agosto del 2018. Tesis para optar el título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica, Perú. 2018. 45 p. Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/items/0d851536-2c00-4077-9b7f-10145ed45c55>
17. Galindo Camacho Ruth Milagros. Efecto nematicida in vitro y en plantas de tomate de algas marinas *Colpomenia sinuosa*, *Gracilariopsis lemaneiformis* y *Ulva papenfussii* de la Bahía de Paracas sobre *Meloidogyne incognita*. Tesis para optar el título de Químico Farmacéuticos, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica, Perú. 2011. 49 p. Disponible en: Repositorio de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.
18. Varas Huaroto Noemí. Evaluación de la efectividad de extracto de *Bidens pilosa L.* para el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en *Lycopersicon esculentum* variedad Rio Grande tomate in vitro y el tinglado en el Valle de Ica. Tesis para optar el título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional San Luis Gonzaga. Ica,

Perú. 2011. 78 p. Disponible en: Repositorio de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.

19. Aragón B, Castillo R, Zavala J. Estudios sobre macroalgas pardas en el sur del Perú 2011 – 2015. Inst del mar del Perú. 2012; 1(1): p. 61-65. Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12958/2179>
20. Carbajal Patricia, Gamarra Alex. Guía para recolección y reconocimiento de macroalgas pardas comerciales del Perú. Instituto del Mar del Perú. Vol. 45 / No.2 / Abril - Junio 2018. Disponible en: <https://repositorio.imarpe.gob.pe>.
21. Arenas María. Determinación de los parámetros tecnológicos para la obtención de alginato de sodio a partir de aracanto (*Lessonia nigrescens*). Tesis de Título profesional Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2016. Disponible en: <https://repositorio.unsa.edu.pe/items/4674c5ad-78cc-4aea-9d8f-b869f9531798>
22. Ruiz A. Viabilidad en el desarrollo de esporas de *Lessonia nigrescens* bory en relación a estacionalidad y procedencia, norte y sur de Chile. Tesis de grado para optar al título de Ingeniero en Acuicultura. Puerto Montt: Universidad Austral de Chile; 2012. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2012/bpmfpr934v/doc/bpmfpr934v.pdf>
23. Castro R, Zabaleta A. Programa en “BASIC” para el cálculo de DL50 por el método de Probit. Rev. Perú. med. exp. salud pública v.15 n.1-2 Lima ene./dic. 1998. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46341998000100009
24. Celis Álvaro, Mendoza F Cristina, Pachón Marco Eduardo. Uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas, enfermedades y arvenses. Rev. Temas Agrarios. 2018 Marzo. 14 (1), 5-16. Disponible en: <https://doi.org/10.21897/rta.v14i1.1205>
25. Santamaría Celia, Martín-González Ana, Astorga Federico. Extractos vegetales en la aplicación para la reducción del estrés. European Natural Additives. Bedson Europ Marzo 2015. Disponible en: <https://nutrinews.com/download/0315-ena-WEB.pdf>
26. Villar A. Farmacognosia General. Madrid: Editorial Síntesis; 1999. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/348922895/Farmacognosia-General-Villar-Del-Fresno>.

27. Frías María, Rosales Martha. Farmacognosia: Principios básicos. Universidad Juárez del Estado de Durango. 2023 Disponible en: https://books.google.es/books?id=zw73EAAAQBAJ&dq=tipos+de+extracci%C3%B3n+farmacognosia&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
28. Nuñez Carlos. Extracciones con equipo Soxhlet. (cenunez.com.ar. 2008). Disponible en: <https://www.studocu.com/latam/document/universidad-de-carabobo/quimica-organica/extraccion-con-equipo-soxhlet/8968500>.
29. Sgariglia Melina, Soberon José, Sampietro Diego, Vattuone Marta. Cromatografía conceptos y aplicaciones. Arakuku. 2010. Disponible en: https://ri.conicet.gov.ar/bitstream/handle/11336/75465/CONICET_Digital_Nro.3655a360-b03b-44c8-8519-bc747d073f7c_A.pdf?sequence=2&isAllowed=y
30. Daniel, W. Bioestadística, base para el análisis de las ciencias de la salud. 4° ed. México: Editorial Limusa S.A; 2007. Disponible en: <https://www.estadisticaparalainvestigacion.com/wp-content/uploads/2019/03/Bioestad%C3%ADstica-de-Daniel-Wayne.pdf>
31. Hussey R, Barker K. A comparison of methods of collecting inoculate of *Meloidogyne spp.* including a new technique. Plant Dis. Repr 1973; 57:1025-1028. Disponible en: <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19740810950>
32. Bravo Ramos Carmen. Saravia Chaiña Milagros. Efecto Antimicrobiano in vitro del extracto de *Lessonia nigrescens* (ARACANTO) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Cándida albicans*. Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú. 2019. 113p. Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/ba956292-5084-41a5-9272-53d54ad82697>
33. Huamani TicllaHuanaco Edgar. Extractos vegetales para el control del nematodo nodulador de la raíz *Meloidogyne incognita*, Kofoid y White 1919, Chitwood 1949. Tesis para optar Título Profesional de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 2022. 96p. Disponible en: <https://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12996/5461/huamani-ticllahuanaco-edgar.pdf?sequence=3&isAllowed=y>

34. Hamed SM, El-Rhman AA, Abdel-Raouf N, Ibraheem BM (2018) Role of marine macroalgae in plant protection & improvement for sustainable agriculture technology. Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences 7: 104-110. Disponible en: DOI: 10.1016/j.bjbas.2017.08.002.

35. Mirella Romero-Bastidas et al. Macroalgas sobre la eclosión de huevecillos de *Meloidogyne incognita* y como bioestimulante en albahaca. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 9(3): e3404. Disponible en: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-90282022000300013&lng=es&nrm=iso.

VIII. ANEXOS

ANEXO N° 1

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional"

El Biólogo. Que suscribe determina que la muestra biológica presentada por el bachiller en Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga **OCHOA LIZARZABURO Ariana Del Carmen** con DNI N° 73126375, para su determinación pertenece al nombre científico de ***Lessonia nigrescens*** Bory De Sant-Vincent: "arcanto negro", según Sistema de Clasificación de Guiry, M.D. & Guiry, G.M. (2018)

REINO: PROTISTA

DIVISIÓN: OCHROPHYTA

CLASE: PHAEOPHYCEAE

ORDEN: LAMINARIALES

FAMILIA: LESSONIACEAE

GÉNERO: *Lessonia*

ESPECIE: ***Lessonia nigrescens*** Bory de Sant-Vincent

N.V. "arcanto negro"

Se emite la presente certificación a solicitud del interesado, para fines de estudios

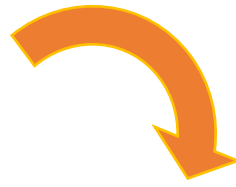
Ica, 02 de noviembre del 2022.




.....
Dr. Miranda Huamán David Máximo
BIÓLOGO
CBP. 3681

ANEXO N° 2

Lavado



Secado



Cortado



ANEXO N° 3

Extracción por Maceración



Extracción de Soxhlet



Concentración del solvente



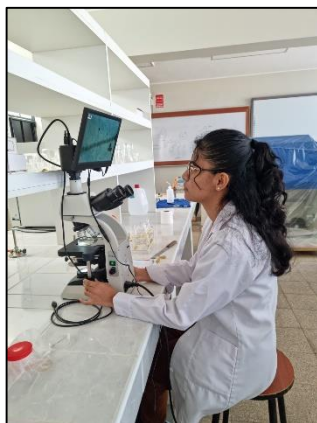
ANEXO N° 4



Fundo con parcelas infestadas



Pesamos 50 cc de tierra



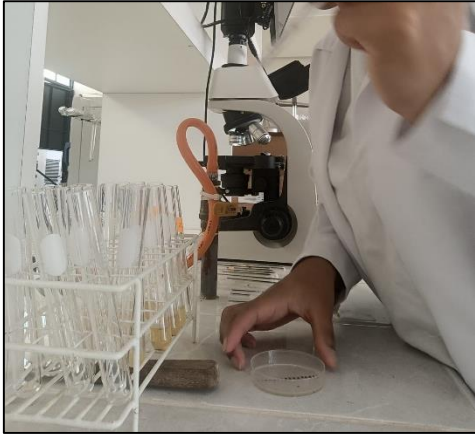
Identificación y conteo de *M. spp*
(J2)

48 horas



Colocar una capa de papel toalla sobre el tamiz de plástico y adicionar la tierra

ANEXO N° 5



Tubos de ensayos con los extractos a probar



Transferencia de 100 individuos de *M. spp J2* a cada tubo de ensayo



Conteo definitivo y verificación de resultados



24 horas



Permanencia en contacto con los tratamientos por 24 horas



1er conteo de individuos en posición de "rigor mortis"



Transferencia a tubos de ensayo conteniendo agua potable por un espacio de 24 horas

ANEXO N° 6



Raíces con nódulos



Corte en trozos y pesamos 10 g



Trasvase a la licuadora, se añadió hipoclorito de sodio 0,5 % y trituramos en 3 tiempos de 15 seg. cada uno

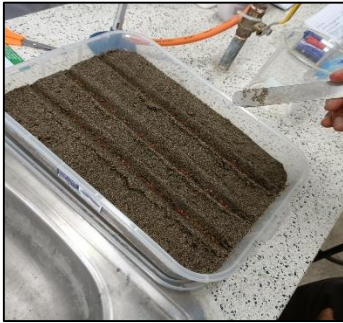


Enrasamos a 100 ml con agua potable para la identificación y conteo de Huevos de *M. spp*/mL



Tamizamos y enjuagamos con agua potable

ANEXO N° 7



Siembra de semillas



Trasplante de plantines de tomate a macetas de 1 kg



Infestación de 1000 huevos de M.spp



Trasplante a raíz desnuda a macetas de 2 Kg



1era aplicación de tratamientos



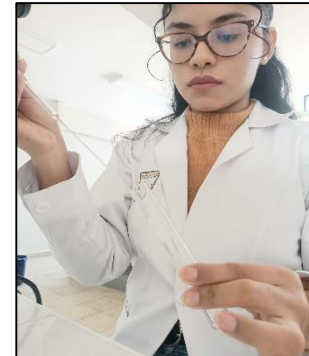
Evaluación N°1 de población



2da aplicación de tratamientos



Evaluación N° 2 de población



3era aplicación de tratamientos



Toma de datos biométricos (pesaje)



Toma de datos biométricos (medición)



Evaluación N° 3 de población



Universidad Nacional "SAN LUIS GONZAGA"
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Comisión de Grados Académicos y Títulos Profesionales



FORMATO N°06

CARTA DE CONFORMIDAD DEL ASESOR DE TESIS

Ica, 12 de Julio de 2024.

Señor(a)

Felipe Artemio Surco Laos

Decano (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional "San Luis Gonzaga"
Presente.

De mi consideración:

Previo cordial saludo, por intermedio de la presente hago de su conocimiento que, en mi condición de ASESOR(A) de la TESIS titulada **Efectividad Nemática in Vitro del alga marina *Lessonia nigrescens* sobre el nematodo *Meloidogyne spp* en plantas de *Solanum lycopersicum* en el distrito de Ica**, presentada por la asesorada **Ariana Del Carmen Ochoa Lizarzaburo** para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, ésta se encuentra en condiciones aptas para su presentación y sustentación de acuerdo al reglamento vigente, por lo que doy mi **CONFORMIDAD**. Así mismo asumo mi responsabilidad de asesor, indicando que he tenido cuidado de preservar los estándares de calidad correspondientes, de prevenir el plagio y proteger los derechos de autor, de acuerdo al D. L. N. ° 822- Ley sobre el Derecho de Autor. Asimismo, declaro tener conocimiento de los efectos legales y administrativos que se deriven del incumplimiento o falsedad de la presente declaración, previsto en el artículo 411 del Código Penal y del artículo 32.3 de la Ley 27444, Ley de procedimiento Administrativo General. Lo que informo a Usted para la continuación de los trámites correspondientes.

Ica, 12 de Julio del 2024

Santos Haydee Chávez Orellana
Asesora

Nombres y Apellidos: Santos Haydee Chávez Orellana
Correo Institucional: haydee.chavez@unica.edu.pe
Celular: 956 696 923



Universidad Nacional "SAN LUIS GONZAGA"
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Comisión de Grados Académicos y Títulos Profesionales



FORMATO N°06

CARTA DE CONFORMIDAD DEL ASESOR DE TESIS

Ica, 12 de Julio de 2024.

Señor(a)

Felipe Artemio Surco Laos

Decano (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Nacional "San Luis Gonzaga"
Presente.

De mi consideración:

Previo cordial saludo, por intermedio de la presente hago de su conocimiento que, en mi condición de **ASESOR** de la **TESIS** titulada **Efectividad Nematicida in Vitro del alga marina *Lessonia nigrescens* sobre el nematodo *Meloidogyne spp* en plantas de *Solanum lycopersicum* en el distrito de Ica**, presentada por la asesorada **Ariana Del Carmen Ochoa Lizarzaburo** para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico, ésta se encuentra en condiciones aptas para su presentación y sustentación de acuerdo al reglamento vigente, por lo que doy mi **CONFORMIDAD**. Así mismo asumo mi responsabilidad de asesor, indicando que he tenido cuidado de preservar los estándares de calidad correspondientes, de prevenir el plagio y proteger los derechos de autor, de acuerdo al D. L. N. ° 822- Ley sobre el Derecho de Autor. Asimismo, declaro tener conocimiento de los efectos legales y administrativos que se deriven del incumplimiento o falsedad de la presente declaración, previsto en el artículo 411 del Código Penal y del artículo 32.3 de la Ley 27444, Ley de procedimiento Administrativo General. Lo que informo a Usted para la continuación de los trámites correspondientes.

Ica, 12 de Julio del 2024

Ricardo Florentino Espino Caballero
Asesor

Nombres y Apellidos: Ricardo Florentino Espino Caballero
Correo Institucional: ricardofespino@hotmail.com
Celular: 956 626 542