

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO ASCOCHYTA EN
ARVEJA (*Pisum sativum*) AL JUGO DE FIQUE (*Furcraea gigantea*)
PASTEURIZADO**

DIEGO FERNANDO MEJÍA ESPAÑA

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS
AREA DE ENFASIS PRODUCCION DE CULTIVOS
SAN JUAN DE PASTO
2012**

**EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL COMPLEJO ASCOCHYTA EN
ARVEJA (*Pisum sativum*) AL JUGO DE FIQUE (*Furcraea gigantea*)
PASTEURIZADO**

DIEGO FERNANDO MEJÍA ESPAÑA

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Magister
en Ciencias Agrarias con Énfasis en Producción de Cultivos**

**Director de trabajo:
OSWALDO OSORIO MORA IAI. Esp., Ph.D**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
MAESTRIA EN CIENCIAS AGRARIAS
AREA DE ENFASIS PRODUCCION DE CULTIVOS
SAN JUAN DE PASTO**

2012

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1° del Acuerdo n° 324 de octubre 11 de 1966 emanado del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño.

NOTA DE ACEPTACION

CLAUDIA SALAZAR GONZÁLEZ. I.A. MSc.
Jurado delegado

JESÚS ROMO RAMOS. Qco. MSc.
Jurado

ERNESTO LUQUE. Qco. M.Sc.
Jurado

OSWALDO OSORIO MORA IAI. Esp., Ph.D
Presidente

San Juan de Pasto, Septiembre de 2012

Dedicado a:

A mi esposa y mi hija,

A mis padres

A mis hermanos

A mis amigos

A mis compañeros de trabajo en el Grupo TEA

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR)

Vicerrectoría de Investigaciones, Postgrados y Relaciones Internacionales de la Universidad de Nariño.

Grupo de Investigación Tecnologías Emergentes en Agroindustria, de la Universidad de Nariño.

Facultad de Ingeniería Agroindustrial de La Universidad de Nariño

Oswaldo Osorio Mora, IAI, Esp., PhD.

Claudia Salazar González. I.A., Msc.

Jesús Romo Ramos. Qco., MSc

Ernesto Luque. Qco., M.Sc.

Oscar Checa Coral, IA, PhD.

Carlos Betancourth García, IA., MSc.

A todas las personas que con su apoyo desinteresado aportaron sus conocimientos a esta investigación.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	17
1. MARCO TEORICO	19
1.1 ASPECTOS GENERALES	19
1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA DE FIQUE (<i>Furcraea gigantea</i>).....	21
1.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL JUGO DE FIQUE	22
1.4 SAPONINAS ESTEROIDALES	24
1.4.2.2 Identificación de saponinas por HPLC	28
1.4.2.3 Estudios de cromatografía de sapogeninas en fique.	29
1.5 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS SAPONINAS Y SAPOGENINAS PRESENTES EN EL JUGO DE FIQUE	30
1.6 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE JUGOS VEGETALES TRATADOS TÉRMICAMENTE	34
1.7 LA MANCHA DE ASCOCHYTA, TIZÓN O AÑUBLO DE LA ARVEJA....	35
1.7.2 Taxonomía de los hongos causales de la enfermedad.....	36
1.7.3 Identificación de los hongos causales de la enfermedad mancha de Ascochyta	37
1.7.4 Diferenciación de los síntomas en campo de los hongos causales de la enfermedad.....	38
1.7.5 Transmisión de la enfermedad	39
1.7.6 Control de la enfermedad	40
1.8 IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS PEROXIDASA (POD) Y POLIFENOL OXIDASA (PPO) EN LOS PROCESOS DE PASTEURIZACIÓN.....	41
1.9 TEMPERATURAS DE INACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS PEROXIDASA Y POLIFENOLOXIDASA	45
1.10 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE POD Y PPO	47
2. DISEÑO METODOLÓGICO	49
2.1 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA.....	49
2.2 OBTENCIÓN DEL JUGO DE FIQUE.	49

2.3	METODOLOGÍA PARA LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS	50
2.3.1	Tiempos y temperaturas usadas.	51
2.3.2	Diseño experimental.	51
2.4	PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA.....	52
2.5	MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RESIDUAL	53
2.5.1	Medición de Actividad Enzimática y Actividad Enzimática Específica de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO).	55
2.5.2	Medición de Actividad Enzimática Residual de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO) en el jugo tratado térmicamente	55
2.6	MEDICIÓN DE LOS CONTENIDOS DE SAPOGENINAS EN EL JUGO DE FIQUE POR HPLC	56
2.6.1	Hidrólisis	56
2.6.2	Purificación.	56
2.6.3	Método de medición	56
2.7	MEDICIÓN DE LA ACCIÓN INHIBITORIA DEL JUGO DE FIQUE <i>IN</i> <i>VITRO</i> Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	57
2.7.1	Aislamiento de <i>Ascochyta pisi</i> y <i>Mycosphaerella pinodes</i>	57
2.7.2	Medición de la acción inhibitoria del jugo de fique tratado térmicamente sobre el complejo <i>Ascochyta</i>	57
2.7.3	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad del bioinsumo de fique sobre el complejo <i>Ascochyta</i>	58
2.7.4	Diseño experimental.	58
2.7.5	Prueba de patogenicidad.....	59
2.7.6	Determinación de la concentración efectiva cincuenta	61
2.7.7	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	61
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
3.1	OBTENCIÓN DEL JUGO DE FIQUE	62
3.2	MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PEROXIDASA (POD) Y POLIFENOLOXIDASA (PPO)	62
3.2.1	Medición de Actividad Enzimática del Testigo (jugo sin tratamiento).	63

3.2.2	Medición de Actividad Enzimática y Actividad Enzimática Específica de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO).	64
3.2.3	Medición de Actividad Enzimática Residual de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO) en el jugo tratado térmicamente.	66
3.2.4	Análisis del diseño experimental	75
3.3	PRUEBAS DE CONSERVACIÓN DEL JUGO DE FIQUE	82
3.4	MEDICIÓN DE LOS CONTENIDOS DE SAPOGENINAS EN EL JUGO DE FIQUE POR HPLC	86
3.5	MEDICIÓN DE LA ACCIÓN INHIBITORIA DEL JUGO DE FIQUE <i>IN VITRO</i> Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	90
3.5.1	Aislamiento de <i>Ascochyta pisi</i> y <i>Mycosphaerella pinodes</i>	90
3.5.2	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad del bioinsumo de fique sobre el complejo <i>Ascochyta</i>	92
3.5.3	Cálculo de la Concentración Efectiva 50 (EC50) para el día 8 de evaluación.....	98
3.5.4	Cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (MI) <i>in vitro</i> sobre el complejo <i>Ascochyta</i>	99
3.5.5	Prueba de patogenicidad.....	104
4.	CONCLUSIONES	114
5.	RECOMENDACIONES.....	116
	BIBLIOGRAFÍA.....	117
	ANEXOS	136

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del fique var. Tunosa Común (<i>Furcraea gigantea</i>).....	22
Tabla 2. Caracterización físico química del jugo de fique	23
Tabla 3. Resumen del Diseño Experimental Factorial Multinivel para los Tratamientos Térmicos.....	51
Tabla 4y5. Rendimiento de jugo de fique	62
Tabla 6y7. Resultados de la regresión no lineal de primer orden para POD y PPO	72
Tabla 8. Análisis de Varianza para regresión de primer orden.....	73
Tabla 9. Análisis de Varianza para Actividad Residual de POD.....	75
Tabla 10. Prueba de Tukey para Actividad Residual de POD con respecto a Temperatura	75
Tabla 11. Prueba de Tukey para Actividad Residual de POD con respecto a tiempo	76
Tabla 12. Respuesta optimizada para AR POD	77
Tabla 13. Prueba de comparación de medias de Tukey para Actividad Residual de POD con respecto a tiempo y temperatura.....	77
Tabla 14. Análisis de Varianza para Actividad Residual de PPO.....	78
Tabla 15. Prueba de comparación de medias de Tukey para Actividad Residual de PPO con respecto a Temperatura	79
Tabla 17. Prueba de comparación de medias de Actividad Residual de PPO con respecto a tiempo y temperatura	80
Tabla 18. Respuesta óptima para AR PPO	81
Tabla 19. Optimización de Múltiples Respuestas para Actividad Residual de las enzimas POD y PPO.....	81
Tabla 20. Reportes cromatográficos para medición de hecogenina	87
Tabla 21. Contenido de hecogenina medido por HPLC en dos muestras de jugo de fique pasteurizado	87

Tabla 22.	Contenido de hecogenina en jugo de fique fresco, fermentado y pulverizado mediante HPLC	88
Tabla 23.	Resultados de porcentaje de crecimiento promedio de <i>Ascochyta</i> en medio enmendado con jugo de fique a diferentes dosis – Día 8.....	96
Tabla 24.	ANAVA crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Ascochyta</i> para el día 8 de evaluación	96
Tabla 25.	Prueba de medias de Tukey para %crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Ascochyta</i> durante el día 8 de evaluación	97
Tabla 26.	Porcentaje de crecimiento promedio de <i>Ascochyta</i> en medio enmendado con jugo de fique a diferentes dosis evaluado el día 8..	97
Tabla 27.	Análisis de varianza para cálculo de la MI del bioinsumo de fique contra <i>Ascochyta in vitro</i>	101
Tabla 29.	Clasificación de los tratamientos para el ensayo de patogenicidad	104
Tabla 30.	ANAVA porcentaje de inhibición para ensayo de patogenicidad	107
Tabla 31.	Prueba de medias de Tukey para el ensayo de patogenicidad al día 8 de evaluación	108
Tabla 32.	% de crecimiento del patógeno al día 8 de evaluación – Interpretación de los resultados.....	108
Tabla 33.	Escala de patogenicidad de <i>Ascochyta</i>	113

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Fig.1.	Estructura de una saponina y una sapogenina esteroideal. Fuente: Sparg <i>et al.</i> , (2004).....	24
Fig 2.	Daño producido por <i>Ascochyta</i> en vainas de arveja.	36
Fig 3.	Daño producido por <i>Ascochyta</i> en hojas de arveja.	36
Fig 4.	Esporas de <i>Ascochyta</i>	38
Fig 5.	Esporas de <i>Ascochyta</i> aisladas de cultivo <i>in vitro</i>	38
Fig. 6.	Ciclo de la enfermedad <i>Ascochyta pisi</i>	39
Fig 7y8.	Ecuación estructural de la reacción de la peroxidasa. Fuente: Schmidt and Pennacchiotti, 2001.....	42
Fig 9.	Reacciones de (a) hidroxilación y (b) oxidación catalizadas por PPO. Fuente: Queiroz <i>et al.</i> , 2008.....	44
Fig. 10.	Diagrama de flujo de la metodología	49
Fig 11.	Equipo utilizado para la extracción de jugo de fique.	50
Fig 12.	Centrífuga refrigerada.....	52
Fig 13.	Extracto enzimático.....	53
Fig 14.	Espectrofotómetro utilizado en la medición de actividad enzimática.....	54
Fig 15.	Cálculo de la Actividad enzimática.	54
Fig. 16.	Desarrollo de la metodología de la herida para prueba de patogenicidad	60
Fig. 17.	Reacción de peroxidasa para un tratamiento a 70°C.....	66
Fig. 18.	Reacción de polifenoloxidasas para un tratamiento a 70°C.....	66
Figura 19.	Pruebas de vida útil durante el almacenamiento de jugo de fique pasteurizado	83
Figura 20.	Fotos de aislamientos de <i>Ascochyta</i>	90
Figura 21.	Esporas aisladas de los cultivos de <i>Ascochyta</i>	91
Figura 22.	Fotografías de crecimiento micelial de <i>Ascochyta</i> sobre vainas	105
Figura 22.	Fotografías de crecimiento micelial de <i>Ascochyta</i> sobre vainas (cont)	106

Figura 22. Fotografías de crecimiento micelial de *Ascochyta* sobre vainas
(cont)107

LISTA DE GRÁFICOS

	Pág.
Gráfica 1. Curvas de avance de las reacciones enzimáticas del jugo sin tratamiento.....	63
Gráfica 2. Curvas de avance de la reacción enzimática de POD	64
Gráfica 3. Curvas de avance de la reacción enzimática de PPO.....	65
Gráfica 4. Actividad Residual Enzimática de POD y PPO para distintos tratamientos.....	68
Gráfica 5. Actividad Residual de POD y PPO para todos los tratamientos y réplicas	70
Gráfica 6. Tendencia de inactivación térmica para POD.....	71
Gráfica 7. Regresión de primer orden para inactivación térmica de POD y PPO	73
Gráfica 8. Cromatogramas de hecogenina en jugo de fique tratado.....	86
Gráfica 9. Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>A. pisi</i> durante los días 3 a 8.....	92
Gráfica 10. %Crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Ascochyta</i> durante los días 3 a 8 – Resultados normalizados	93
Gráfica 11. Prueba de medias de Tukey para el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Ascochyta</i> durante los días 3 a 8 de evaluación.	94
Gráfica 11. Prueba de medias de Tukey para el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Ascochyta</i> durante los días 3 a 8 de evaluación (Cont).	95
Gráfica 12. Cálculo de la EC ₅₀ a nivel <i>in vitro</i> , sobre el complejo <i>Ascochyta</i> para el día 8 de evaluación	98
Gráfica 13. Evolución del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Ascochyta</i> en medio enmendado con bioinsumo de fique – Rango 2.....	100
Gráfica 14. Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Ascochyta</i> en medio enmendado con bioinsumo de fique para el día 8 – Rango 2.	102
Gráfica 15. Gráfica de Patogenicidad Regresión Lineal.....	110

RESUMEN

Se evaluó el comportamiento del jugo de fique pasteurizado como posible bioinsumo para el control de la enfermedad de *Ascochyta* en arveja. Se determinó que el tratamiento que inactivaba las enzimas peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PPO), causantes del pardeamiento del jugo de fique, hasta niveles aceptables de actividad residual de 10% y 14%, respectivamente, fue de 75°C por 210 segundos. Este tratamiento logró un tiempo de conservación de 9 días a temperatura ambiente y de 22 días en refrigeración.

El jugo pasteurizado no presentó cambios aparentes en su contenido de hecogenina, que se cuantificó en 117,86 mg/L y 27,5 mg/L mediante HPLC, extraído con metanol y acetonitrilo, respectivamente. Los resultados evidencian que el proceso de extracción con metanol es más eficiente para la separación y cuantificación de estas saponinas.

Los ensayos de actividad *in vitro* del bioinsumo pasteurizado contra *Ascochyta*, arrojaron una EC_{50} de 180,2 mg/L y una Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de 25.000 mg/L, estadísticamente igual ($p < 0,05$) al efecto de Benomyl en dosis de 1 g/L, medidos a los 8 días posteriores a la aplicación del tratamiento. En los ensayos de patogenicidad llevados a cabo sobre vainas desprendidas se encontró una EC_{50} de 716,08 mL/L, que fue estadísticamente igual al del control químico aplicado (Benomyl 1 g/L); ninguno de los tratamientos logró un control del 100% de crecimiento micelial del fitopatógeno, aunque el nivel de severidad de la enfermedad no superó el 5% del área de la vaina afectada, mostrando un importante efecto fungistático.

Los resultados muestran que el bioinsumo de fique puede considerarse como un potencial biofungicida con amplia proyección de uso en el cultivo de arveja como protectante.

ABSTRACT

The behavior of pasteurized sisal juice as possible bioproduct to control *Ascochyta* disease in pea was assessed. It was determined that juice treated at 75°C for 210 seconds, inactivated peroxidase (POD) and polifenoloxidasas (PPO) enzymes, responsible for browning of the sisal juice, to acceptable levels of residual activity of 10% and 14%, respectively. This treatment achieved 9 days at room temperature and 22 days in refrigeration conservation.

Pasteurized juice did not show apparent changes in hecogenina content, quantified as 117,86 mg/L and 27.5 mg/L by HPLC, extracted with methanol and acetonitrile, respectively. The results show that the process of methanol extraction is more efficient for the separation and quantification of these saponins.

Activity trials of *in vitro* activity of the pasteurized bioproduct against *Ascochyta*, exhibited an $EC_{50} = 180,2$ mg/L and a Minimum Inhibition Concentration (MIC) = 25,000 mg/L, equal ($p < 0,05$) to the effect of Benomyl in dose of 1 g/L, measured to 8 days following the application. Pathogenicity trials carried out on sloughed pods show an $EC_{50} = 716,08$ mL/L, which was statistically equal ($p < 0,05$) to chemical control applied (Benomyl 1 g/L); none of the treatments attained control of 100% of micelial growth of the pathogen, although severity level of the disease did not exceed 5% of the area of the pod affected, showing a significant fungistatic effect.

The results show that sisal bioproduct can be considered a potential biofungicide with wide projection for use in the cultivation of peas as protective.

INTRODUCCION

El cultivo de arveja en el Departamento de Nariño se destaca por ser uno de los principales cultivos andinos. Su producción en el año 2009 fue de 9.230 toneladas, cultivadas en 4.798 ha, con un rendimiento de 1,9 ton ha⁻¹, lo que corresponde a una participación del 18,43% en la producción nacional, ubicándose como el cuarto departamento del país. La tasa de crecimiento de la producción en los últimos 10 años ha sido del 9,64% (Agronet, 2011).

Una de las enfermedades más devastadoras para la producción de arveja en el mundo es la mancha de *Ascochyta*, provocada por acción del complejo *Ascochyta* spp., formado por los hongos fitopatógenos *Ascochyta pisi* y *Mycosphaerella pinodes* (Skoglund, *et al.*, 2011; Setti, *et al.*, 2011; McDonald y Peck, 2009).

Una infección severa con *M. pinodes* puede llegar a reducir los rendimientos hasta en un 50–75%, pero estos niveles de ataque son muy raros (Wang *et al.*, 2006). Otros autores reportan pérdidas en rendimiento de hasta 10% en Australia (Hollaway *et al.*, 2007); los más altos niveles de pérdida, entre 30% y 75%, han sido reportados en Australia, Francia y Canadá (Roger *et al.*, 1999 a; Bretag y Ramsey, 2001; Beeck *et al.*, 2008; McDonald y Peck, 2009). En Colombia, Forero y Ligarreto (2009) reportan que puede ocasionar una disminución en los rendimientos entre un 20% y un 50% y demeritar la calidad de la vaina y los granos.

Por otra parte, en los últimos años se ha venido estudiando detenidamente el uso del jugo de fique como potencial bioinsumo para el control de diversas enfermedades y plagas que afectan cultivos de importancia comercial en Nariño. Se destacan los realizados en papa (Álvarez *et al.*, 2011; Pantoja y Latorre, 2011; Solarte *et al.*, 2012).

Todos los estudios se han enfocado hacia el estudio del jugo de fique crudo o fermentado, pero ninguno había utilizado el enfoque del jugo pasteurizado como uno de los tratamientos de conservación para este importante recurso.

Esta investigación busca un tratamiento térmico que prolongue la vida útil del jugo de fique con miras a su posible comercialización y evaluar su actividad antifúngica sobre el fitopatógeno *Ascochyta*, causante de la enfermedad conocida como tizón o añublo de arveja, enfermedad limitante para la producción de este cultivo en el Departamento de Nariño.

1. MARCO TEORICO

1.1 ASPECTOS GENERALES

De acuerdo con cifras de la FAO, la producción mundial de arveja verde en el 2009 fue de 15,9 millones de toneladas, versus 10,5 millones de toneladas de arveja seca. Colombia ocupó el lugar 23 entre los 83 países productores de arveja fresca. Los principales productores mundiales son China con 9,6 millones e India con 2,9 millones; según la misma fuente, Colombia produjo en el mismo año 38.721 toneladas, superada en Suramérica por Perú con 105.078 toneladas. En cuanto a la producción de arveja seca, Colombia ocupa el mismo lugar en Suramérica con 50.088 toneladas (FAOSTAT, 2011).

Según reportes de la Encuesta Nacional Agropecuaria ENA (2009), Nariño es el mayor productor de arveja fresca del país con un total de 12.745 ha cultivadas y una producción de 43.177 toneladas, con un rendimiento de 3,4 ton ha⁻¹, lo cual lo ubica como el primer productor en Colombia. Aunque estas cifras contradicen las citadas anteriormente por Agronet (2010), la importancia del cultivo de arveja en el Departamento no se puede negar, ya que es uno de los renglones económicos más importantes para la población nariñense.

Sin embargo, uno de los problemas más limitantes para la producción de arveja en Colombia es la enfermedad conocida como el complejo *Ascochyta*, cuyos agentes causales son los hongos *Ascochyta pisi* y *Mycosphaerella pinodes*. De acuerdo con Tamayo (2000), la mancha de *Ascochyta* junto con la mancha de *Mycosphaerella* son las enfermedades más importantes del cultivo en las zonas productoras de arveja en Colombia, llegando a disminuir los rendimientos hasta en un 30%.

La enfermedad se torna más peligrosa en épocas de alta humedad relativa, donde se incrementa por el microclima húmedo que se crea en el follaje de las plantas

(Beeck *et al.*, 2008). Afecta sus partes aéreas como tallo, hojas y vainas (Xue y Warkentin, 2001), provocando incluso el volcamiento de las plantas debido al debilitamiento del tallo y pérdida de calidad de los granos cuando ocurre en vainas (Tamayo, 2000).

Hasta ahora las estrategias de manejo integral del cultivo se han basado en el control cultural y químico de la enfermedad, mediante prácticas como la rotación de cultivos, la utilización de semillas sanas y la aplicación preventiva y/o curativa de fungicidas sintéticos (Tamayo, 2000).

Sin embargo, se ha comprobado que la rotación como mecanismo de control de la enfermedad no es eficiente si no se tiene un periodo de al menos 6 años en zonas donde la enfermedad es endémica, para reducir en un 90% el inóculo de la enfermedad en el suelo (McDonald and Peck, 2009).

Por ello, el manejo de la enfermedad se ha limitado casi exclusivamente a la aplicación de fungicidas de síntesis química, debido a su relativa facilidad de manejo y aplicación. Los más utilizados en el mundo y en Colombia son Propineb (3,0 g/L), Carbendazim (0,75-1,25 cc/L), Tiabendazol (1 cc/L), Benomyl (0,5 g/L) y Clorotalonil (2,5 cc/L) (Tamayo, 2000).

Entre los inconvenientes que tiene el manejo de fungicidas químicos se encuentran su alto costo y la creación de un ambiente peligroso tanto para los seres humanos como para la flora y fauna del ambiente (Chapagain *et al.*, 2007).

Por estas razones se planteó la necesidad de estudiar la efectividad del jugo de fique como alternativa de control de esta enfermedad, ya que diversos reportes de investigaciones realizadas sobre otros hongos fitopatógenos con extractos de fique así como de otras agaváceas, indican que tiene potencial para ser usado como bioinsumo (Verástegui *et al.*, 1996; Barreto *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2005; Deepak, *et al.*, 2005; Guleria y Kumar, 2006; Chapagain *et al.*, 2007;

Gómez, 2001; Acevedo y Serna, 2004; Rojas, 2008; Castro *et al.*, 2010; Álvarez *et al.*, 2011).

En los estudios realizados, los autores citados atribuyen la acción anti microbiana de los extractos a su contenido de saponinas y sapogeninas esteroidales.

La importancia de la utilización del jugo de fique como bioinsumo radica no sólo en el efecto que pueda tener sobre los hongos en estudio, sino también en brindar una alternativa de uso a una materia prima que se está perdiendo y más importante aún, que está causando daño al medio ambiente por su mala disposición en el campo.

Al respecto, Martínez y Caicedo reportan la toxicidad del jugo de fique medida como concentración letal media (CL50) de 1,0 mg L⁻¹ y es comparable a la producida por fungicidas como el mancozeb (CL50 = 2,2 mgL⁻¹) y al herbicida propanil, solo superado en toxicidad por el Clorpirifos, cuya CL50 medida en truchas a las 96 horas fue de 0,007 mgL⁻¹ (Martínez y Caicedo, 2002).

Por lo expuesto se considera que el proyecto es importante debido al impacto que puede tener sobre dos cadenas agroindustriales de gran trascendencia en el Departamento, como son la del fique y la hortofrutícola.

1.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LA PLANTA DE FIQUE (*Furcraea gigantea*).

El fique pertenece a la familia *Agavaceae*, y al género *Furcraea*. Es una planta grande, de tallo erguido; su altura varía entre 2 y 7 m., densamente poblado de hojas de color verde, en forma radial, largas (1 a 3 m), angostas (10 y 20 cm), carnosas, puntiagudas, acanaladas, y dentado espinosa, en algunas variedades, presentando líneas o estrías tenues de unos 3 mm de largo (Cadefique, 2006).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del fique var. Tunosa Común (*Furcraea gigantea*)

REINO	Vegetal
PHYLUM	Tracheophyta
DIVISIÓN	Spermatophyta
CLASE	Angiospermae
SUBCLASE	Monocotiledónea
ORDEN	Liliflorae (Liliales)
FAMILIA	Agavaceae
GÉNERO	Furcraea
NOMBRE COMÚN	Fique, cabuya, penca, fique perulero, maguey, cabui, cabuya blanca, chuchao, cocuiza
NOMBRE CIENTÍFICO	Furcraea gigantea
NOMBRES COMUNES	Tunosa común, Fique Tunoso, piteira y pita en Brasil, aloe y creole en Mauricio

Fuente: Cadefique, 2006

En Nariño se cultivan dos variedades predominantemente, Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*) y tunosa común (*Furcraea gigantea*), también conocida como Negra Común. Se considera al Brasil como origen de esta especie y en Colombia crece espontáneamente. Sus hojas son de color verde brillante por ambos lados y tiene espinas café en los bordes; es de larga vida útil, tolerante a suelos pobres en nutrientes, requiere para su desarrollo condiciones de semihumedad, temperatura cálida y exposición a la luz solar. Es susceptible al Gusano Pasador y a la Viruela (Cadefique, 2006).

1.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DEL JUGO DE FIQUE

El jugo de fique es un subproducto del proceso de obtención de fibra de cabuya, y representa el 70% de la hoja, éste es una suspensión con características variables, dependiendo de la edad, la estación del año y la fertilidad del suelo. De color verde ocre, tiene un olor característico fuerte, y es muy corrosivo (Cadefique, 2006). Su densidad media a escala experimental es de 1.02 kg L⁻¹ y su pH varía entre 4 y 5.

En Colombia dos grupos de investigación han realizado la caracterización fisicoquímica del jugo de fique con resultados similares. El grupo CIBIOT de la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín (2011), reporta los siguientes resultados (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización físico química del jugo de fique

PARÁMETRO	VALOR	PARÁMETRO	VALOR
pH	4,25	Azúcares reductores (%w/w)	0,81
Viscosidad (cP)	1,56	Fructosa (g/L)	7,30
Densidad (g/mL)	1,04	Glucosa (g/L)	11,22
Sólidos totales (mg/L)	66,38	Sacarosa (g/L)	0,24
Sólidos Disueltos (mg/L)	77,40	Saponinas (g/kg de jugo seco)	4,48
Sólidos sedimentables (mg/L/h)	670	Nitrógeno orgánico (%)	0,35
Cenizas (%)	1,34	Proteínas (%)	2,20
Humedad (%)	91,05	DQO (mg/L de O₂)	86.600
Grasa total (%)	0,86	DBO (mg/L de O₂)	11.780

Fuente: Aprovechamiento integral del fique: Usos Alternativos y su Potencial (2010).

El análisis mediante marcha fitoquímica realizada en la misma universidad, da cuenta de la presencia de otras sustancias, entre las que se destacan los flavonoides y triterpenos.

Estos coinciden con los estudios realizados en la Universidad de Nariño por el Grupo de Investigación TEA, que determinó la presencia de metabolitos secundarios tales como flavonoides, cumarinas, taninos, esteroides, glicósidos cardiotónicos, alcaloides y saponinas, en jugo de fique fresco y fermentado de las variedades Uña de Águila y Negra Común provenientes de los municipios de El Tambo y Guaitarilla en Nariño (Benavides *et al.*, 2010).

Cabe destacar que ambos estudios concuerdan en afirmar que el jugo contiene saponinas, sustancias que han sido objeto de amplio estudio por su diversa actividad biológica.

1.4 SAPONINAS ESTEROIDALES

Las saponinas son un gran grupo de glucósidos, ampliamente distribuido en las plantas superiores (Chapagain *et al.*, 2007). Sus propiedades tenso activas distinguen estos compuestos de otros glucósidos. Se disuelven en el agua formando soluciones coloidales que forman espuma al sacudirlas (Tyler *et al.*, 1981) además tienen la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos (Martínez, 2001; Sparg *et al.*, 2004).

De acuerdo con Sparg *et al.*, (2004), las saponinas pueden clasificarse en 2 grupos: las saponinas triterpenoides, que se encuentran principalmente en las angiospermas dicotiledóneas y las saponinas esteroidales, que están presentes casi exclusivamente en angiospermas monocotiledóneas entre las que se encuentran las familias *Liliaceae*, *Dioscoreaceae* y *Amaryllidaceae* (*Agavaceae*), a la cual pertenece el fique (Martínez, 2001). Debido al interés de esta investigación la discusión siguiente se centrará en las características más importantes de las saponinas esteroidales.

Las saponinas esteroides son glicósidos esteroides con un núcleo espirostanos C27 (Martínez, 2001; Sparg *et al.*, 2004) cuya estructura se aprecia en la figura 1.

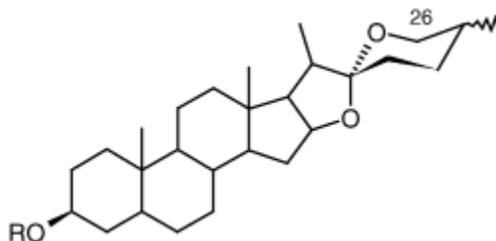


Fig.1. Estructura de una saponina y una sapogenina esteroideal. Fuente: Sparg *et al.*, (2004).

En la figura 1 se ve el radical R. Si R es H, el compuesto se denomina sapogenina esteroide, mientras que si R es un carbohidrato, este se denomina saponina esteroide. Ambos compuestos tienen propiedades químicas y biológicas diferentes, dadas por el radical R.

Estas sustancias han sido objeto de estudio durante los últimos años debido a su amplio rango de actividades biológicas (Sparg *et al.*, 2004). A continuación se describen los hallazgos más importantes en cuanto a las saponinas y sapogeninas en la familia de las agaváceas.

1.4.1 Ocurrencia de saponinas extraídas a partir de plantas de la familia *Agavaceae*. Entre los metabolitos secundarios más importantes de la familia de las Agaváceas se encuentran las saponinas. Usualmente pocas saponinas esteroidales tales como tigogenina, hecogenina, chlorogenina, y mannogenina se han reportado como constituyentes de estas plantas (Yokosuka y Mimaki, 2007). Sin embargo, debido a la importancia que reviste y los diversos usos que estas sustancias tienen, se han hecho investigaciones concernientes a aislar nuevas saponinas y sapogeninas de estas plantas.

En 2003 Jin *et al.*, aislaron y dilucidaron la estructura de tres nuevos glicósidos de hecogenina junto con cinco compuestos esteroidales conocidos a partir de hojas fermentadas de *Agave americana*. Se aislaron 5 saponinas esteroidales conocidas (hecogenina, agaveside A, agaveside B, entre otras). Los nuevos compuestos encontrados fueron llamados agamoside D, agamoside E y agamoside F. Los autores sugieren que el enlace azúcar de la saponina esteroideal es importante para su actividad biológica (Jin *et al.*, 2003).

Simmons-Boyce *et al.*, (2004) aislaron cuatro saponinas esteroidales de las hojas de la planta *Furcraea selloa* var. *marginata*. Estos fueron una saponina furostanol, la furcreafurostatina ($C_{69}H_{116}O_{38}$) y tres saponinas espirostanol ya conocidas, furcreastatina, yuccaloesida C y cantalasaponina-1.

En Brasil fueron aisladas dos saponinas esteroidales, de las hojas de *Furcraea gigantea* Vent. (*Agavaceae*); una nueva saponina furostanol bisdesmosidica, junto con una saponina furostanol ya conocida, la furcreastatina. La nueva saponina no presentó actividad hemolítica, que es característica de las saponinas esteroidales y la furcreastatina no presentó actividad antiinflamatoria (Pereira da Silva *et al.*, 2006).

Yokosuka y Mimaki (2007) reportaron el aislamiento de tres nuevos glicósidos espirostanol y un nuevo glicósido furostanol a partir de plantas completas de *Agave utahensis*.

En 2009, los mismos autores reportaron el aislamiento de cinco nuevas saponinas esteroidales y tres nuevas saponinas furostanol, obtenidas mediante extracción metanólica de plantas completas de *Agave utahensis* (Yokosuka y Mimaki, 2009).

En el cuadro 1 se resumen las estructuras de los compuestos encontrados.

Finalmente, en la Universidad de Nariño el Grupo e Investigación TEA identificó las sapogeninas hecogenina y tigogenina, a partir de jugo de fique (*Furcraea gigantea*) con porcentajes de área relativa del 51,4% y 46,1%, respectivamente mediante análisis por HPLC-PDA. Se cuantificaron 192 ppm de sapogeninas totales que corresponden a 101,5 ppm de hecogenina (52,8% w/w) y 90,5 ppm de tigogenina (47,2% w/w) (Rojas *et al.*, 2010).

1.4.2 Metodologías de aislamiento y medición de contenidos de saponinas y sapogeninas por HPLC:

1.4.2.1 Metodologías de extracción y separación. Las saponinas usualmente se encuentran en las plantas como una mezcla de formas estructuralmente relacionadas con polaridades muy similares, por lo cual su separación es difícil (Oleszek and Bialy, 2006).

Las saponinas esteroidales usualmente se extraen a partir de material vegetal fresco o seco con metanol. Luego de evaporar la mayor parte del solvente, la porción acuosa se particiona con etil acetato para remover los constituyentes no polares y luego con n-butanol para extraer las saponinas, junto con otros constituyentes polares y remover azúcares, sales y otros componentes altamente solubles en agua. Luego de la remoción del solvente las saponinas pueden separarse mediante cromatografía de columna abierta sobre sílica utilizando un sistema de solvente en gradiente CHCl₃–MeOH–Agua (87:12:1–14:6:1), o HPLC (Dinan *et al.*, 2001).

Cuadro 1. Estructuras de nuevas saponinas encontradas en plantas de la familia *Agavaceae*

COMPUESTO AISLADO	PLANTA	REFERENCIA
(25R)-5 α -spirostan-3 β -ol-12-uno (hecogenina)	<i>Agave Americana</i>	Jin <i>et al.</i> , 2003
[8],hecogenin 3-O- β -D-galactopyranoside (agaveside A)		
[2,8], hecogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside (agaveside B)		
[2,8], hecogenin 3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside		
[8],hecogenin3-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside		
hecogenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside (agamenoside D)		
hecogenin 3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside (agamenoside E)		
hecogenin 3-O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside (agamenoside F)		
Furcreafurostatina (C ₆₉ H ₁₁₆ O ₃₈)	<i>Furcraea selloa</i> var. <i>marginata</i>	Simmons-Boyce <i>et al.</i> , (2004)
Furcreastatina, Yuccaloesida C y cantalasonina-1.		
Furcreastatina	<i>Furcraea gigantea</i> Vent.	Pereira da Silva <i>et al.</i> , 2006
3-[(O-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-O-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl)oxy]-3 β ,5 α ,25R)-26-(β -D-glucopyranosyloxy)-22-hydroxyfurost-12-one		
C ₃₉ H ₆₄ O ₁₅ : (20R,25R)-20-hydroxy-5 α -spirostane-3 β ,6 α -diyl bis- β -D-glucopyranoside	<i>Agave utahensis</i>	(Yokosuka y Mimaki, 2007)
C ₄₅ H ₇₄ O ₁₉ Clorogenin triglicósido: (25R)-6 α -hydroxy-5 α -spirostan-3 β -yl O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside		
C ₃₃ H ₅₄ O ₉ Clorogenin monoglucósido: (25R)-6 α -hydroxy-5 α -spirostan-3 β -yl β -D-glucopyranoside		
C ₄₆ H ₇₈ O ₂₀ identificado como (25R)-22 α -methoxy-5 α -furostano-3 β ,6 α ,26-triyl tris- β -D-glucopyranoside	<i>Agave utahensis</i>	(Yokosuka y Mimaki, 2009)
C ₄₄ H ₇₂ O ₁₈ : (25R)-2 β -Hydroxy-5 α -spirostan-3 β -yl O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside		
C ₄₄ H ₇₀ O ₁₉ : (25R)-3 β -[(O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl)-oxy]-2 α -hydroxy-5 α -spirostan-12-one		
C ₄₄ H ₆₈ O ₁₉ : (25R)-2 α -Hydroxy-3 β [(O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl)oxy]-5 α -spirost-9-en-12-one		
C ₅₁ H ₈₂ O ₂₅ : (25R)-3 β [(O- β -D-Glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl)-oxy]-2 α -hydroxy-5 α -spirostan-12-one		
C ₅₁ H ₈₂ O ₂ : (25R)-3 β [(O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O-[β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)]-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl)-oxy]-5 α -spirostan-12-one.		
C ₅₁ H ₈₆ O ₂₄ : 22-methoxyfurostanol saponin con 4 monosacáridos: (25R)-26-[(β -D-glucopyranosyl)oxy]-2 α -hydroxy-22 α -methoxy-5 α -furostan-3 β yl O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside.		
C ₅₁ H ₈₂ O ₂₅ : 22-methoxyfurostanol saponin: (25R)-26-[(β -D-glucopyranosyl)oxy]-2 α -hydroxy-22 α -methoxy-3-[(O- β -D-xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranosyl)oxy]-5 α -furost-9-en-12-one		
C ₅₂ H ₈₈ O ₂₄ : 22-methoxyfurostanol saponin: (25R)-26-[(β -D-glucopyranosyl)oxy]-22 α -methoxy-5 α -furostan-3 β yl O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside		

La extracción con metanol caliente puede desintegrar algunas fracciones lábiles como las formas aciladas y producir sustancias diferentes a las saponinas originales. Además, la extracción con metanol en algunos casos, especialmente para las saponinas esteroidales, puede resultar en la formación de metil derivados que no se encuentran originalmente en las plantas. Debido a ello, se prefiere

utilizar extracción en frío con soluciones etanol-agua. En extracción líquido-líquido, algunas saponinas altamente polares (bidesmosidos, tridesmosidos) pueden perderse (Oleszek and Bialy, 2006).

En el bagazo de fique, se determinó que el contenido de sapogeninas oscila entre 0,18%-0,45%; la máxima extracción de sapogeninas se obtuvo con 6 horas de proceso, utilizando una relación solvente:bagazo de 1:10 (g/mL) y utilizando como solvente etanol-agua al 75% (Osorio *et al.*, 2010).

1.4.2.2 Identificación de saponinas por HPLC. Este método es el más utilizado para identificación y cuantificación de saponinas esteroidales, debido a su alta resolución. La única dificultad que presenta es la falta de un cromóforo adecuado para la detección por UV. Por lo tanto, es necesario aplicar métodos complementarios como la derivatización, la detección refractiva o la detección por espectrometría de masas (MS por sus siglas en inglés) (Dinan *et al.*, 2001).

Para resolver estos inconvenientes, se han llevado a cabo diversos ensayos para aplicar la técnica de detección de evaporación de luz (ELSD por sus siglas en inglés) en la detección de saponinas. Este detector ha sido aplicado exitosamente en soyasapogenoles A y B, en la determinación de ginsenósidos y con otras siete saponinas, macranthoidinsa A y B, macranthosidos A y B, dipsacosido B y dos hederagenin glicósidos, que fueron exitosamente separados en columna C18 utilizando MeCN-H₂O-HOAc. Sin embargo, ELSD aún no es muy utilizado en el mundo como método de rutina para el control de calidad de saponinas y la cromatografía líquida con detección UV sigue siendo el método utilizado (Oleszek and Bialy, 2006).

Generalmente las saponinas se detectan a bajas longitudes de onda UV en un rango de 200 a 210 nm, y por esta razón, se utiliza un gradiente con una fase móvil acetonitrilo-agua utilizando columnas C-18 ya que el acetonitrilo absorbe menos a estas longitudes de onda en comparación con el metanol. A pesar de

ello, se han publicado métodos HPLC-UV para saponinas utilizando metanol como solvente, con o sin la adición de un ácido o un buffer (Kite *et al.*, 2007). Los resultados de la cromatografía de saponinas esteroidales tipo furostanol han sido muy pobres cuando se utilizan gradientes acuosos acidificados con metanol. Por estas razones, Kite *et al.*, (2007) sugieren evitar el uso de metanol como solvente de extracción en los análisis por HPLC de material que contiene saponinas esteroidales.

En su estudio, los mismos autores sostienen que el efecto dañino del metanol en fases móviles acidificadas se apreció en los glicósidos furostanol de cuatro extractos crudos metanólicos aislados de hojas de *D. purpurea* y raíces de *A. asphodeloides*, *A. officinalis* y *C. majalis*. Los extractos de *D. purpurea*, *A. asphodeloides* y *C. majalis* contienen un glicósido furostanol determinado en acetonitrilo acidificado acuoso. Para las saponinas analizadas de las tres plantas, el pico cromatográfico fue muy pobre cuando el análisis se llevó a cabo en fase móvil de metanol acuoso acidificado (Kite *et al.*, 2007).

1.4.2.3 Estudios de cromatografía de sapogeninas en fique. Rojas *et al.*, (2010) realizaron la extracción de sapogeninas a partir de 4,5 g de jugo de fique liofilizado utilizando agua grado HPLC, hidrólisis con HCl y extracción con Cloroformo y 4 horas de hidrólisis. La purificación del extracto crudo se realizó por cristalización, utilizando carbón activado y metanol frío. La muestra se analizó por GC-MS para la identificación de las sapogeninas presentes. Para el análisis por HPLC-PDA, se utilizó una columna waters C8 (100 mm, 4,6 mm d.i., 5 µm), fase móvil acetonitrilo:agua (60:40) a un flujo de 0.75 ml/min.

Para la cuantificación se utilizó el método de patrón externo utilizando como estándares el ácido oleanólico al 98% y acetato de hecogenina al 90%. Se obtuvieron 0,195 g de crudo de sapogeninas, a partir de las cuales se logró obtener 4,1 mg de sapogeninas purificadas, para un rendimiento del 0,091% p/p. Mediante GC-MS se identificaron las sapogeninas como hecogenina y tigogenina,

con porcentajes de área relativa del 51,4% y 46,1%, respectivamente (Rojas *et al.*, 2010).

Camargo *et al.*, (2010) extrajeron hecogenina a partir del jugo de fique de la especie *Furcraea macrophylla* (Uña de Águila), obtenido mediante el cultivo de bulbos semi-estériles; los resultados obtenidos permitieron elucidar la estructura de la hecogenina, donde su rendimiento fue de 1g/L, lo cual corresponde a un 0,08 % con un 98% de pureza.

En el análisis por HPLC de un extracto de *Furcraea* spp., Castro *et al.*, (2010) encontraron que este tenía una proporción hecogenina:tigogenina de 82:18, en correlación con los resultados obtenidos por Cromatografía de Capa Delgada y RMN, que indicaron la presencia de hecogenina como componente mayoritario.

1.5 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS SAPONINAS Y SAPOGENINAS PRESENTES EN EL JUGO DE FIQUE

La actividad biológica de las saponinas ha sido reportada por muchos autores, y compilada por Sparg *et al.* (2004) incluye actividad hemolítica, molusquicida, antiinflamatoria, contra hongos y levaduras, antibacteriana y antimicrobiana, anti parasítica, citotóxica, antitumoral y antiviral.

La actividad antifúngica de las saponinas y sapogeninas aisladas de las hojas de agaváceas es de interés para la investigación, por lo que a continuación se resumirán los resultados más relevantes en este aspecto, particularmente las que tienen relación con su acción sobre hongos fitopatógenos.

En 1996, Verástegui *et.al*, reportaron una gran actividad biológica inhibitoria del extracto etanólico de las raíces de *Agave lechuguilla*, sobre diversas especies de bacterias, mohos y levaduras. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se definió

como la mínima concentración del extracto que no mostró crecimiento del microorganismo tras una evaluación macroscópica. El extracto de *A. lechuguilla* fue el más activo de los extractos ensayados contra la mayoría de organismos estudiados, pues inhibió el crecimiento de *Clostridium perfringens* y *Shigella dysenteriae* y todos los mohos ensayados (*Candida albicans*, *Candida rugosa*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus laurenti* ATCC-52657, *Cryptococcus albidus*, *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, y *Sporotrix schenckii*) excepto *Candida krusei*, con valores de MIC que variaron entre 3 y 12 mg mL⁻¹. Sin embargo, no se esclarece qué sustancias son responsables de esta actividad antimicrobiana (Verástegui *et al.*, 1996).

Barreto *et al.* (2004), investigaron la incidencia de hongos en semillas de algodón herbáceo, tratadas con extractos frescos y fermentados de *Agave sisalana*. Los resultados muestran que las semillas tratadas con ambos tipos de extracto, presentaron menores incidencias de ataque de los hongos fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.*

Sánchez *et al.*, en 2005, reportaron la actividad inhibitoria de los extractos de dos especies de *Agave*, *A. aspérrima* y *A. striata* sobre el crecimiento y producción de aflatoxinas producidas por cepas de *Aspergillus*. Los autores experimentaron con diversas estructuras de las plantas encontrando que las partes más activas fueron las flores y escapos florales. Los extractos acuosos y metanólicos de estos órganos mostraron actividad inhibitoria contra ambas cepas. El extracto metanólico de la flor mostró la mayor actividad. A concentraciones equivalentes al 50% de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de las dos especies, hubo una reducción superior al 99% en la producción de aflatoxinas en maíz en ambas cepas y al 75% de la MIC se redujo la síntesis de aflatoxinas a niveles indetectables (Sánchez, *et al.*, 2005).

Deepak *et al.*, el mismo año, estudiaron la actividad de los extractos metanólicos de hojas pertenecientes a 38 géneros de plantas, contra *Sclerospora graminicola*, causante de la enfermedad de mildew polvoso en mijo perla. El efecto anti esporulante del extracto crudo y diluido (1:9) de *Agave americana*, sobre el patógeno causó inhibición total y parcial de la esporulación del fitopatógeno, respectivamente (Deepak, *et al.*, 2005).

Guleria y Kumar (2006) evaluaron la actividad antifúngica del extracto de hojas de *Agave americana* contra *Alternaria brassicae*, el agente causal de la mancha de Alternaria de la mostaza india. La concentración mínima inhibitoria (MIC) se definió como la concentración más baja del extracto requerida para suprimir completamente la germinación conidial de *A. brassicae*. Los resultados indican que la MIC para el extracto metanólico fue de 200 µg/ml. Mediante fraccionamiento por cromatografía de este extracto y ensayo de hojas sueltas, se determinó que concentraciones de 40 – 250 µg/ml inhibieron completamente la lesión, con una MIC de 40 µg/ml. Los autores concluyen que esta fuerte actividad antifúngica se debe principalmente a una mezcla de saponinas presente en el extracto.

En estudio realizado por Chapagain *et al.*, (2007), se evaluó el efecto inhibitorio del extracto de saponinas de diversas plantas contra cinco hongos fitopatógenos. El porcentaje de inhibición se midió mediante un ensayo *in vitro* y se expresó como la concentración que redujo el diámetro de la colonia del hongo hasta un 50% del control (DRC₅₀).

Los resultados mostraron que el extracto de *Yucca schidigera* (YE) (*Agavaceae*), que contenía 13,5% de saponinas ensayado a una concentración de 4% inhibió el crecimiento de *Alternaria solani* en un 76% y fue más efectivo que el control que fue 100 ppm de flustriafol; de *Pythium ultimum* en un 63,4%; de *Fusarium oxysporum* en un 57,3% la cual no mostró diferencia con benomyl a 5 ppm; en el caso de *Verticillium dahliae*, el extracto de YE inhibió en un 59,2% el crecimiento,

inferior al control que fue prochloraz 100 ppm. Sobre *Colletotrichum coccodes*, YE mostró el mayor efecto inhibitorio llegando al 100% de inhibición, superior al prochloraz a 200 ppm, que inhibió el 95% (Chapagain *et al.*, 2007).

Las propiedades biocidas del jugo de fique han sido previamente estudiadas y documentadas también en Colombia. Gómez (2001), realizó estudios *in vitro* del extracto de fique para determinar su acción biocida sobre las estructuras micelial y conidial de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Sclerotinia sclerotiorum*, causantes de las enfermedades conocidas como pudrición algodonosa del Lulo (*Solanum quitoense*) y Antracnosis del tomate de árbol (*Solanum betacea*), encontrando que esta sustancia inhibe el desarrollo micelial de *C. gloeosporoides* cuando la concentración del extracto de fique en medio de cultivo PDA es superior al 5% y afecta la germinación conidial cuando la concentración del extracto es superior al 1%.

Con respecto al efecto sobre *S. sclerotiorum*, concentraciones de extracto de fique superiores al 4% inhibieron el desarrollo micelial del hongo en el medio de cultivo PDA (Gómez, 2001). Los anteriores resultados permiten concluir que el extracto de fique posee una acción biocida para el desarrollo de los hongos fitopatógenos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

Las Facultades de Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín, realizaron una optimización de la obtención del extracto vegetal (material orgánico) del fique y además observaciones del efecto biocida sobre los hongos *Trichoderma* 33 spp. y *Fusarium* 34 spp (Acevedo y Serna, 2004).

Castro *et al.*, (2010) estudiaron el efecto de la mezcla hecogenina-tigogenina aislada a partir de un extracto vegetal de *Furcraea* spp. Los resultados de actividad antifúngica de la mezcla hecogenina-tigogenina sobre *C. acutatum*, *Aspergillus* sp, *Candida* sp. y *B. theobromae* son descritos por los autores como

moderados. En particular, se observa un efecto de detoxificación de los hongos, caracterizado por la disminución del efecto antifúngico en el tiempo.

Álvarez *et al.* (2011), estudiaron la sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora infestans* al jugo de fique comparado con dos fungicidas comerciales. La concentración efectiva cincuenta (EC₅₀) obtenida fue de 4,02 µg.mL⁻¹ para Ridomil-Gold® y 3,91 µg.mL⁻¹ para Curzate®; para el bioinsumo de fique se obtuvo una EC₅₀ de 8.912 µg.mL⁻¹ y una concentración capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* en 75.000 µg.mL⁻¹. De acuerdo con los autores, los valores obtenidos indican que el bioinsumo de fique afecta el crecimiento del patógeno y puede considerarse para estudios en condiciones de campo abierto.

1.6 ESTUDIOS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE JUGOS VEGETALES TRATADOS TÉRMICAMENTE

La actividad antifúngica de las fracciones de la pulpa y el jugo pasteurizado de *Aloe vera* se ensayó sobre *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum coccodes* aislados de un cultivo de papa. El jugo se trató a una temperatura de 65°C durante 30 minutos. Los resultados mostraron que la pulpa tuvo un efecto inhibitorio sobre *F. oxysporum* causando una reducción del 53% del crecimiento micelial a una concentración de 10⁴ µL L⁻¹ (mg mL⁻¹) evaluado en un periodo de 168 horas. No hubo efecto sobre los otros patógenos. El jugo pasteurizado aplicado a una concentración de 10⁵ µL L⁻¹ afectó el crecimiento de las colonias de los patógenos en un 28% después de 120 h en *R. solani*, 38% a 168 h para *F. oxysporum* y 22% a 168 h para *C. coccodes* (Jasso de Rodriguez *et al.*, 2005).

Pantoja y Latorre (2011) evaluaron la efectividad del jugo de fique pasteurizado sobre la inhibición del crecimiento de *P. infestans*, *in vitro*. Los resultados mostraron que el jugo tratado térmicamente a 75°C por 4 minutos, presentó un porcentaje de inhibición del 97.9% en el crecimiento micelial, así como una

reducción aceptable de la actividad enzimática (10.6% para POD y 3.2% para PPO), y concluyen que *Phytophthora infestans* es sensible frente al bioinsumo tratado térmicamente.

1.7 LA MANCHA DE ASCOCHYTA, TIZÓN O AÑUBLO DE LA ARVEJA

Es una enfermedad de gran importancia en todo el mundo, debido a que provoca grandes pérdidas en arveja (Skoglund *et al.*, 2011) reduciendo los rendimientos entre un 20 y 50%, demeritando la calidad de la vaina y los granos. En Nariño se considera una enfermedad endémica (Tamayo, 2000).

Se caracteriza por atacar todos los órganos aéreos de la planta y por el desarrollo de manchas de color negro violáceo a marrón y lesiones en los tallos, hojas, zarcillos, y vainas (Skoglund *et al.*, 2011).

En las hojas provoca lesiones circulares de 2 a 8 mm de color café claro con anillos concéntricos de color oscuro (picnidios) en el centro de la hoja. En los tallos las lesiones son de forma alargada, de color castaño claro con el centro grisáceo y puntuaciones oscuras donde se encuentran las estructuras reproductivas del hongo. En vainas la enfermedad se manifiesta por manchas redondeadas, de color café oscuro, deprimidas y con un borde más oscuro algo sobresaliente (Tamayo, 2000). Los daños pueden verse en las figuras 2 y 3.



Fig 2. Daño producido por *Ascochyta* en vainas de arveja.



Fig 3. Daño producido por *Ascochyta* en hojas de arveja.

Fuente: Esta investigación

1.7.1 Historia. La enfermedad fue descubierta por primera vez en 1830 en Europa por Libert, quien llamó al patógeno *Ascochyta pisi*. La descripción de otros hongos que causaban síntomas similares fue realizada por Berkeley y Bloxam en 1861 y por Jones en 1927. Fue este quien reportó que los aislamientos de *A. pisi* y *Mycosphaerella pinodes* podían distinguirse por sus características en cultivo (Skoglund *et al.*, 2011).

1.7.2 Taxonomía de los hongos causales de la enfermedad. La enfermedad es provocada por un complejo de hongos llamados *Ascochyta pisi* Lib., *Mycosphaerella pinodes* (Berk. & A. Bloxam) Vestergr. (ana. *Ascochyta pinodes* L.K. Jones), y *Phoma pinodella* (L.K. Jones) Morgan-Jones & K.B. Burch [sinónimos *Ascochyta pinodella* L.K. Jones, y *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (L.K. Jones) Boerema]. Los tres microorganismos se parecen pero pertenecen a especies distintas y es difícil distinguirlos basándose solo en los síntomas (Skoglund *et al.*, 2011; Allard *et al.*, 1993). En lo que sigue nos centraremos solo en el estudio de *A. pisi* y *M. pinodes*, que son los que se han reportado como importantes en la zona de estudio.

Ascochyta pisi Lib., es la especie típica del género *Ascochyta*. Chilvers *et al.*, (2009) reportaron el descubrimiento del teleomorfo (estadio sexual) de *Ascochyta pisi*, y lo clasificaron dentro del taxa *Didymella*, llamándolo *Didymella pisi*.

Didymella pinodes (Berk. & A. Bloxam) Petr., es el nombre taxonómicamente correcto, para el estado sexual de *Ascochyta pinodes*. A pesar de ello, el nombre más reconocido por los fitopatólogos es el sinónimo *Mycosphaerella pinodes*. Basados en datos moleculares, Dugan *et al.* (2007) mostraron que *M. pinodes* se agrupaba dentro del taxa *Didymella* en lugar del taxa *Mycosphaerella*. Ellos propusieron que *D. pinodes*, un sinónimo de *M. pinodes*, sea el nombre aceptado. El hongo, *D. pinodes*, ha sido clasificado recientemente como *Peyronellaea pinodes* [Berk. & A. Bloxam] (Skoglund *et al.*, 2011).

1.7.3 Identificación de los hongos causales de la enfermedad mancha de *Ascochyta*. *Ascochyta pisi* se distingue por formar picnidiosporos globosos septados mediante detección por microscopio (INRA, 2011); sus esporas son hialinas, rectas o levemente curvadas monoseptadas, ligeramente constreñidas en el septum, con bordes redondeados y un tamaño de 10-16 μm \times 3-4,5 μm . (Skoglund *et al.*, 2011); *Mycosphaerella pinodes* se caracteriza por la presencia de picnidiosporos bicelulares con una pequeña constricción en el septum (INRA, 2011). Sus conidios son hialinos, ligeramente constreñidas en el septum, elipsoidales, y miden entre 8-16 μm \times 3-4.5 μm . Los picnidios son pequeños puntos negros y miden entre 100 y 200 μm en el caso de *A. pisi* y *M. pinodes* y de 200 a 300 μm para *P. pinodella* (Skoglund *et al.*, 2011). Estos se pueden observar en las figuras 4 y 5.

Sin embargo, estos valores son puramente referenciales, pues en estudio realizado por Setti *et al.*, (2011) se encontró que entre distintos tipos de aislamientos de *M. pinodes* el rango de tamaño de los picnidios estuvo entre 145 \times 143 μm hasta 280 \times 265 μm y los picnidiosporos variaron entre 11,5 \times 2,3 μm hasta 22,5 \times 6,3 μm .

En cultivos puros en medio artificial, es fácil distinguir el micelio de *A. pisi* por su color claro y abundantes esporas de color rosa anaranjado, mientras que para *M. pinodes* el micelio es de color oscuro y aparece un exudado opaco de sus esporas (Skoglund *et al.*, 2011). Setti *et al.* (2011) afirman que la morfología de diferentes aislamientos de *M. pinodes* clasificados dentro del mismo grupo fueron diferentes en sus características morfológicas y culturales en medio artificial.



Fig 4. Esporas de Ascochyta

Fuente: Koike et al (2007)

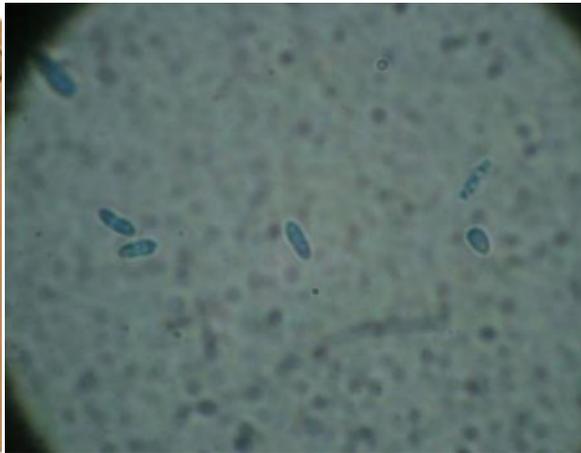


Fig 5. Esporas de Ascochyta aisladas de cultivo *in vitro*

Fuente: Esta investigación

Por lo anterior, la identificación de los patógenos debe realizarse mediante una combinación de métodos que incluyen la correcta individualización en campo, el aislamiento adecuado en medio de cultivo artificial y la observación microscópica de sus órganos reproductivos.

1.7.4 Diferenciación de los síntomas en campo de los hongos causales de la enfermedad.

Ascochyta pisi produce manchas foliares características que son el síntoma principal de la enfermedad (Tivoli *et al.*, 2006). Varían en tamaño, de color café claro, redondas, rodeadas por una franja de color marrón con manchas oscuras (picnidios) formando patrones anillados en el centro de la hoja. Las lesiones pueden alargarse en presencia de agua libre. Las manchas que aparecen por encima del primer nodo son ovales. Las semillas son atacadas sin síntomas visibles en las vainas. Aunque es más frecuente, la antracnosis causada

por *Ascochyta pisi* causa menos daño que la provocada por *Mycosphaerella pinodes* (INRA, 2011).

Por otro lado, *Mycosphaerella pinodes* se desarrolla primero en el tallo (15 cm por encima del cuello) en los nodos. Los síntomas foliares se ven como lesiones de color marrón rayado de 5 mm de diámetro, rodeada por un anillo clorótico amarillo que se vuelve de color marrón oscuro y que carecen de márgenes distinguibles en las hojas y se tornan en manchas rojizas con un centro un centro necrótico en las vainas.

Esta especie es la más agresiva y frecuente, llegando a causar hasta la defoliación temprana de la copa (INRA, 2000).

1.7.5 Transmisión de la enfermedad. *A. pisi* se transmite por las semillas infectadas a las primeras hojas cuando germinan del suelo. Posteriormente el hongo se extiende a través de los picnidiosporos. El ciclo completo de la enfermedad puede verse en la figura 7.



Fig. 6. Ciclo de la enfermedad *Ascochyta pisi*.

Fuente: (Stichting Academisch Erfgoed n.d.)

M. pinodes persiste en los residuos de cosecha en el suelo y sobre las semillas. Los brotes contaminados pueden morir en el suelo antes de la emergencia (damping off). Durante la etapa vegetativa el hongo produce varios cuerpos

infecciosos en los tejidos externos del hospedero: picnidiosporas, ascosporas, clamidiosporas y micro esclerocios. Las ascosporas son la causa principal de la infección secundaria, ya que inducen lesiones rayadas y pueden causar pérdidas severas especialmente cuando se esparcen durante la emergencia y la post floración, lo cual afecta el rendimiento de la producción (INRA, 2011; Tamayo, 2000).

Allard *et al.*, (1993) observaron que la dispersión de distintas generaciones de picnidiosporas en campo ocurría solo durante la temporada de lluvias debido a las salpicaduras y era limitada, mientras que las ascosporas transportadas por el viento tienen un mayor potencial de transmisión y dispersión secundaria de la enfermedad.

1.7.6 Control de la enfermedad. El desarrollo de la mancha de *Ascochyta* requiere de condiciones ambientales específicas y su incidencia y severidad varían con la zona geográfica del cultivo (Allard *et al.*, 1993) y la susceptibilidad varietal (Cousin, 1997). Asimismo, existen estudios que revelan que la virulencia de las distintas especies de los agentes causales varía ampliamente (Xue *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2003; Taylor and Ford, 2007; Setti *et al.*, 2011).

Una estrategia de manejo de la enfermedad es introducir resistencia genética en el material de siembra (Allard *et al.*, 1993; Cousin, 1997), para lo cual se han realizado muchos esfuerzos alrededor del mundo (Xue *et al.*, 1996; Kraft *et al.*, 1998; Xue and Warkentin, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Beeck *et al.*, 2008; Pacheco *et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2010; Timaná *et al.*, 2011). Sin embargo, la estabilidad de la resistencia genética y la heredabilidad de la misma son factores que se deben considerar así como las otras variables agronómicas, lo que hace este desarrollo muy complejo.

El manejo integrado de la enfermedad incluye prácticas como remover el material y los residuos de cosecha de los lotes, para evitar la diseminación de

clamidiosporas de *M. pinodes* en el suelo; el utilizar semilla desinfectada para prevenir los síntomas causados por *A. pisi*; evitar las cosechas en épocas de lluvias pues las ascosporas se liberan fácilmente en estas temporadas y finalmente la aplicación oportuna de fungicidas foliares como parte de un programa de manejo integral del cultivo (Davidson and Kimber, 2007).

1.8 IMPORTANCIA DE LAS ENZIMAS PEROXIDASA (POD) Y POLIFENOL OXIDASA (PPO) EN LOS PROCESOS DE PASTEURIZACIÓN.

Las enzimas son proteínas complejas que producen un cambio químico específico en otras sustancias, sin que exista un cambio en ellas mismas. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares. A pesar de que aceleran la velocidad de las reacciones, no incrementan la cantidad de producto formado (Wilbrahm and Matta, 1989).

Tanto la peroxidasa como la polifenoloxidasas catalizan la oxidación de fenoles propios de las células vegetales a quinonas, las cuales son altamente reactivas con proteínas, ácidos nucleicos, flavonoides y otras quinonas; estas reacciones generan colores pardos (Baquero *et al.*, 2005) que se observan en el jugo de fique cuando se descompone.

El desarrollo de colores pardos es el indicador de actividad de POD y de PPO en el jugo de fique, pero no se ha establecido claramente cuál de las dos enzimas ocasiona este efecto desagradable en el producto. Por lo tanto, el control de su actividad mediante métodos físicos como la pasteurización es un buen indicador del proceso y centraremos el estudio a estas dos enzimas.

Las peroxidasas (EC 1.11.1.7) son hemoproteínas (Carvalho *et al.*, 2003; Duarte-Vásquez *et al.*, 2003), monoméricas, glicosiladas y contienen un grupo prostético heme (Polata *et al.*, 2009) que caracteriza la oxidación de una amplia variedad de sustratos entre los que se encuentran fenoles (guayacol, p-cresol), aminas

aromáticas (anilina, o-dianisidina) y algunos otros compuestos orgánicos en presencia de peróxido de hidrógeno (Yemenicioglu *et al.*, 1998). La ecuación estructural general de la reacción con guayacol se observa en la figura 7.

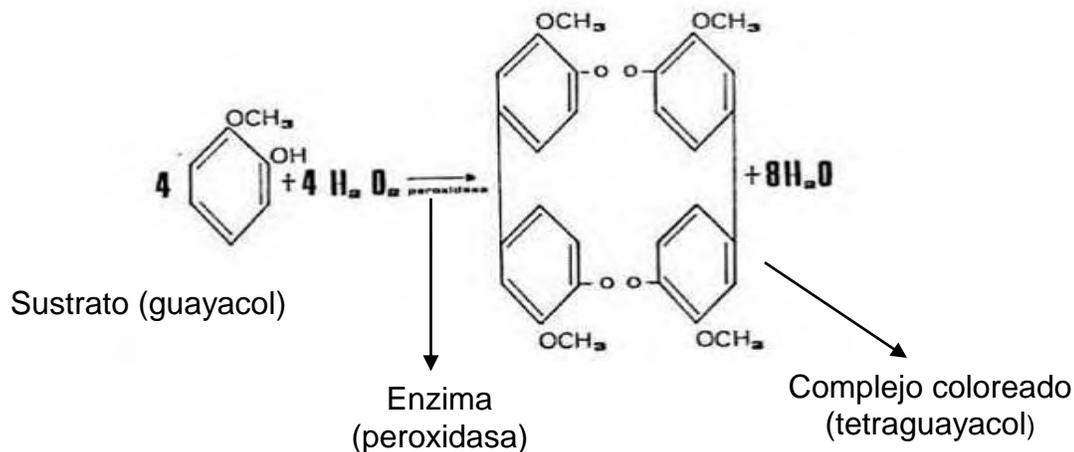


Fig 7. Ecuación estructural de la reacción de la peroxidasa. Fuente: Schmidt and Pennacchiotti, 2001

Las POD están ampliamente distribuidas en las plantas y juegan un importante papel en numerosos procesos fisiológicos como el control de crecimiento y diferenciación celular, la polimerización de alcoholes a lignina y reacciones de detoxificación de H_2O_2 (Estrada *et al.*, 2000). Además es responsable de las propiedades mecánicas de las paredes celulares durante la extensión, adhesión de células y resistencia a enfermedades (Tijskens *et al.*, 1997).

Se consideran de gran importancia en la industria de productos vegetales debido a que las reacciones que cataliza producen sabores y colores desagradables en los productos crudos antes del procesamiento térmico (López *et al.*, 1994).

Al contrario de otras enzimas que son inactivadas completamente por el calor, la POD permanece activa después del tratamiento térmico. Por ello, la actividad de esta enzima en muchas industrias es utilizada como indicador de la eficiencia del proceso y para monitorear la estabilidad del producto procesado (Machado and Saraiva, 2002; Luiz *et al.*, 2007).

La alta estabilidad térmica de la POD puede verse como una ventaja o un problema. Por un lado, provee un margen natural de seguridad en el cual, si la enzima es inactivada, puede suponerse razonablemente que otras enzimas relacionadas con el deterioro de calidad de los zumos vegetales también han sido inactivadas. De otro lado, la confianza sobre la POD como indicador puede llevar a un excesivo tratamiento térmico del producto y causar otros problemas (Anthon and Barrett, 2002; Serrano-Martínez *et al.*, 2008).

La inactivación térmica de POD generalmente ocurre en estado bifásico debido a la presencia de isoenzimas con diferentes estabilidades térmicas; la estabilidad de diferentes isoenzimas varía con la proporción del donador de sustrato y de hidrógeno; los donantes de hidrógeno más utilizados son guayacol, pyrogallol y o-dianisidina (Soysal and Soylemez, 2005).

La polifenoloxidasa (PPO) es una oxido reductasa que contiene cobre y cataliza dos reacciones distintas que involucran compuestos fenólicos y oxígeno molecular: (a) la o-hidroxilación de monofenoles a difenoles o actividad cresolasa (monophenol, mono oxigenase; EC 1.14.18.1) y (b) la posterior oxidación de o-difenoles a o-quinonas o actividad catecolasa (difenoil oxígeno óxidoreductasa; EC 1.10.3.1), lo que conduce a la formación de complejos de color pardo (Gawlik-Dziki *et al.*, 2008; Polaina and MacCabe, 2007; Dalmadi *et al.*, 2006).

Se encuentra ampliamente distribuida en la escala filogenética, encontrándose tanto en organismos procariotas como eucariotas y en el reino vegetal, siendo detectada en algas, briófitas, pteridófitas, gimnospermas y angiospermas (Mayer, 2006).

Esta enzima es responsable de las reacciones de pardeamiento enzimático que ocurren durante el almacenamiento, manipulación y procesamiento de frutas y hortalizas (Gasull y Becerra, 2006).

La descripción gráfica de su reacción se puede apreciar en la figura 8.

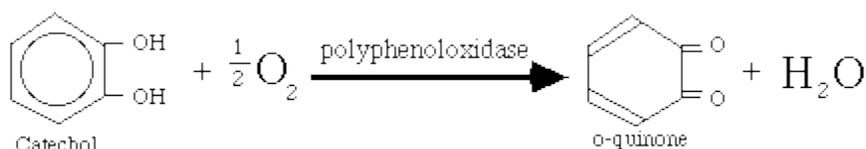


Fig 8. Ecuación estructural de la reacción de la polifenoloxidasasa

Fuente: Koning, 1994.

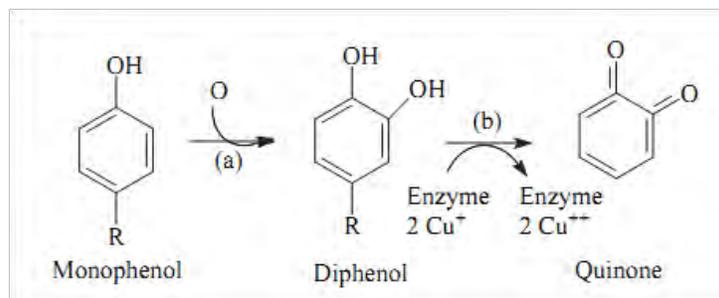


Fig 9. Reacciones de (a) hidroxilación y (b) oxidación catalizadas por PPO.

Fuente: Queiroz *et al.*, 2008

Su actividad es de una significativa importancia económica, particularmente en frutas y vegetales (Silva and Gibbs, 2004) por las pérdidas que ocasiona. Se ha podido identificar y caracterizar usando hojas y frutos de numerosas especies vegetales como fuente enzimática. Los niveles de la enzima varían dependiendo de la especie, cultivo, estado de maduración y estado fenológico (Mayer, 2006).

La actividad de la enzima PPO y el control del pardeamiento que produce, pueden controlarse por calentamiento (Guerrero *et al.*, 2005), utilizando métodos químicos (agentes antioxidantes) y otros tratamientos físicos como la presurización (Dalmadi *et al.*, 2006).

1.9 TEMPERATURAS DE INACTIVACIÓN DE LAS ENZIMAS PEROXIDASA Y POLIFENOLOXIDASA

En general, la exposición de PPO y POD a temperaturas entre 70–90°C destruye su actividad catalítica, pero el tiempo necesario para inactivación depende del producto (Queiroz *et al.*, 2008; Anthon y Barrett, 2002).

En su estudio sobre cinética e inactivación de peroxidasa de zanahoria var. Chantenay, Soysal y Söylemez (2005) reportaron la presencia de dos fracciones de POD, una termolábil y una termo resistente. El tratamiento térmico se llevó a cabo en un rango de temperaturas entre 35 – 75 °C. Se encontró en el estudio que el tratamiento térmico a 75 °C durante 10 minutos inhibió la actividad de la enzima.

La reactivación de POD en brócoli se estudió en un capilar de 200 µL y con una concentración de enzima tal que produjera una tasa de reacción constante durante 2 minutos con la POD utilizando guayacol como sustrato. El tratamiento térmico se realizó a temperaturas entre 50 y 80 °C en un baño de agua y de 80 a 100 °C en un baño de aceite. Se concluyó que la reactivación de POD fue variable para cada tipo de isoenzima estudiada (Thongsook y Barrett, 2005).

En hojas de menta, Rudra *et al.*, (2008), mostraron que todas las temperaturas utilizadas (70 – 100 °C) lograban una completa inactivación de la enzima.

La inactivación térmica de PPO de uvas fue ensayada a diferentes temperaturas en el rango entre 25°C y 90°C durante 10 min. El calentamiento durante diez minutos a 60°C redujo la actividad enzimática en extracto de uvas Victoria al 50%. La enzima fue inactivada casi por completo a 70°C después de 10 minutos de tratamiento térmico (Rapeanu *et al.*, 2006).

En la investigación sobre estabilidad térmica de PPO de taro y papa, Duangmal y Owusu Apenten, (1999) concluyeron que al calentar el extracto a 70°C durante 10 minutos se inactivó completamente la enzima en ambos productos. Los autores atribuyeron esta considerable caída en la actividad de PPO a alta temperatura, a los cambios en la estructura terciaria de la enzima.

También se ha estudiado la inactivación térmica de PPO en habichuelas, y como resultado se encontró que más del 95% de la PPO fue inactivada cuando se trataron térmicamente a 95°C por 5 min (Guo *et al.*, 2009).

Morales- Blancas *et al.*, (2002) utilizaron temperaturas entre 70 y 95°C durante tiempos de exposición entre 15 y 600 s (10 minutos) para inactivar la POD en brócoli, espárrago y zanahoria; Thongsook y Barrett, (2005) manejaron temperaturas entre 50 y 100 °C durante tiempos de 0 a 10 minutos en brócoli; Anthon and Barrett, (2002) trabajaron temperaturas entre 60 y 85°C durante 0 a 15 min para inactivar ambas enzimas en zanahorias y papas; Ndiaye *et al.*, (2009) trabajaron con temperaturas de 94 ± 1°C durante 0, 1, 3, 5 y 7 min para inactivar PPO en mango.

Para la misma enzima, Duangmal y Owusu-Apenten, (1999) incubaron las soluciones enzimáticas de taro y papa en tubos Eppendorf a varias temperaturas en baño de agua (30, 40, 50, 60, 70°C) por 10 min. Chutintrasri y Noomhorm, estudiaron la inactivación térmica de PPO de piña y encontraron que la actividad residual de la enzima fue 7% después de 5 min a 85°C y 1,2% después de 5 min a 90°C. Se observó el mismo perfil en uva Napoleón, al tratar térmicamente durante 5 minutos a temperaturas entre 30 y 100°C. De 70 a 80°C, 20% de la actividad se mantuvo y a 100°C, se llegó a la inactivación total.

Chutintrasri y Noomhorm, (2005) estudiaron la inactivación térmica de PPO de piña, y encontraron que la desnaturalización de la enzima se incrementaba rápidamente por encima de los 75°C. La actividad residual fue de 7% luego de 5

min a 85°C y 1.2% después de 5 min a 90°C. El mismo comportamiento se observó en uva Napoleón cuando la enzima PPO se calentó durante 5 min a temperaturas entre 30 y 100°C. De 70 a 80°C, 20% de actividad permaneció y a 100°C, se alcanzó total inactivación (Nuñez-Delicado *et al.*, 2007). En uva Victoria, la inactivación total de la PPO, se reportó luego de 10 min a 70°C (Rapeanu *et al.*, 2006). Valderrama *et al.* (2001) obtuvieron inactivación total de PPO de manzana después de 10 min de tratamiento a 75°C.

Jasso de Rodriguez *et al.*, (2005) trataron el jugo de Aloe vera durante 30 minutos a 65°C para probar su eficacia como bioinsumo, pero no reportan medida de actividad enzimática en el mismo; Pantoja y Latorre (2011) afirman que el jugo de fique tratado durante 4 minutos a 75°C inhibió el crecimiento micelial de *Phytophthora infestans*, *in vitro* y que la actividad enzimática del jugo disminuyó satisfactoriamente en estas condiciones.

1.10 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE POD Y PPO

Algunos sustratos y productos de las reacciones enzimáticas tienen una absorbancia en la región visible o UV del espectro. Debido a ello, los procedimientos espectrofotométricos son los escogidos para mediciones de una amplia variedad de actividades enzimáticas (Roe, 2001), entre las que se cuentan la POD y la PPO.

Luego de mezclar los reactivos, se miden continuamente los cambios en las características del sustrato o del producto, a través de un sistema de registro que muestre la curva de progreso de la reacción (Roe, 2001).

Es importante controlar la temperatura, el pH y la fuerza iónica de la reacción ya que estas variables pueden afectar el ensayo enzimático. Por lo tanto, la reacción debe llevarse a cabo en un recipiente termostatado y la temperatura debe siempre especificarse. El pH de la mezcla de reacción debe estar en un sistema

tamponado compatible con la molécula reactiva, y en una concentración del buffer que permita amortiguar los cambios en el pH que surjan durante la reacción (Roe, 2001).

Es conveniente preparar los sustratos en soluciones buffer que tienen un pH cercano al óptimo para cada enzima (6 a 7 en el caso de POD y PPO) y a temperatura de 4°C (Thongsook y Barrett, 2005) para controlar la actividad previa a la medición.

La concentración de las soluciones tampón es un factor importante para evitar la desnaturalización de la proteína durante el ensayo. Las más utilizadas varían entre 0,1 y 0,2 M (Roe, 2001).

Para POD el sustrato más utilizado es guayacol en presencia de peróxido de hidrógeno, a una temperatura de 25°C (Zhong *et al.*, 2007; Rodrigo *et al.*, 1996; Halpin *et al.*, 1989; Sessa y Anderson, 1981). La actividad enzimática de la peroxidasa se cuantifica normalmente como el incremento de la absorbancia (Δ Abs) a 470 nm, medido durante intervalos de tiempo variables. Su actividad se define como el cambio de 0,001 unidades de absorbancia por minuto, sobre la región lineal de la curva (Gonçalves *et al.*, 2009; Mdluli, 2005).

En PPO la actividad se mide usualmente por el incremento en la absorbancia (Δ Abs) a 420 nm a temperatura de 25°C utilizando como sustrato catecol (Ndiaye *et al.*, 2009; Gawlik-Dziki *et al.*, 2007; Duangmal y Owusu Apenten, 1999). La unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que provoca un cambio de absorbancia de 0,001 unidades por minuto. La tasa inicial se calcula a partir de la pendiente de la parte inicial de la curva absorbancia-tiempo (Guo *et al.*, 2009; Mdluli, 2005).

2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.1 DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGÍA

A continuación se muestra el diagrama de flujo que resume la metodología utilizada durante el desarrollo del proyecto

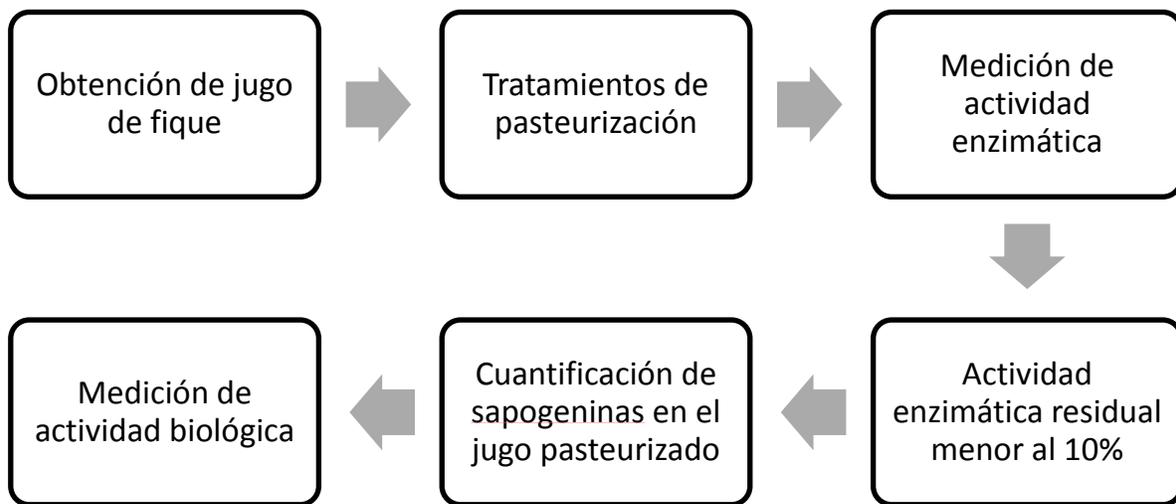


Fig. 10. Diagrama de flujo de la metodología

2.2 OBTENCIÓN DEL JUGO DE FIQUE.

El jugo de fique se extrajo a partir de pencas de variedad Negra Común procedentes del municipio de El Tambo (Nariño). Las pencas fueron lavadas y desinfectadas con solución 50 ppm de hipoclorito de sodio antes de ser procesadas. Posteriormente se extrajo el jugo en el equipo de extracción (trapiche) mostrado en la figura 11 en la Planta Piloto de la Facultad de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de Nariño. Una vez obtenido, el jugo se filtró en tamices malla 300 y se almacenó en congelación (-23°C) con el propósito de evitar su degradación.



Fig 11. Equipo utilizado para la extracción de jugo de fique.

2.3 METODOLOGÍA PARA LA APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS TÉRMICOS

Se trabajó la metodología desarrollada por Anthon y Barrett (2002), que consiste en colocar el jugo en tubos capilares de vidrio (Longitud $75 \pm 1,5$ mm; diámetro interno 1,1-1,2 mm; diámetro externo 1,4 -1,6 mm; espesor de paredes $0,2 \pm 0,02$ mm; capacidad volumétrica 75-80 μ L); se utilizaron tubos microhematocrito que cumplen con las condiciones dadas. Esto permite minimizar el tiempo de subida (Come up time o CUT por sus siglas en inglés), y de proceso, para evitar la degradación de los compuestos de interés (Fellows, 1994).

Los tubos capilares se colocaron en un baño termostatado (Eyela OSB 2000) con precisión de $0,1^{\circ}\text{C}$. Debido a la imposibilidad de medir la temperatura del jugo dentro de los tubos, se tomó como referencia un tiempo de subida de 10 segundos (Anthon y Barrett, 2002) para considerar que el jugo se encontraba a la misma temperatura del baño. Así, el tiempo de tratamiento necesario se comenzó a medir luego de los 10 segundos de inmersión.

Las muestras una vez calentadas por el tiempo especificado, se transfirieron inmediatamente a un baño de agua-hielo a temperatura de 2°C con el fin de someterlas a un brusco choque térmico (Thongsook y Barrett, 2005).

Estas muestras se analizaron inmediatamente para medir la actividad enzimática residual.

2.3.1 Tiempos y temperaturas usadas. Las condiciones de los tratamientos térmicos se tomaron con base en estudios realizados previamente por diferentes autores para inactivar las enzimas POD y PPO, en otros productos vegetales debido a la casi inexistente información en jugo de fique.

Se trabajó a temperaturas entre 70 y 80°C durante tiempos variables de 1 a 6 minutos de tratamiento, para lograr una disminución en la actividad residual de las enzimas equivalente al 10% de su actividad inicial, parámetro aceptado universalmente como de un tratamiento de pasteurización correcto (Osorio *et al.*, 2008).

2.3.2 Diseño experimental. Se aplicó un diseño experimental factorial multinivel, con 2 factores experimentales (tiempo y temperatura), con tres bloques experimentales, 2 variables de respuesta (Actividad de POD y PPO) y 60 corridas experimentales. En la tabla 3 se aprecia el resumen de los tratamientos realizados. El orden de los experimentos fue totalmente aleatorizado.

Tabla 3. Resumen del Diseño Experimental Factorial Multinivel para los Tratamientos Térmicos

Factores	Bajo	Alto	Niveles	Unidades
Temperatura	70	80	5	°C
Tiempo	1	6	4	min

2.4 PROTOCOLOS DE EXTRACCIÓN ENZIMÁTICA

La obtención del extracto enzimático se llevó a cabo siguiendo el procedimiento de Gonzales *et. al.*, (2000), con algunas modificaciones.

Peroxidasa: Se centrifugaron 5 mL de jugo con 5 mL de buffer fosfato 0,05M pH 6,5 y Tritón X-100 al 1,5% respecto al buffer, a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se utilizó como extracto enzimático.

Polifenol Oxidasa: El jugo se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 4°C; se recogieron 25 g de precipitado el cual se reconstituyó en 75 mL de buffer fosfato 0,05M pH 6,5 con PVPP al 2% y Tritón X-100 al 1,5% respecto al buffer y se centrifugó a 8000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante recolectado se utilizó como extracto enzimático.

Las centrifugaciones se llevaron a cabo en una centrífuga refrigerada Thermo IEC Multi RF, que se muestra en la figura 13.



Fig 12. Centrífuga refrigerada.

En la figura 13 se muestra el aspecto del extracto enzimático luego de la centrifugación.



Fig 13. Extracto enzimático.

2.5 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RESIDUAL

La actividad de POD fue determinada aplicando el método propuesto por Morales-Blancas (2002) con algunas modificaciones; se preparó diariamente una solución sustrato con 99,8 mL de buffer fosfato 0,1 M pH 6,5, al cual se añadieron 0,1 mL de guayacol al 98% y 0,1 mL de H₂O₂ al 30%. De esta solución sustrato se tomó 3,48 mL y se mezcló con 120 µL de extracto.

En PPO la actividad se determinó siguiendo la metodología propuesta por González *et al.*, (2000) consistente en 2,7 mL de solución 0,1 M de catecol en buffer fosfato de sodio 0,2 M; pH 6,5 con 0,3 mL de extracto enzimático.

La actividad enzimática se determinó como el cambio de absorbancia por min (Δ Abs/min) bajo las condiciones de ensayo a 25°C, a longitudes de onda de 470 nm para POD y 420 nm para PPO; para ambas enzimas se utilizó como blanco el buffer de reacción (sin extracto enzimático). El aumento de absorbancia se midió en un espectrofotómetro Genesys 10 UV – VIS con escaneo de 6 celdas, acoplado a un computador con ayuda del software Thermo Vision Lite, mostrado en la figura 14.



Fig 14. Espectrofotómetro utilizado en la medición de actividad enzimática.

La actividad de cada enzima se calculó sobre la base de la pendiente de la porción lineal de la curva de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$. En la mayoría de las reacciones enzimáticas que se llevan a cabo *in vitro*, la concentración de enzima es mucho menor que la concentración de los sustratos, debido a la alta actividad catalítica de las enzimas. Por lo tanto, con el progreso de la reacción enzimática su velocidad disminuye gradualmente debido al agotamiento del sustrato; por eso, siempre es necesario determinar una tasa inicial de reacción, que es igual a la línea tangente a la curva de avance de la reacción a tiempo cero o velocidad inicial v_0 (Leskovac 2004), como se muestra en la figura 15.

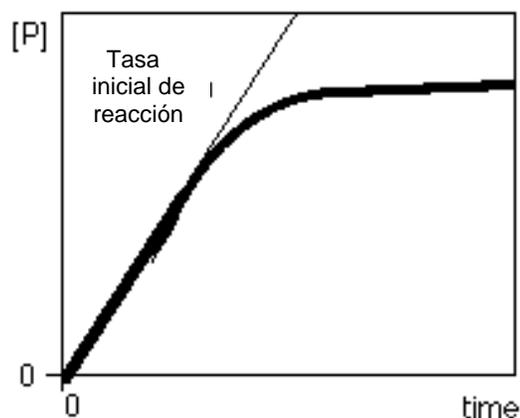


Fig 15. Cálculo de la Actividad enzimática.

Fuente: González-Mañas (2011)

Una unidad de actividad de enzimática se definió como el incremento de 0,001 en la absorbancia por minuto por mililitro de extracto enzimático [$\Delta A \text{ min}^{-1} (\text{ml de extracto})^{-1}$]. La actividad residual de cada enzima se expresó como la razón porcentual entre la muestra tratada y la muestra sin tratamiento (Ndiaye *et al.*, 2009), de acuerdo con la ecuación 1.

$$\% \text{ AR} = (A/A_0) * 100$$

Ec 1. Cálculo de la Actividad enzimática residual

Donde

A = actividad enzimática después del tratamiento térmico (Abs/min) y

A₀ = actividad enzimática antes del tratamiento térmico (Abs/min)

%AR = Porcentaje de Actividad residual de cada enzima

2.5.1 Medición de Actividad Enzimática y Actividad Enzimática Específica de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO). Para verificar la importancia relativa de cada enzima sobre el pardeamiento del jugo de fique, se midió la actividad de cada enzima, y se calculó su actividad específica de acuerdo con la ecuación 2, propuesta por Ndiaye *et al.* (2009).

$$\text{Actividad Enzimática Específica} = \frac{\Delta Abs}{\text{min} * (\text{mL de extracto enzimático})}$$

Ec. 2. Cálculo de Actividad enzimática específica

2.5.2 Medición de Actividad Enzimática Residual de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO) en el jugo tratado térmicamente. Se calculó el valor promedio de Actividad Inicial (A₀) de las respectivas enzimas el cual se utilizó para el cálculo de las actividades residuales para cada tratamiento térmico aplicado, mediante la ecuación 1. Los resultados se consignan en la tabla A3 (Anexo).

Los resultados sirven para deducir qué tratamiento térmico deberá aplicarse con el fin de reducir hasta cerca de un 10% la actividad enzimática residual de cada enzima.

2.6 MEDICIÓN DE LOS CONTENIDOS DE SAPOGENINAS EN EL JUGO DE FIQUE POR HPLC

Se utilizó la metodología propuesta por Rojas *et al.*, (2010) con algunas modificaciones. La medición de contenidos de Sapogeninas se realizó en el jugo de fique sin tratar y en el tratado para verificar si hubo disminución en su contenido.

2.6.1 Hidrólisis. El jugo tratado térmicamente se combinó con 15 mL de HCl concentrado, se sometió a reflujo durante 1 a 4 horas hasta la aparición de un precipitado marrón. Se dejó decantar por 1 hora y se eliminó parte del sobrenadante hasta obtener unos 60 mL. Las sapogeninas se extrajeron con 30 mL de cloroformo, repitiendo 3 veces la extracción; luego se evaporó la fracción de cloroformo. El residuo fue el crudo de sapogeninas.

2.6.2 Purificación. El crudo de sapogeninas se disolvió en acetonitrilo caliente y se sometió a ultrasonido por 10 minutos, se adicionó carbón activado y se filtró al vacío para eliminar los colorantes. Luego se evaporó el filtrado y el residuo (cristalizado de sapogeninas) se disolvió en 5 mL de acetonitrilo con aplicación de 15 minutos de ultrasonido para garantizar la solubilidad total.

Esta solución se purificó mediante SPE C18 para eliminar contaminantes y se filtró con acrodisk de HVHP 0,45 μ m para luego inyectar al equipo HPLC-PDA (Cromatógrafo Breeze 2 Waters con bomba binaria 1525 y Detector PDA 2998 operado con el software Empower 2,0 (Waters, USA)).

2.6.3 Método de medición. Una vez escogido el tratamiento de pasteurización se dispuso a probar si el jugo así tratado sufría alguna modificación en su contenido de sapogeninas, específicamente de hecogenina.

Se utilizó una columna analítica Spherisorb® 5µm C8 4,6x100mm; 5 µm id. Como fase móvil se utilizó Acetonitrilo:Agua (60:40) con una tasa de flujo de 0,75 mL/min. La detección se hizo a longitudes de onda de 235 nm y 203 nm. La inyección fué de 20µL loop a 30°C. Como disolvente se utilizó Acetonitrilo. La comparación se realizó con estándar de Hecogenina Sigma 90% (10, 20, 40, 60 y 100 ppm).

Se hicieron dos pruebas utilizando como solvente metanol (Muestra 1) y acetonitrilo (Muestra 2), acorde con lo recomendado por Kite *et al.*, (2007).

2.7 MEDICIÓN DE LA ACCIÓN INHIBITORIA DEL JUGO DE FIQUE *IN VITRO* Y DISEÑO EXPERIMENTAL

2.7.1 Aislamiento de *Ascochyta pisi* y *Mycosphaerella pinodes*. Los hongos se aislaron a partir de hojas y vainas de plantas de arveja afectadas en épocas cercanas a la senescencia. El material obtenido en campo se transportó en cámara húmeda consistente en papel secante húmedo y en bolsas de papel aluminio; en el laboratorio se lavó con agua destilada y se cortó en trozos de aproximadamente 5 mm. Posteriormente se desinfectó con solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 30 minutos y se lavó nuevamente con agua destilada (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005).

Los aislamientos fueron transferidos asépticamente a cajas Petri con medio PDA suplementado con rifampicina 100 ppm e incubados a la oscuridad durante 7 a 10 días (Zhang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2007).

Una vez confirmada la identidad de los aislamientos, se procedió a realizar las pruebas correspondientes de sensibilidad *in vitro* del patógeno al bioinsumo.

2.7.2 Medición de la acción inhibitoria del jugo de fique tratado térmicamente sobre el complejo *Ascochyta*. Se utilizó la metodología propuesta por Shattock

et al., (1990); Deahl y Delmuth, (1993) y Álvarez *et al.*, (2011). El medio de cultivo conteniendo 20 mL de agar PDA se enmendó con el jugo tratado. Posteriormente se sembró en su superficie un disco de 5 mm de micelio fresco en el centro de cada placa petri. Se midió el diámetro del crecimiento micelial del hongo en un periodo de 8 días después de la siembra incubadas en oscuridad.

2.7.3 Evaluación in vitro de la actividad del bioinsumo de fique sobre el complejo Ascochyta. Inicialmente, fue necesario establecer el periodo adecuado para realizar los tratamientos. Durante 8 días se evaluó el crecimiento del patógeno en diversas concentraciones del jugo de fique pasteurizado (10.000, 1.000, 100 y 10 mg de jugo/Litro) y el control negativo (0).

El porcentaje de crecimiento se comparó contra el control negativo utilizando la ecuación 3.

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{CMJFi}{CMCi} \times 100\%$$

Ec 3. Medición del porcentaje de crecimiento micelial

Donde

CMCi = Crecimiento micelial del control negativo el día i

CMJF = Crecimiento micelial del medio enmendado con jugo de fique el día i

La actividad anti fúngica se evaluó midiendo el área de la zona de crecimiento micelial alrededor del disco. Para la medición de diámetros se utilizó el software Image J (Rasband, 2004).

2.7.4 Diseño experimental. Para el análisis de los datos se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) con cuatro repeticiones en donde se trabajó con concentraciones de 0; 10, 100, 1000 y 10000 mg de jugo tratado térmicamente/Litro de solución. Los valores de las dosis de trabajo fueron tomadas

de los ensayos previos realizados en *Phytophthora infestans* (Álvarez *et al.*, 2010; Pantoja y Latorre, 2010), así como de extractos de saponinas de otras plantas (Chapagain *et al.*, 2007).

El factor experimental a estudiar fue la concentración de jugo de fique y la variable de respuesta fue el porcentaje de crecimiento del hongo, calculado de acuerdo con la ecuación 2. La unidad experimental se definió como la caja petri sobre la cual se llevó a cabo la medición del área de crecimiento micelial. Se realizaron 5 repeticiones en distintos periodos de tiempo.

Para verificar el efecto del jugo pasteurizado sobre el patógeno, se tomó lecturas diariamente durante 8 días, para determinar el día de mayor crecimiento del control negativo (0) y se hicieron 4 repeticiones para cada día.

Hecho esto, se procedió a comparar el efecto del bioinsumo con una fungicida comercial. Como control positivo se utilizó Benomyl a dos dosis recomendadas de 0,5 g/L y 1,0 g/L (Chapagain *et al.*, 2007).

Los datos obtenidos se analizaron mediante un ANAVA y prueba de comparación de medias de Tukey a un nivel de significancia del 0,05 mediante el programa estadístico Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2010).

2.7.5 Prueba de patogenicidad. Se realizó acorde con la metodología propuesta por Marulanda *et al.*, (2007) modificada, conocido como método de la herida. La unidad experimental se tomó como cada una de las vainas tratadas.

Vainas sanas, variedad Santa Isabel, recolectadas en cultivos comerciales, se lavaron y desinfectaron utilizando Hipoclorito de Sodio (0,5%) y luego enjuagadas con agua destilada y secas (Bernstein *et al.*, 1995). Posteriormente se realizaron cortes en forma de X con un bisturí, previamente esterilizado, en la superficie de las vainas.

El bioinsumo de fique pasteurizado en dosis de 100, 150, 225, 325, 450, 600, 775, 975 y 1000 (jugo puro) mL jugo/L de solución y el fungicida comercial (Benomyl) a concentración de $Q1 = 1,0 \text{ g L}^{-1}$ se aplicaron sobre la herida con la ayuda de un pincel. Sobre la vaina tratada se colocó un fragmento de medio PDA conteniendo micelio activo (diámetro 5 mm). Las vainas así inoculadas se almacenaron en cámara húmeda para realizar la evaluación durante 8 días; todas las pruebas se realizaron por cuadruplicado.

En la figura 16 se aprecia la secuencia de la metodología aplicada.

Fig. 16. Desarrollo de la metodología de la herida para prueba de patogenicidad



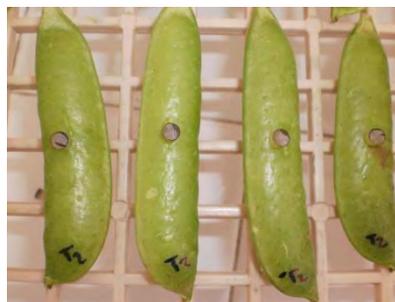
Paso 1. Realizar un corte en forma de X sobre la vaina



Paso 2. Preparar las diluciones de jugo de fique a utilizar



Paso 3. Aplicar el jugo sobre la herida de las vainas



Paso 4. Colocar el trozo de micelio activo sobre la herida

Fuente: Esta investigación

Las dosis aplicadas se seleccionaron teniendo en cuenta que la aplicación del bioinsumo directamente sobre las vainas sería menos efectiva que las pruebas *in*

vitro, de acuerdo con los resultados reportados anteriormente por Álvarez *et al.* (2010).

Para cuantificar la severidad de la infección, se utilizó la escala propuesta por Pacheco *et al.* (2011), con niveles de 0 a 9, donde 0 es ausencia de lesiones visibles; 1=1%, 3=5%, 5=15%, 7=25% y 9=50% o más del área de vaina afectada, medida con el software Image J.

2.7.6 Determinación de la concentración efectiva cincuenta (EC₅₀). Este valor se calculó determinando la concentración de jugo de fique capaz de inhibir el 50% del crecimiento radial, mediante análisis de regresión lineal (Chapagain *et al.*, 2007).

2.7.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC). La MIC para todos los experimentos se determinó como la mínima concentración del jugo que evitó el crecimiento del hongo, y se evaluó visualmente (Verástegui *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2005).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OBTENCIÓN DEL JUGO DE FIQUE

El jugo de fique se extrajo a partir de pencas de fique de la variedad negra común; posteriormente fue clarificado con los siguientes resultados:

Tabla 4. Rendimiento de jugo de fique

ACTIVIDAD	RESULTADO
Peso de las pencas (Kg)	20,6
Peso del bagazo (Kg)	11,2
Peso Jugo fresco extraído (Kg)	8,8
Jugo fresco (%)	42,72
Peso Jugo clarificado (Kg)	6,977
pH	4,5

La tabla 4 muestra que el contenido de jugo extraído corresponde al 42,72% del peso total de las pencas; este rendimiento es menor al reportado del 50% (Cadefique, 2006). Esto se explica por el diseño del equipo de extracción, que es diferente al de la máquina desfibradora utilizada en campo. Mientras que el equipo de desfibrado trabaja con agujas que desgarran las hojas, el equipo utilizado trabaja con masas o rodillos, que extraen el jugo por presión.

Una vez clarificado, el rendimiento total de jugo fue de 33,86% con respecto al peso total de las hojas. Esta fue la muestra que se utilizó para todas las pruebas con el fin de evitar la variación en los resultados. El pH medido indica que se trata de un producto medianamente ácido.

3.2 MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PEROXIDASA (POD) Y POLIFENOLOXIDASA (PPO)

Se midió la actividad del extracto enzimático crudo, que sirvió como Testigo Absoluto para calcular la actividad enzimática residual posterior a la aplicación de los tratamientos térmicos.

3.2.1 Medición de Actividad Enzimática del Testigo (jugo sin tratamiento). En la gráfica 1 se muestran las curvas de avance para la medición de actividad enzimática del testigo de POD a 470 nm y de PPO a 420 nm. Claramente se nota que la actividad de POD es mucho mayor que la de PPO, por lo que de inmediato se infiere que los problemas de pardeamiento que sufre el jugo de fique pueden atribuirse a la acción de la enzima peroxidasa, que se encuentra mucho más activa que polifenoloxidasas en el jugo.

El cálculo cinético se realizó en los primeros 4 minutos, que corresponde al 10% del tiempo total de reacción; los resultados de los valores promedio aparecen en la tabla 5.

El valor del coeficiente de correlación indica que la linealidad de la curva en el rango de trabajo es adecuada y puede considerarse esta como la velocidad inicial de la reacción. Puede apreciarse en la gráfica 1.

Gráfica 1. Curvas de avance de las reacciones enzimáticas del jugo sin tratamiento

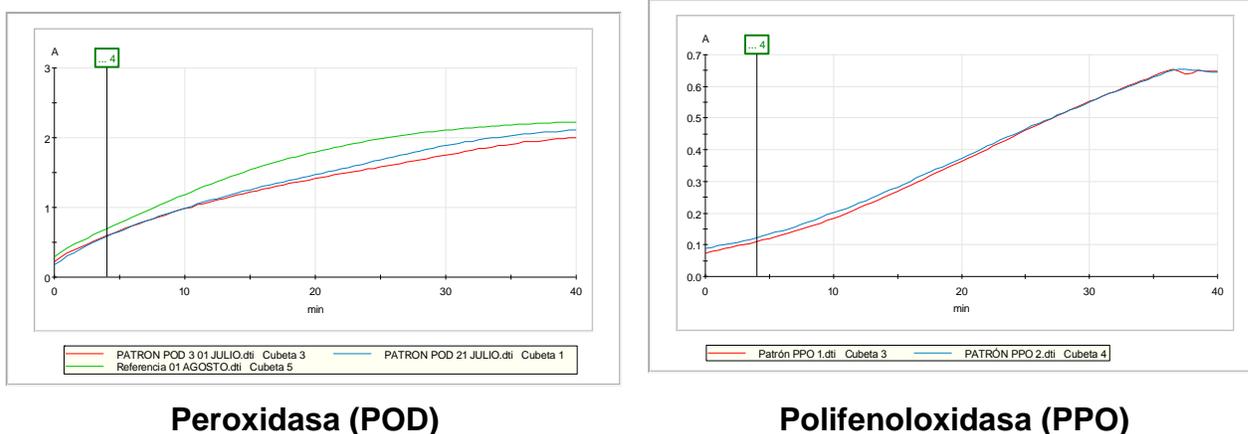


Tabla 5. Cálculo de la actividad enzimática patrón

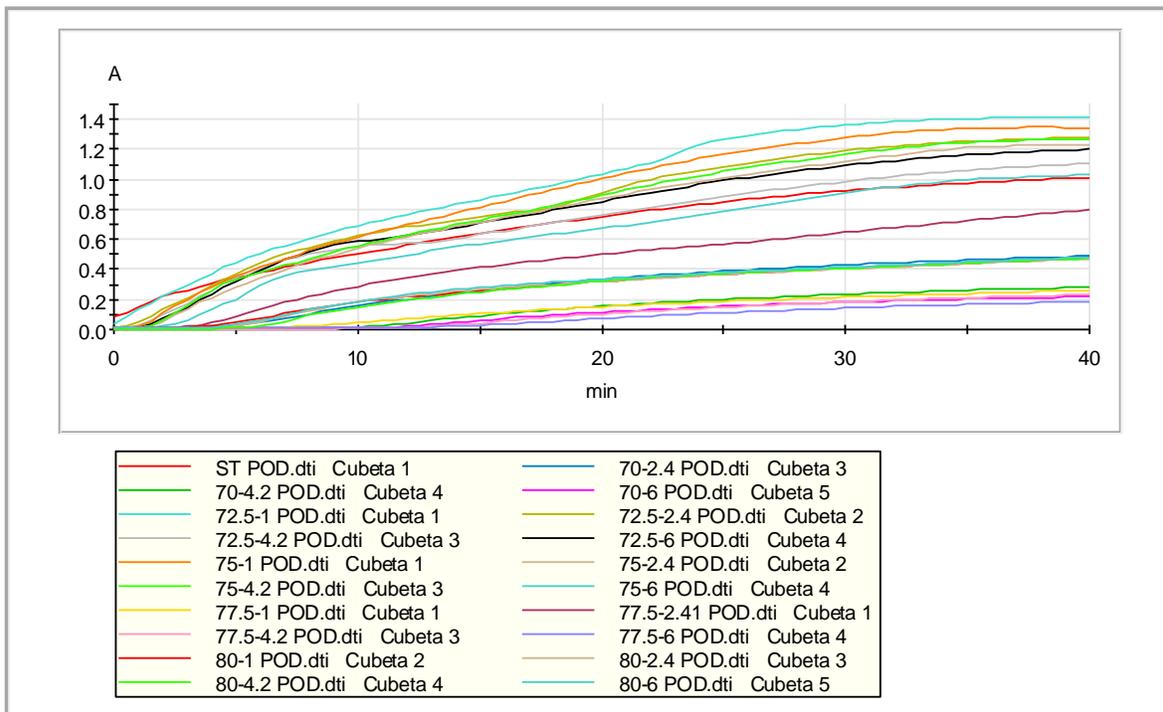
Curva	Coef. de Correlación	Pendiente (dA/min)
Patrón POD	0,99741	0,2553
Patrón PPO	0,9992	0,0346

3.2.2 Medición de Actividad Enzimática y Actividad Enzimática Específica de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasa (PPO). Los datos se reportan en las tablas A1 y A2 respectivamente, mostradas en los anexos.

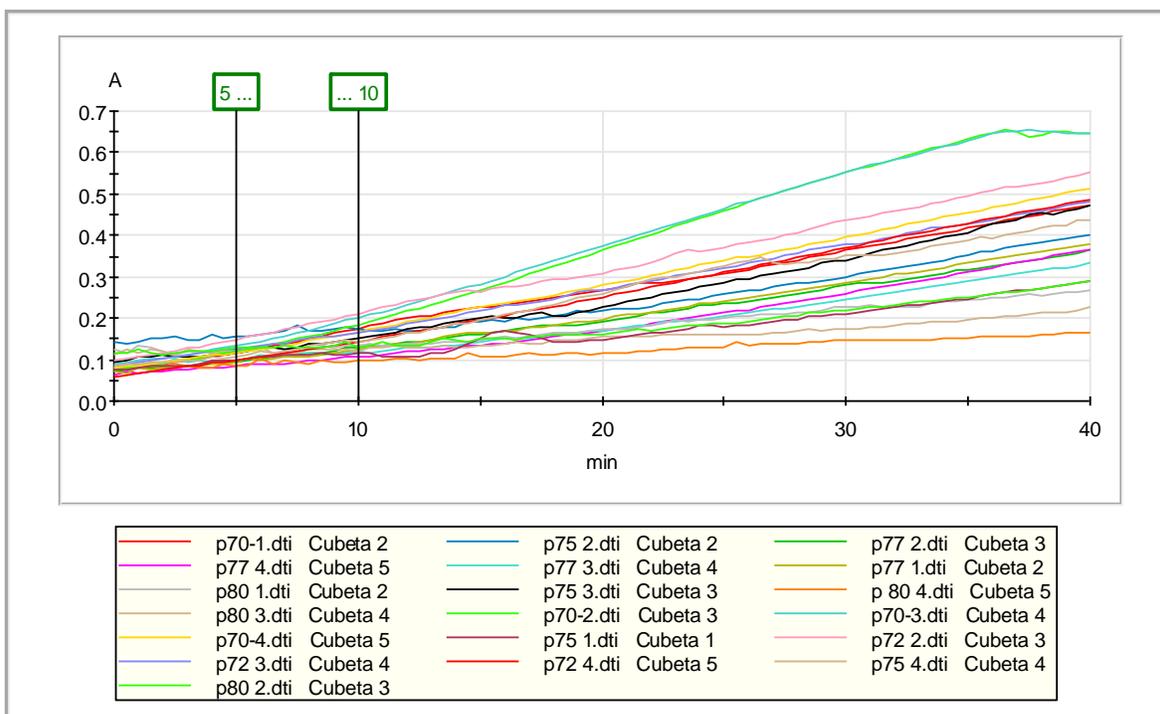
A partir de los datos de la tabla 5, se deduce claramente que la actividad enzimática de POD es más alta que la de PPO en el jugo, lo que lleva a teorizar que el pardeamiento puede estar influenciado principalmente por la POD, por lo cual su inactivación es más importante en el proceso térmico que la inactivación de PPO.

Para corroborar esta hipótesis, se muestra en las gráficas 2 y 3 las curvas de avance de la reacción enzimática para cada enzima, donde se aprecia la diferencia entre las curvas.

Gráfica 2. Curvas de avance de la reacción enzimática de POD



Gráfica 3. Curvas de avance de la reacción enzimática de PPO



Mientras las curvas de los estándares de peroxidasa alcanzan valores de absorbancia cercanos a 1,4 las curvas respectivas de polifenoloxidasas solo llegan a 0,6. Todo ello indica que la actividad de POD es mucho mayor que la de PPO, por lo cual la enzima a inactivar será indudablemente la primera.

También es evidente que todas las curvas correspondientes a los tratamientos térmicos tienen pendientes iniciales (a $t=0$) menores que aquellas de los testigos (Jugo sin tratamiento térmico). Esto se debe a que la coloración de las reacciones es más clara que la inicial, ya que la enzima ha sido parcialmente inactivada por efecto de la temperatura y no puede consumir todo el sustrato, que se encuentra en la misma cantidad que en el testigo.

En las figuras 17y 18 se aprecian las coloraciones respectivas de cada reacción. En ambos casos se nota que algunos tratamientos tienen una coloración más clara que el testigo respectivo, que es la evidencia de que el tratamiento está inactivando la enzima.

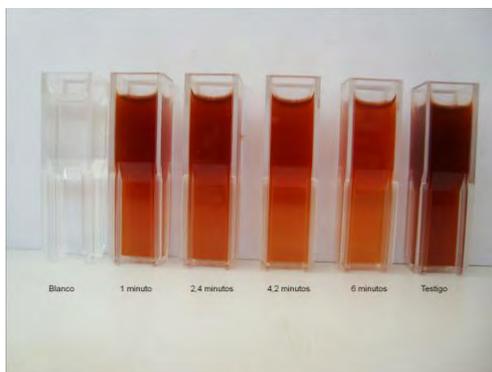


Fig. 17. Reacción de peroxidasa para un tratamiento a 70°C



Fig. 18. Reacción de polifenoloxidasas para un tratamiento a 70°C

Fuente: Esta investigación

La estrecha relación entre la actividad de las enzimas oxidativas POD y PPO, y su efecto sobre el pardeamiento de los productos, no ha sido muy estudiada. Sin embargo, Jiang *et al.* (2004), en su estudio sobre frutos de litchi, afirman que la aparición de pigmentos de color pardo, puede deberse a la actividad de ambas enzimas, siendo mayor el efecto que produce POD. Según los autores, aunque las dos enzimas y sus sustratos se encuentran en compartimientos subcelulares diferentes, diversos factores asociados con el envejecimiento del fruto y el deterioro de la función de la membrana, conllevan a la pérdida de compartimentación entre enzimas y sustratos, lo que deriva en pardeamiento.

Esta es, por lo tanto, la causa del rápido pardeamiento que se observa en el jugo, ya que el proceso de extracción rompe las membranas celulares, liberando las enzimas y sus sustratos y poniéndolas en contacto con oxígeno, lo que lleva a la oxidación y cambio de color en el jugo.

Resultados similares se han reportado en otros productos como aguacate y mango (Kahn, 1977; Robinson, Loveys, & Chacko, 1993).

3.2.3 Medición de Actividad Enzimática Residual de Peroxidasa (POD) y Polifenoloxidasas (PPO) en el jugo tratado térmicamente. Los resultados se consignan en la tabla A4 (Anexo). Estos sirven para deducir qué tratamiento

térmico deberá aplicarse con el fin de reducir hasta cerca de un 10% la actividad enzimática residual de cada enzima.

Es necesario anotar que, aunque las actividades de POD son mayores que las de PPO, al tratarse de una relación, las actividades residuales de ambas enzimas son comparables en magnitud y por lo tanto, es factible analizarlas juntas.

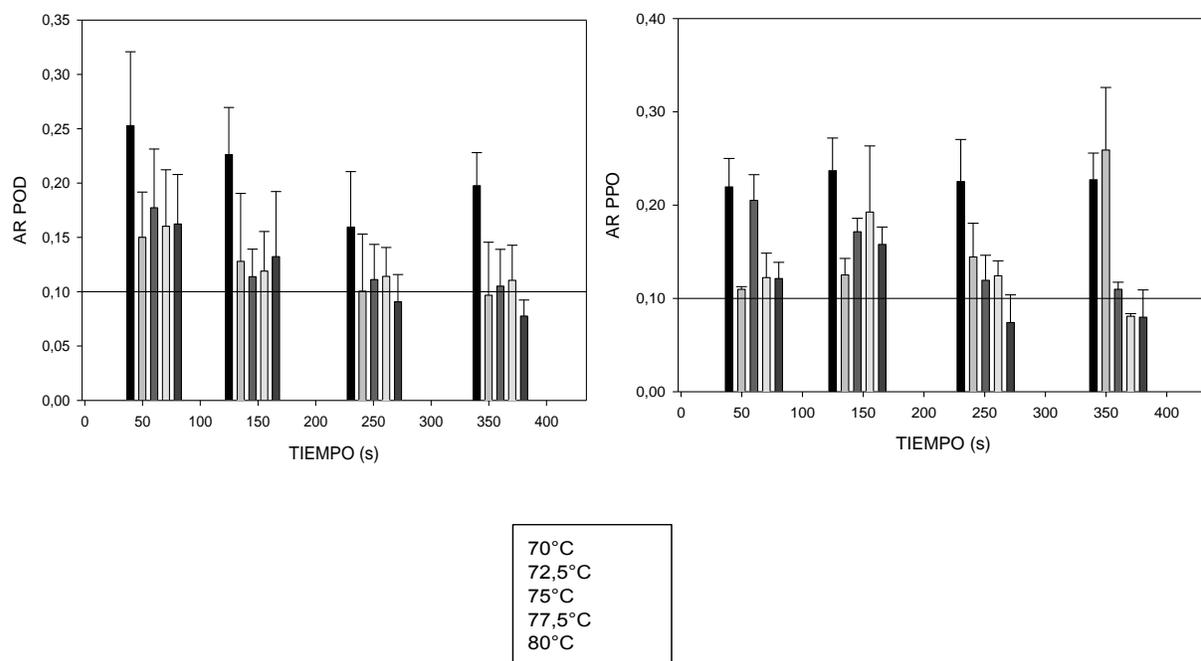
Un análisis preliminar indica que a partir de los 72°C la actividad de POD disminuye satisfactoriamente, es decir, que disminuye hasta un 25% – 30% de su actividad inicial. Sin embargo, en la PPO el resultado varía considerablemente.

No se observa un comportamiento consistente con el avance de la temperatura, ya que hay una disminución inicial después de los 70°C pero luego tiende a incrementarse en temperaturas superiores por tiempos cortos.

Este análisis se puede ver en la gráfica 4. Las líneas muestran la desviación estándar de los promedios de las actividades enzimáticas para cada tratamiento.

En las gráficas se puede apreciar que la actividad enzimática de POD es más alta a 70°C para todos los tiempos de tratamiento. A medida que la temperatura y el tiempo de tratamiento se incrementan, existe una tendencia a disminuir la actividad residual. Estos resultados concuerdan con los hallazgos de Agüero *et al.*, (2008). La aplicación de los tratamientos logró reducir la actividad inicial a valores inferiores al 25% de la actividad inicial.

Gráfica 4. Actividad Residual Enzimática de POD y PPO para distintos tratamientos



Gráfica de Actividad Residual de POD

Gráfica de Actividad Residual de PPO

Tradicionalmente se ha considerado que la POD es la enzima más termoestable en gran cantidad de frutos y zumos, por lo que su actividad residual es un indicador de la eficiencia del tratamiento térmico.

Agüero *et al.* (2008) afirman que la POD tiene dos isoenzimas: una fracción termolábil que se desnaturaliza a temperaturas bajas y una termoestable que se inactiva a temperaturas superiores a los 70°C. Thongsook y Barrett (2005) coinciden con esta aseveración ya que lograron la inactivación de peroxidasa en brócoli a temperaturas comprendidas entre los 70°C y 80°C, con una temperatura de inactividad cercana a cero a los 90°C.

Para PPO la actividad se redujo en aproximadamente un 30%. Aunque en los primeros intervalos de tiempo ensayados la tendencia no es muy clara, a partir de

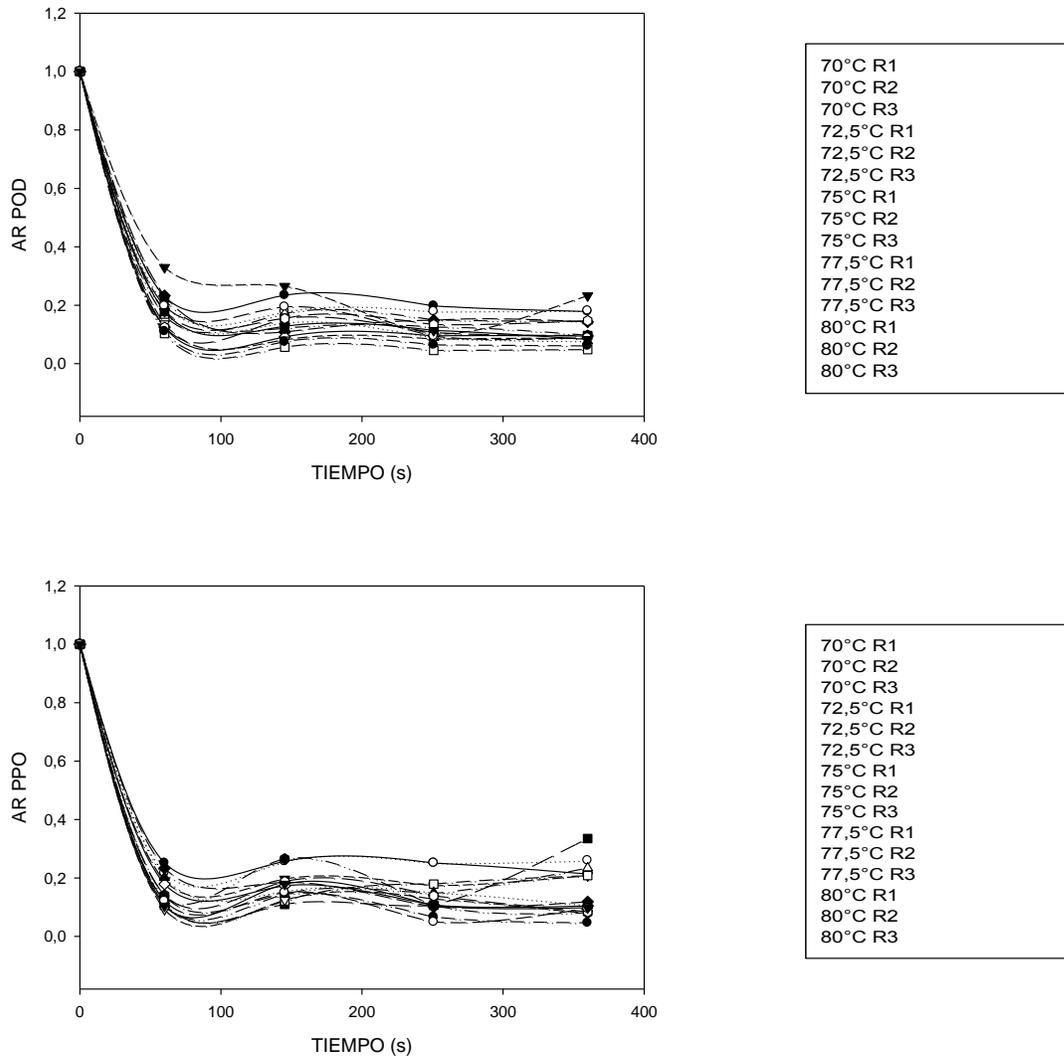
periodos de retención de 250,8 y 360 segundos, para las temperaturas ensayadas, la disminución de la actividad es notable. El único caso diferente se presenta a 72,5°C durante 360 segundos, donde se nota un incremento considerable de su actividad. La posible causa de este comportamiento puede atribuirse a la existencia probable de una fracción enzimática de PPO (isoenzima) termoestable.

Wesche-Ebeling & Montgomery (1990) y Dalmadi *et al.*(2005) reportan la existencia de dos fracciones de PPO en el extracto enzimático de fresa; similares resultados alcanzaron Yoruck & Marshall (2003) y Buckow *et al.* (2009) en manzanas. Este último afirma que al realizar el tratamiento térmico en extracto enzimático de PPO, se evidenció la presencia de dos fracciones de la isoenzima con distintas estabilidades térmicas.

En su estudio de inactivación térmica de PPO y POD en uva de mesa, Fortea *et al.* (2009), concluyeron que la inactivación parcial de ambas enzimas se logró dentro de un rango de temperaturas entre 70°C y 80°C, y tiempos máximos de 600 segundos de calentamiento.

En la gráfica 5 se muestra la tendencia de los datos de Actividad residual de POD y PPO, respectivamente, obtenidos en los experimentos para cada una de las corridas. Claramente se aprecia que los tratamientos aplicados disminuyen la actividad residual de las enzimas, tendiendo de manera asintótica a medida que avanza el tiempo de retención.

Gráfica 5. Actividad Residual de POD y PPO para todos los tratamientos y réplicas



Debido a que la cinética de inactivación es de tipo exponencial, es imposible con estos tratamientos lograr una inactivación total de las enzimas, por lo que siempre se debe tener en cuenta que existirá una actividad residual presente en el producto, que eventualmente contribuirá a su deterioro en el tiempo. Sin embargo, se espera que ese tiempo se prolongue al máximo si se logra disminuir la actividad hasta un 10% de su actividad inicial.

Con el fin de obtener una interpretación del proceso de inactivación térmica de ambas enzimas, se presenta a continuación las gráficas obtenidas por el procesamiento de los datos de inactivación para cada enzima y la tendencia que tiene cada una.

Se observa una tendencia exponencial de los datos. Aunque se ha estudiado ampliamente la cinética de inactivación enzimática de POD y PPO y se han propuesto distintos modelos para explicar satisfactoriamente su comportamiento, el modelo generalmente aceptado es que este proceso sigue una cinética de inactivación de primer orden dada por la ecuación 4:

$$AR = a * e^{-bt}$$

Ec 4. Ecuación de primer orden (Ludikhuyze *et al.* 1999)

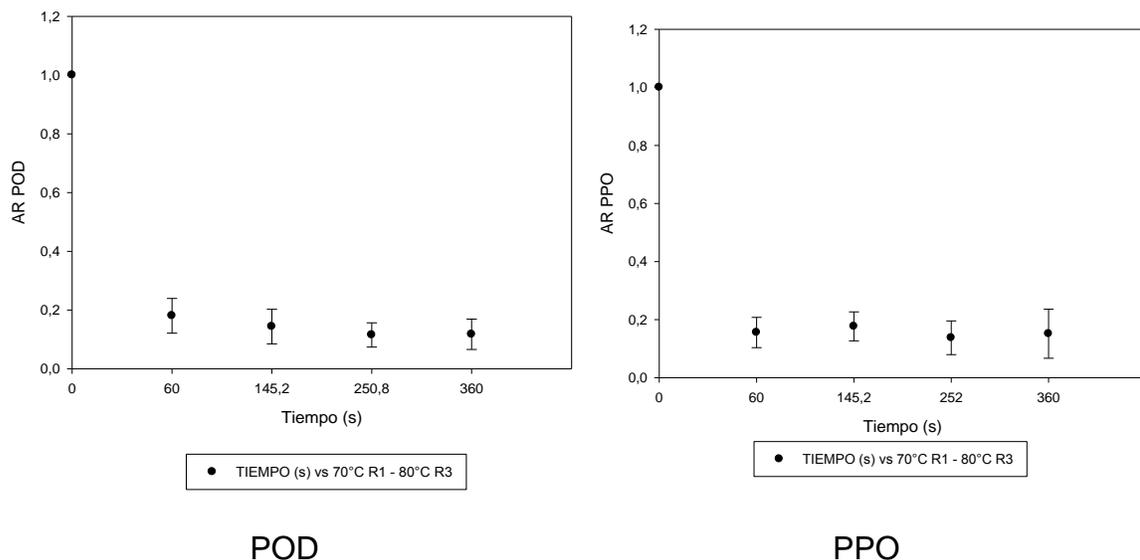
Donde

A = Actividad inicial

B = la constante de velocidad de reacción de primer orden

Este modelo se utilizó para describir la cinética de inactivación de POD y PPO, cuya tendencia se observa en la gráfica 6.

Gráfica 6. Tendencia de inactivación térmica para POD



El modelo matemático basado en una ecuación de primer orden arroja un coeficiente de determinación de 0,91 para POD y 0,859 para PPO, lo que indica que el ajuste de la curva es adecuado para POD, pero no para PPO, según se observa en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de la regresión no lineal de primer orden para POD y PPO

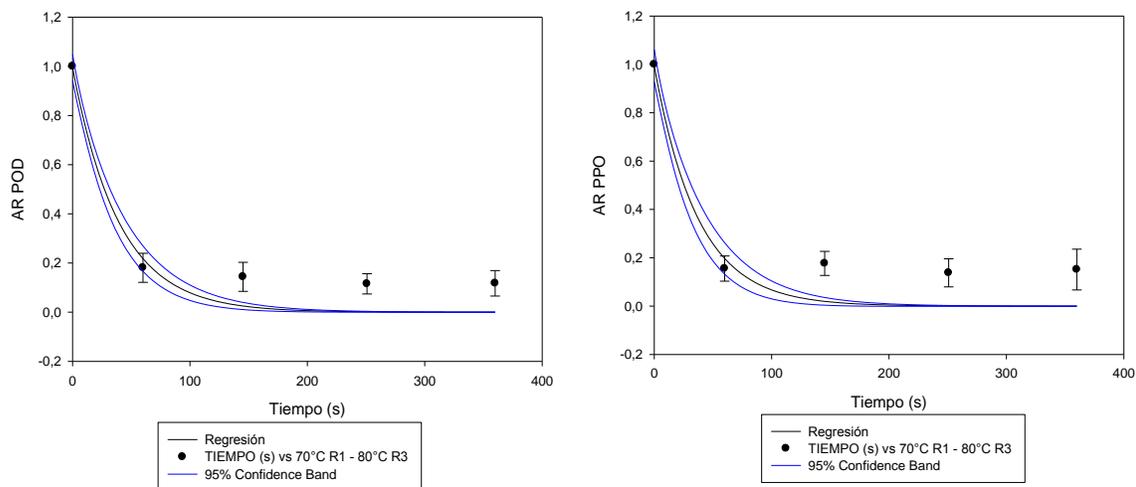
ENZIMA	R	Rsqr	Adj Rsqr	Error estándar estimado
POD	0,9555	0,913	0,9118	0,1041
PPO	0,9269	0,8592	0,8572	0,1302

La tabla 7 muestra los valores de los coeficientes a y b según la ecuación 4, con bajos valores de error para ambas enzimas. Las gráficas correspondientes aparecen en la gráfica 7.

Tabla 7. Parámetros de la regresión de primer orden para POD y PPO

Enzima	Coficiente	Valor	Std. Error	P
POD	A	0,995	0,0269	<0,0001
	B	0,0253	0,002	<0,0001
PPO	A	0,995	0,0336	<0,0001
	B	0,027	0,0028	<0,0001

Gráfica 7. Regresión de primer orden para inactivación térmica de POD y PPO



POD

PPO

El análisis de varianza respectivo se aprecia en la tabla 8.

Tabla 8. Análisis de Varianza para regresión de primer orden

POD

Parámetro	DF	SS	MS	F	P
Regresión	1	8,2995	8,2995	765,8569	<0,0001
Residuos	73	0,7911	0,0108		
Total	74	9,0906	0,1228		

PPO

Parámetro	DF	SS	MS	F	P
Regresión	1	7,5558	7,5558	445,3753	<0,0001
Residuos	73	1,2384	0,017		
Total	74	8,7942	0,1188		

De acuerdo con estos parámetros el ajuste se considera adecuado. Sin embargo, existe una amplia discusión acerca del modelo matemático que más se ajusta a la cinética de inactivación térmica de las dos enzimas. Mientras muchos autores proponen una cinética de inactivación de primer orden (Ludikhuyze *et al.*, 1999;

Anthon y Barrett, 2002; Chisari *et al.*, 2007; Serrano-Martínez *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2009), otros coinciden en afirmar que este comportamiento se interpreta adecuadamente mediante el modelo propuesto por Ling y Lund (1978), según el cual existen dos isoenzimas con distinta sensibilidad a la temperatura (Duarte-Vazquez *et al.*, 2000; Morales-Blancas *et al.*, 2002; Agüero *et al.*, 2008; Polata *et al.*, 2009).

Weemaes *et al.*, (1998) sugieren que la pérdida de actividad de la enzima podría ser descrita por la suma de dos descensos exponenciales, uno para la enzima termolábil y otro para la enzima termo estable (Ec. 5). Este se conoce como el modelo de distintas isoenzimas. A representa la actividad enzimática residual y k , la constante de velocidad de reacción de primer orden para las fracciones lábiles (L) y resistentes (R), respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = A_L e^{-k_L t} + A_S e^{-k_R t}$$

Ec 5. Modelo de isoenzimas (Weemaes *et al.*, 1998).

Rudra Shalini *et al.* (2008), han hecho un análisis profundo de los distintos modelos matemáticos utilizados para explicar el comportamiento cinético de inactivación térmica de las enzimas, desde modelos simples como el de primer orden hasta los bifásicos y de series; concluyeron que todos los modelos bifásicos reportados son esencialmente iguales. La única diferencia radica en sus expresiones matemáticas. Las diferencias en expresiones lineales y formas de los modelos llevan a distintas variaciones en sus parámetros estimados.

En esta investigación, aunque se ensayaron distintos modelos bifásicos, no reportaron resultados confiables, por lo que no se consideran aquí para su análisis. Es necesario aclarar que la aplicación de estos modelos se realiza cuando se exploran rangos de temperaturas muy amplios y tiempos de tratamiento muy largos, lo cual no se hizo en este trabajo.

Debido a los límites de temperaturas que se ensayaron y de acuerdo con la información analizada en bibliografía, se puede afirmar que los modelos trabajados son adecuados, porque se hizo en un rango estrecho de temperaturas, donde solo se consideró la fracción termo resistente de las enzimas.

3.2.4 Análisis del diseño experimental. A continuación se analizarán los resultados del diseño experimental para encontrar el tratamiento térmico óptimo que permita minimizar las actividades residuales de ambas enzimas. Los resultados se muestran en las tablas 9 a 11, a continuación.

Tabla 9. Análisis de Varianza para Actividad Residual de POD

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
ACTIVIDAD POD	75	1	0,99	12,67	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	9	24	0,38	241,4	<0,0001
TEMPERATURA (°C)	0,1	4	0,01	9,51	<0,0001
TIEMPO (s)	8,9	4	2,23	1435	<0,0001
TEMPERATURA (°C)*TIEMPO (s)	0	16	1,40E-03	0,88	0,5969
Error	0,1	50	1,60E-03		
Total	9,1	74			

Tabla 10. Prueba de Tukey para Actividad Residual de POD con respecto a Temperatura

Alfa=0,05 DMS=0,04076 Error: 0,0016 gl: 50

TEMPERATURA (°C)	Medias	n	E.E.	
80	0,3	15	0,01	A
72,5	0,3	15	0,01	A
77,5	0,3	15	0,01	A
75	0,3	15	0,01	A
70	0,4	15	0,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla 11. Prueba de Tukey para Actividad Residual de POD con respecto a tiempo

Alfa=0,05 DMS=0,04076 Error: 0,0016 gl: 50

TIEMPO (s)	Medias	n	E.E.		
250,8	0,1	15	0,01	A	
360	0,1	15	0,01	A	
145,2	0,1	15	0,01	A	B
60	0,2	15	0,01		B
0	1	15	0,01		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Este análisis indica que los dos factores analizados, tiempo y temperatura, tienen efectos significativos frente a la variable de respuesta, actividad residual de POD, lo cual significa que ambas influyen sobre la respuesta final. Sin embargo, no sucede lo mismo con la interacción de las dos variables. Esto se puede apreciar claramente en la figura 19, que muestra que, tanto la temperatura como el tiempo influyen negativamente sobre la actividad de la enzima, es decir, que a medida que se incrementan estos valores, los valores de actividad residual de actividad de POD disminuyen, lo cual es lógico y coincide con los estudios citados previamente.

Asimismo, se observa que la interacción de los dos factores no tiene efecto sobre la variable de respuesta.

Con respecto a la temperatura, no hay diferencias significativas entre los niveles analizados. Sin embargo, con respecto al tiempo de tratamiento, sí hay diferencias significativas entre los intervalos analizados, siendo menor la actividad residual de la enzima en el rango entre 145 y 360 segundos, de donde se infiere que el tiempo óptimo de tratamiento debe encontrarse alrededor de estos valores.

En la tabla 12 se muestran los resultados del proceso de optimización para esta enzima, donde se tomó como meta un valor óptimo de actividad residual del 10%:

Tabla 12. Respuesta optimizada para AR POD

Meta: mantener AR POD en 0,1. Valor óptimo = 0,1

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
TEMPERATURA (°C)	70,0	80,0	75,1926
TIEMPO (s)	60,0	360,0	213,0

Esta tabla muestra la combinación de los niveles de los factores, que mantiene la Actividad Residual de POD en 0,1 sobre la región indicada. El tratamiento adecuado para lograr este objetivo, sería a Temperatura de 75,2°C durante 213 segundos (3,55 minutos).

En la tabla 13 se observa el análisis de medias de Tukey de la variable de respuesta con respecto a los dos factores de estudio.

Tabla 13. Prueba de comparación de medias de Tukey para Actividad Residual de POD con respecto a tiempo y temperatura

Alfa=0,05 DMS=0,12462 Error: 0,0016 gl: 50

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)	Medias	n	E.E.			
80	360	0,1	3	0,02	A		
80	251	0,1	3	0,02	A		
72,5	360	0,1	3	0,02	A		
72,5	251	0,1	3	0,02	A		
75	360	0,1	3	0,02	A	B	
77,5	360	0,1	3	0,02	A	B	
75	251	0,1	3	0,02	A	B	
75	145	0,1	3	0,02	A	B	
77,5	251	0,1	3	0,02	A	B	
77,5	145	0,1	3	0,02	A	B	
72,5	145	0,1	3	0,02	A	B	
80	145	0,1	3	0,02	A	B	C
72,5	60	0,2	3	0,02	A	B	C
70	251	0,2	3	0,02	A	B	C
77,5	60	0,2	3	0,02	A	B	C
80	60	0,2	3	0,02	A	B	C
75	60	0,2	3	0,02	A	B	C
70	360	0,2	3	0,02	A	B	C

70	145	0,2	3	0,02	B	C
70	60	0,3	3	0,02		C
80	0	1	3	0,02		D
72,5	0	1	3	0,02		D
75	0	1	3	0,02		D
77,5	0	1	3	0,02		D
70	0	1	3	0,02		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El grupo marcado con la letra D corresponde al testigo, que es el jugo sin tratamiento, el cual es significativamente diferente a los otros tratamientos, pues su actividad es mucho mayor a los demás.

Aquí se aprecian 4 grupos distintos, destacándose cuatro tratamientos con actividades residuales menores al 10%, que es el objetivo. Estos son 80°C por 360 y 250,8 segundos y 72,5°C por los mismos tiempos.

Los demás tratamientos tienen actividades cercanas al óptimo; sin embargo, es necesario analizar con detenimiento estos datos, pues solo se está estudiando una de las enzimas y debe tenerse en cuenta la respuesta del mismo para la enzima PPO, que se muestra en las tablas 14 a 16.

Tabla 14. Análisis de Varianza para Actividad Residual de PPO

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
ACTIVIDAD PPO	75	1	0,99	8,99	
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8,8	24	0,36	429,2	<0,0001
TEMPERATURA (°C)	0,1	4	0,02	22,76	<0,0001
TIEMPO (s)	8,6	4	2,14	2523	<0,0001
TEMPERATURA (°C)*TIEMPO (s)	0,1	16	0,01	7,39	<0,0001
Error	0	50	8,50E-04		
Total	8,8	74			

Tabla 15. Prueba de comparación de medias de Tukey para Actividad Residual de PPO con respecto a Temperatura

Alfa=0,05 DMS=0,03012 Error: 0,0008 gl: 50

TEMPERATURA (°C)	Medias	n	E.E.	
80	0,3	15	0,01	A
77,5	0,3	15	0,01	A B
75	0,3	15	0,01	B
72,5	0,3	15	0,01	B
70	0,4	15	0,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla 16. Prueba de comparación de medias de Tukey para Actividad Residual de PPO con respecto a tiempo

Alfa=0,05 DMS=0,03012 Error: 0,0008 gl: 50

TIEMPO (s)	Medias	n	E.E.	
250,8	0,1	15	0,01	A
360	0,2	15	0,01	A B
60	0,2	15	0,01	A B
145,2	0,2	15	0,01	B
0	1	15	0,01	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Con respecto a la enzima PPO, todos los factores son significativos frente a la actividad residual de la enzima, incluyendo su interacción. Esto se debe a que esta enzima parece ser más termorresistente que POD en el jugo de fique

Con respecto al análisis de los factores por separado, el análisis de medias a un nivel de significancia del 5% confirma lo dicho, pues las medias de las variables de respuesta son más altas para PPO y con respecto a la temperatura se observan tres grupos distintos, destacándose la temperatura de 80°C como significativamente distinta de las demás. Lo mismo sucede con el tiempo de proceso, donde al parecer el tiempo de retención más adecuado se ubica alrededor de los 250 segundos. Esto se confirma en la tabla 17.

Tabla 17. Prueba de comparación de medias de Actividad Residual de PPO con respecto a tiempo y temperatura

TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (s)	Medias	n	E.E.															
80	251	0,1	3	0,02	A														
80	360	0,1	3	0,02	A	B													
77,5	360	0,1	3	0,02	A	B													
75	360	0,1	3	0,02	A	B	C												
72,5	60	0,1	3	0,02	A	B	C												
75	251	0,1	3	0,02	A	B	C	D											
80	60	0,1	3	0,02	A	B	C	D											
77,5	60	0,1	3	0,02	A	B	C	D											
77,5	251	0,1	3	0,02	A	B	C	D											
72,5	145	0,1	3	0,02	A	B	C	D											
72,5	251	0,1	3	0,02	A	B	C	D	E										
80	145	0,2	3	0,02	A	B	C	D	E	F									
75	145	0,2	3	0,02		B	C	D	E	F	G								
77,5	145	0,2	3	0,02			C	D	E	F	G								
75	60	0,2	3	0,02				D	E	F	G								
70	60	0,2	3	0,02					E	F	G								
70	251	0,2	3	0,02					E	F	G								
70	360	0,2	3	0,02					E	F	G								
70	145	0,2	3	0,02						F	G								
72,5	360	0,3	3	0,02							G								
70	0	1	3	0,02															H
72,5	0	1	3	0,02															H
75	0	1	3	0,02															H
77,5	0	1	3	0,02															H
80	0	1	3	0,02															H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

En esta tabla se aprecia una mayor distribución de los datos de actividad residual media para PPO, con respecto a lo observado para POD. El tratamiento que entrega una menor actividad enzimática es el correspondiente a 80°C durante 250,8 segundos.

El grupo marcado con la letra H corresponde al testigo sin tratamiento. En la tabla 18 se muestran los valores de optimización de ambos factores para esta variable, donde se confirma lo anteriormente mencionado, con respecto a la termo

resistencia de la enzima PPO, pues la temperatura necesaria para lograr una disminución igual al 10% de la actividad inicial es más alta que en POD.

Tabla 18. Respuesta óptima para AR PPO

Meta: Mantener AR PPO en 0,1. Valor óptimo = 0,1

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
TEMPERATURA (°C)	70,0	80,0	79,8229
TIEMPO (s)	60,0	360,0	255,069

Esta tabla muestra la combinación de los niveles de los factores, la cual mantiene AR PPO en 0,1 sobre la región indicada. El tratamiento que cumple con las restricciones dadas es Temperatura de 79,8°C y tiempo de 255 segundos (4,25 minutos).

Como se vé en el análisis, el tratamiento adecuado debería ser una solución de compromiso que mantenga bajos los niveles de actividad residual de ambas enzimas. Por ello se decidió optimizar las variables de respuesta. Este procedimiento ayuda a determinar la combinación de los factores experimentales que simultáneamente optimiza varias respuestas. Las metas de cada una de las respuestas actualmente están establecidas como minimizar AR POD y AR PPO.

El análisis simultáneo de los datos para las dos enzimas proporciona el siguiente resultado.

Tabla 19. Optimización de Múltiples Respuestas para Actividad Residual de las enzimas POD y PPO

Factor	Bajo	Alto	Óptimo	Respuesta	Óptimo
TEMPERATURA (°C)	70,0	80,0	75,0	AR POD	0,101956
TIEMPO (s)	60,0	360,0	210,0	AR PPO	0,144277

Esta tabla muestra la combinación de factores y sus niveles, a la cual se alcanza el óptimo deseado. De acuerdo con los resultados arrojados por el programa estadístico STAT Graphics, el tratamiento que logra este objetivo es el de 75°C por un tiempo de 210 segundos o 3,5 minutos. Aunque este tratamiento reduce el nivel de actividad residual de POD hasta el mínimo deseado de 10%, no se logra lo mismo con PPO, ya que se conserva el 14% de actividad inicial.

Sin embargo, como ya se dijo al principio, la actividad de esta enzima es mucho menor que la de POD, por lo que realmente no es tan importante la reducción de su actividad hasta niveles tan bajos como los de POD, aunque es un buen indicador, pues se encuentra dentro del rango adecuado.

El otro criterio utilizado para optar por este tratamiento es el hecho de que la pasteurización debe buscar un punto en el cual se minimice el daño al producto; por ello se escoge este resultado como valor óptimo, pues un tratamiento más alto puede ocasionar un deterioro del producto, ocasionado por fenómenos como la caramelización de azúcares, desnaturalización de compuestos de alto valor como las saponinas, o precipitaciones.

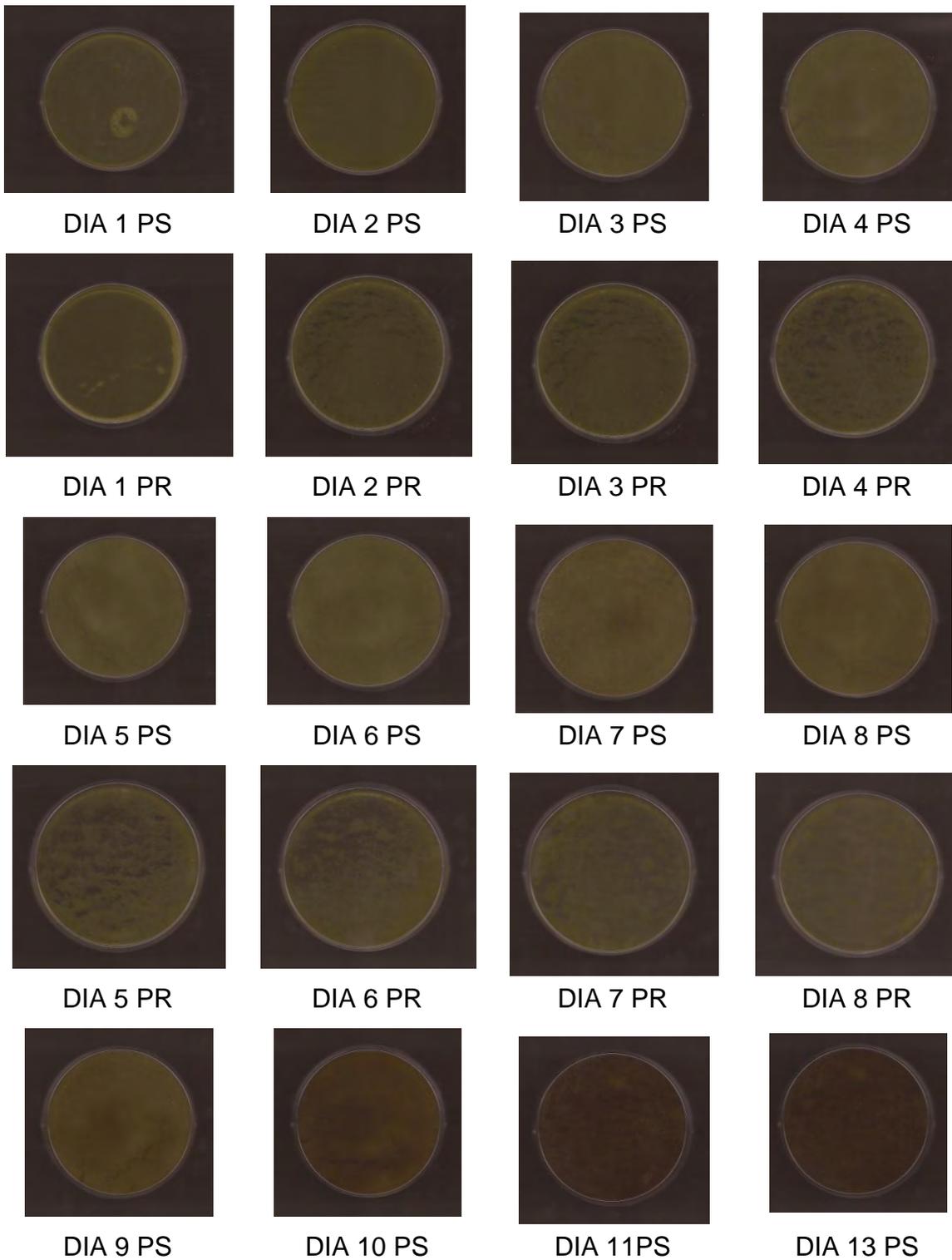
Se concluye entonces, que el tratamiento que se utilizará en adelante para realizar las demás pruebas será el de 75°C por 210 segundos (3,5 minutos).

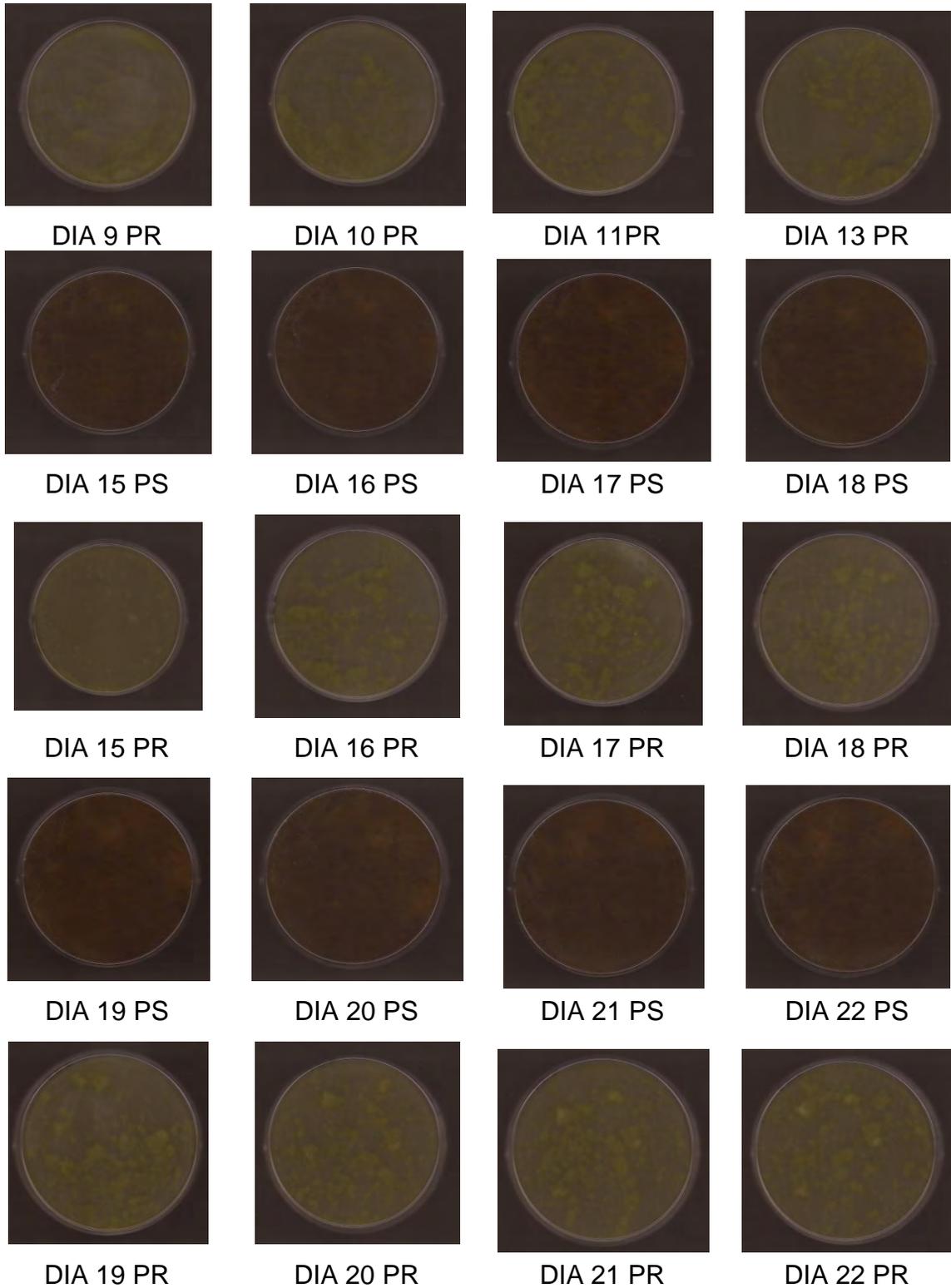
3.3 PRUEBAS DE CONSERVACIÓN DEL JUGO DE FIQUE

Para comprobar si el tratamiento escogido era capaz de mantener el jugo sin deterioro por un tiempo adecuado, se realizaron pruebas indirectas, que consistieron en almacenar a dos temperaturas distintas el jugo de fique pasteurizado.

Se trabajó a temperatura ambiente (PS) y temperatura de refrigeración (PR). Se observó el tiempo durante el cual el jugo mantenía su color original (verde) antes de iniciar el pardeamiento debido a la actividad de la enzima remanente, que aparecen de color café oscuro. Los resultados se muestran en la figura 25.

**Figura 19. Pruebas de vida útil durante el almacenamiento de jugo de fique
pasteurizado**





PS = Jugo Pasteurizado y conservado a Temperatura Ambiente

PR = Jugo Pasteurizado y conservado a Temperatura de Refrigeración 4°C

Como se puede observar, el jugo almacenado a temperatura ambiente mantuvo su apariencia durante 9 días antes de iniciar el cambio de color a pardo o café oscuro; mientras tanto, el jugo refrigerado se conservó durante 22 días sin cambios aparentes.

Esto coincide con lo afirmado por Silva & Gibbs (2004), quienes aseveran que la pasteurización de jugos poco ácidos debe complementarse con otros tratamientos como la refrigeración, fermentación y envase en atmósferas estériles, entre otros.

En estudio realizado en jugo de naranja y leche, Zulueta *et al.* (2012) encontraron que el índice de pardeamiento se incrementó durante el almacenamiento del jugo tratado térmicamente durante 6 semanas. Bull *et al.* (2004) observaron que el índice de pardeamiento se incrementó significativamente durante almacenamiento por 12 semanas a 4 y 10°C después de procesamiento térmico a 65°C por 1 min.

Las causas del cambio de color normal se pueden atribuir al pardeamiento enzimático y no enzimático (Charles-Rodríguez *et al.*, 2007). En el mismo sentido, Plaza *et al.* (2011) en jugo de naranja procesado térmicamente (70°C, 30s), durante los 20 días de almacenamiento refrigerado, observaron la pérdida de color normal y pardeamiento.

Similares resultados reportan Morales-de la Peña *et al.* (2011) en jugo de fruta y soya pasteurizado térmicamente almacenado a 4°C y Zulueta *et al.* (2012).

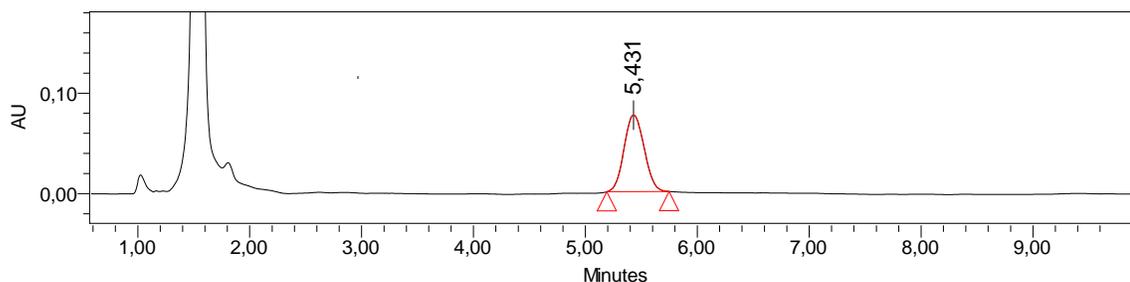
En hojas de *Aloe barbadensis* Miller (deshidratadas), se observó un pardeamiento posterior al tratamiento, lo cual indudablemente influye sobre las propiedades organolépticas del producto, limitando sus potenciales aplicaciones. Un pardeamiento leve se observó en todas las muestras analizadas. El menor grado de pardeamiento se observó en una muestra de hojas almacenada durante 30 días, que no tuvo diferencias significativas ($p > 0.05$) con muestras analizadas por 40, 50, 60 y 70 días. Un incremento importante se observó luego de los 80 días de almacenamiento (Femenia *et al.*, 2003).

De acuerdo con esto, el pardeamiento es un efecto normal e inevitable posterior al tratamiento. El proceso de pasteurización térmica retrasa este efecto y brinda un mayor tiempo de conservación del jugo, frente a otros procesos como altas presiones y pulsos eléctricos.

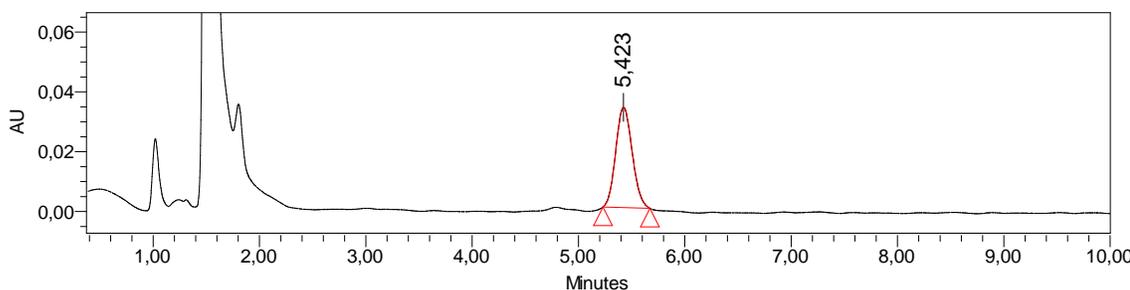
3.4 MEDICIÓN DE LOS CONTENIDOS DE SAPOGENINAS EN EL JUGO DE FIQUE POR HPLC

Los resultados de las dos pruebas realizadas, se muestran en la gráfica 8. El pico marcado corresponde a la medición del contenido de hecogenina. La primera gráfica es el resultado de la medición del contenido de hecogenina en jugo de fique pasteurizado extraída con metanol, y la segunda corresponde a la extraída con acetonitrilo.

Gráfica 8. Cromatogramas de hecogenina en jugo de fique tratado



Cromatograma Muestra 1



Cromatograma Muestra 2

Los análisis aparecen en la tabla 20. Se realizó la extracción con acetonitrilo, siguiendo la sugerencia hecha por Kite *et al.*, (2007), según la cual la extracción con metanol podría deteriorar las saponinas.

Tabla 20. Reportes cromatográficos para medición de hecogenina

Muestra	Tiempo de Retención	Área	% Área	Altura
1	5,431	953869	100,00	76293
2	5,423	360871	100,00	33513

Los resultados fueron analizados de acuerdo con parámetros previamente establecidos y su interpretación se muestra en la tabla 21.

Tabla 21. Contenido de hecogenina medido por HPLC en dos muestras de jugo de fique pasteurizado

	Contenido de Hecogenina	
	M1 (Metanol)	M2 (Acetonitrilo)
Área	953869	360871
Sobre Muestra analizada (mg/L)	39,41	13,96
Sobre extracto seco (mg/L)	35,36	8,25
Sobre Muestra Inicial (mg/L)	117,86	27,50

Claramente se deduce que el tratamiento térmico aplicado al jugo de fique no tiene influencia sobre el contenido de hecogenina, ya que aparentemente es superior a los reportados anteriormente para jugo fresco y fermentado (Benavides *et al.*, 2012) y con respecto al jugo concentrado a vacío y pulverizado (Solarte *et al.*, 2012), como se muestra en la tabla 22.

Sin embargo, estos resultados no son fácilmente comparables, pues como se observa claramente en este trabajo, el contenido de hecogenina puede verse afectado por el método de extracción. Esta afirmación se corrobora con los resultados que se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Contenido de hecogenina en jugo de fique fresco, fermentado y pulverizado mediante HPLC

Contenido de Hecogenina							
Tratam.	T1	T2	T3	T4	T5	T6	Fuente
Sobre extracto seco (mg/L)	35	8,3	36,31	31	19,42	9,92	Solarte <i>et al.</i> (2012)
					25,39	4,46	Benavides <i>et al.</i> (2012)

T1 = Extracción con metanol

T2 = Extracción con Acetonitrilo

T3 = Concentrado a vacío

T4 = Pulverizado

T5 = Fermentado 4 días

T6 = Jugo fresco

Aunque en los trabajos citados se utilizó el método de extracción con metanol, muchas variables pueden influir en el resultado final, pues los reportes al respecto son diversos.

Camargo *et al.* (2010) reporta un contenido de hecogenina de 1g/L en jugo de fique de variedad Uña de Águila (*Furcraea macrophylla*), mientras que Rojas *et al.* (2010) reportan un contenido de 4,1 mg de saponinas totales, identificadas como hecogenina y tigogenina, con porcentajes de área relativa del 51,4% y 46,1%, respectivamente; Castro *et al.* (2010) por su parte, encontraron que el jugo de fique tenía una proporción hecogenina:tigogenina de 82:18.

De otra parte, Taborda y Zuluaga (2010) reportan contenidos de saponinas totales en jugo de fique fresco y fermentado que varían entre 17,2 y 42,8 mg/L, respectivamente. Como estándar interno se utilizó colesterol, a diferencia de los otros reportes donde se utilizó acetato de hecogenina.

Tanto el estado de fermentación del jugo y la metodología utilizada para la extracción y determinación de las saponinas, así como el estándar utilizado, influyen en la respuesta final respecto al contenido de saponinas, sobre todo en jugo de fique, que es una sustancia que apenas está comenzando a estudiarse y todos los resultados deben considerarse con cuidado.

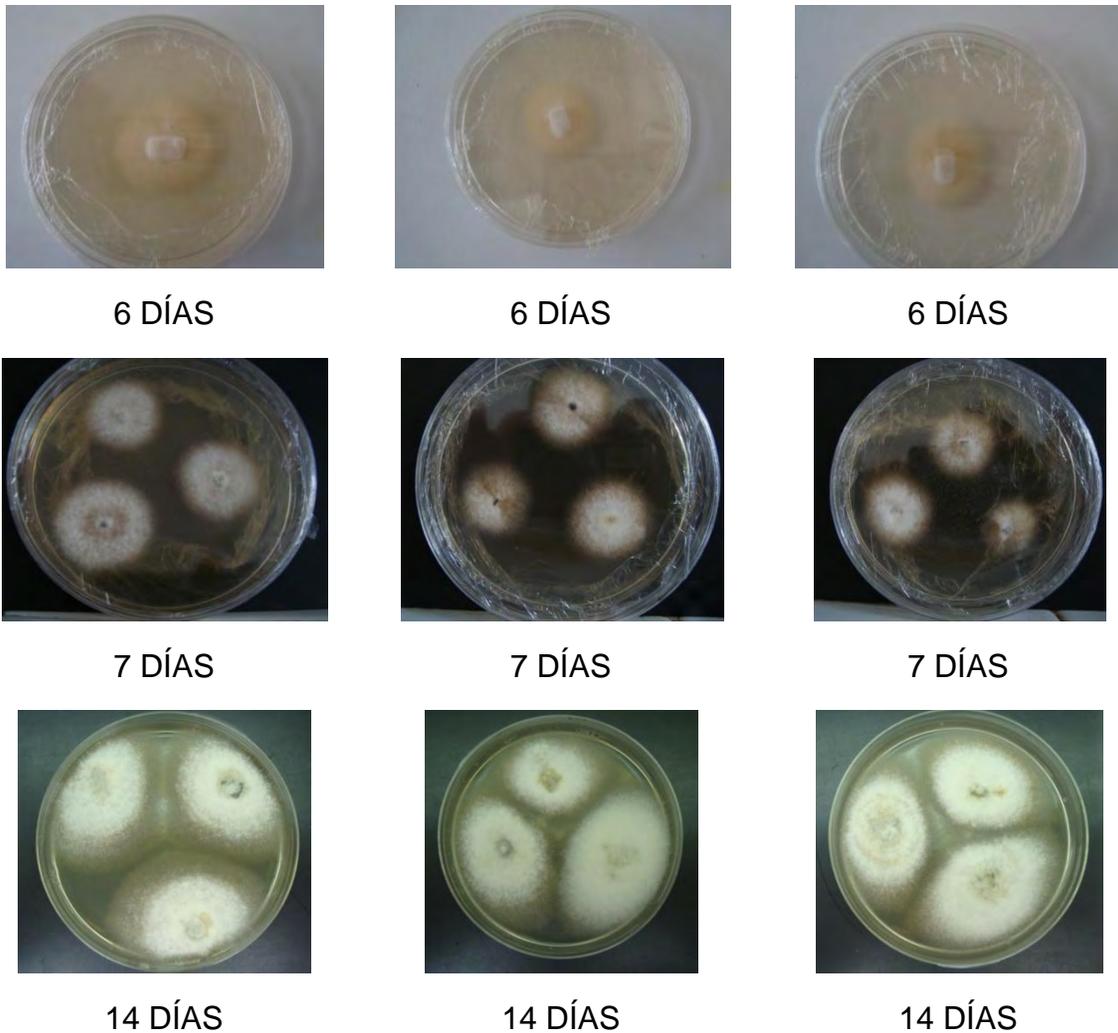
Otros factores asociados al contenido de saponinas en jugo de fique son la edad del cultivo y su estado de sanidad al momento de la extracción. Sin embargo, estos datos no son reportados en la literatura científica consultada, lo que hace que sea aún más difícil la comparación de resultados.

En cuanto a las modificaciones funcionales que pudiera sufrir el jugo de fique posterior al tratamiento térmico, Rodríguez-González *et al.* (2011) investigaron las posibles modificaciones que el tratamiento de pasteurización a temperaturas entre 70°C y 85°C podría tener sobre las propiedades funcionales de los polisacáridos presentes en *Aloe vera*. Concluyeron que la capacidad de hinchamiento (SW) fue mayor para el jugo tratado térmicamente que en el fresco; la capacidad de retención de agua (WRC) y la capacidad de adsorción de grasa (FAC) exhibieron niveles un poco mayores a los del producto fresco. Solo las muestras pasteurizadas a 85°C mostraron un decrecimiento significativo en comparación con las muestras frescas, concluyendo que el tratamiento no afectó estas propiedades. Jasso de Rodríguez *et al.* (2005), no reporta interferencias en la actividad antifúngica del jugo de *Aloe vera* pasteurizado a 65°C por 30 minutos, y recomienda su estudio, pues su actividad tiene mayor espectro que la de la pulpa de la misma planta.

3.5 MEDICIÓN DE LA ACCIÓN INHIBITORIA DEL JUGO DE FIQUE *IN VITRO* Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.5.1 Aislamiento de *Ascochyta pisi* y *Mycosphaerella pinodes*. En la figura 20 se muestran las fotos de los aislamientos del complejo *Ascochyta*, obtenidos a partir de cortes de vainas enfermas. Una vez aislados los microorganismos, se procedió a su purificación en medio PDA. Se observó en los bordes del micelio el color naranja característico.

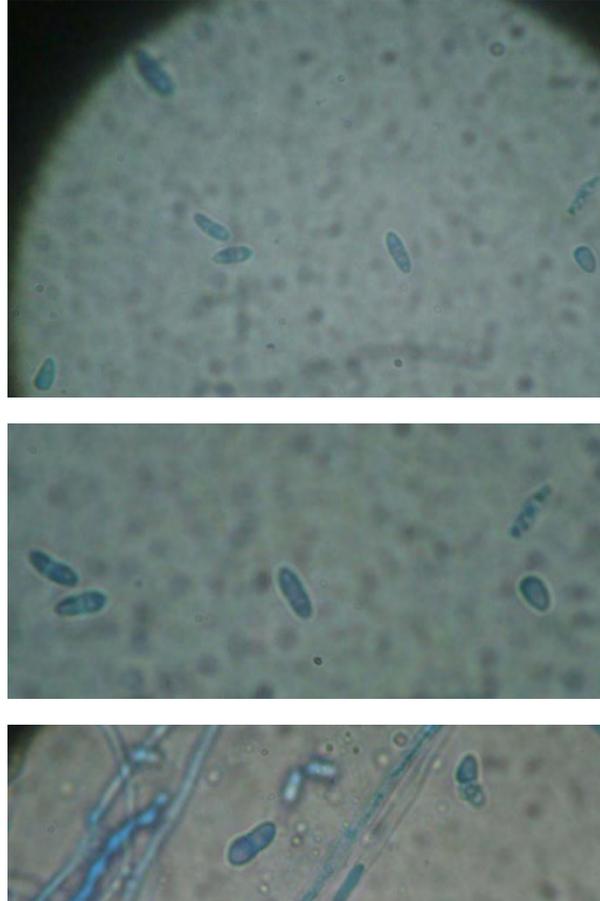
Figura 20. Fotos de aislamientos de *Ascochyta*



Fuente: Esta investigación

La confirmación de identidad, se realizó mediante la observación de la forma de sus esporas. En la figura 21 se aprecia las fotos obtenidas.

Figura 21. Esporas aisladas de los cultivos de *Ascochyta*



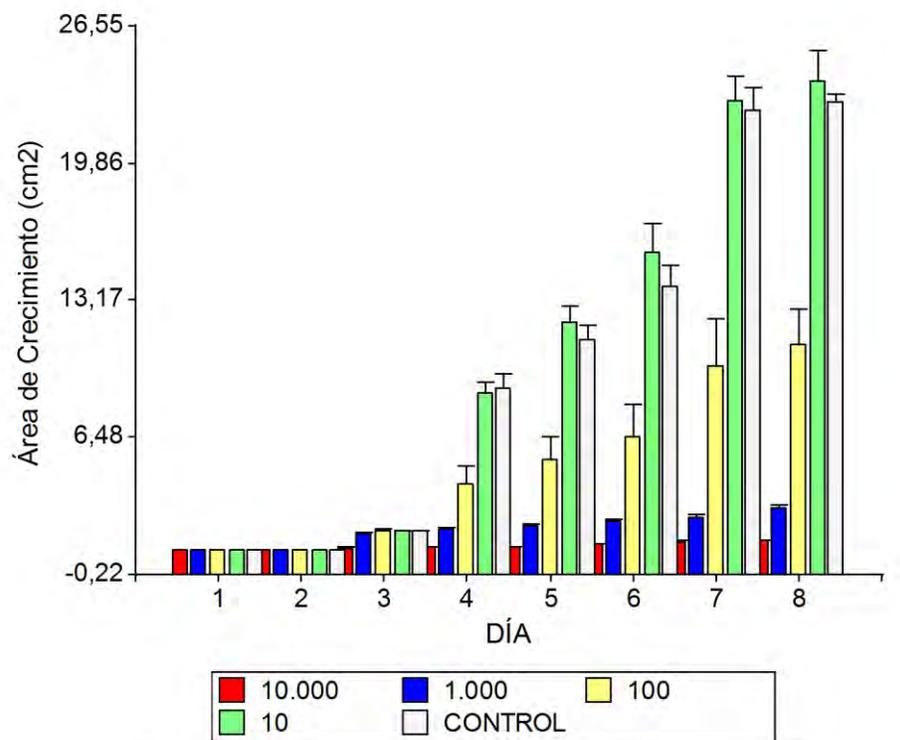
Fuente: Esta investigación

La forma de las esporas aisladas coincide con la descrita por Boerema & Dorenbosch (1973). Los autores afirman que en las especies de *Ascochyta* la septación de los conidios (distoseptación) es una parte esencial del desarrollo conidial. Esta característica distingue las especies genuinas de *Ascochyta*, bajo condiciones de cultivo *in vivo* e *in vitro*.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede confirmar que los aislamientos corresponden a los patógenos buscados.

3.5.2 Evaluación in vitro de la actividad del bioinsumo de fique sobre el complejo Ascochyta. Los resultados se aprecian en la tabla A4 (Anexo) y en la gráfica 9.

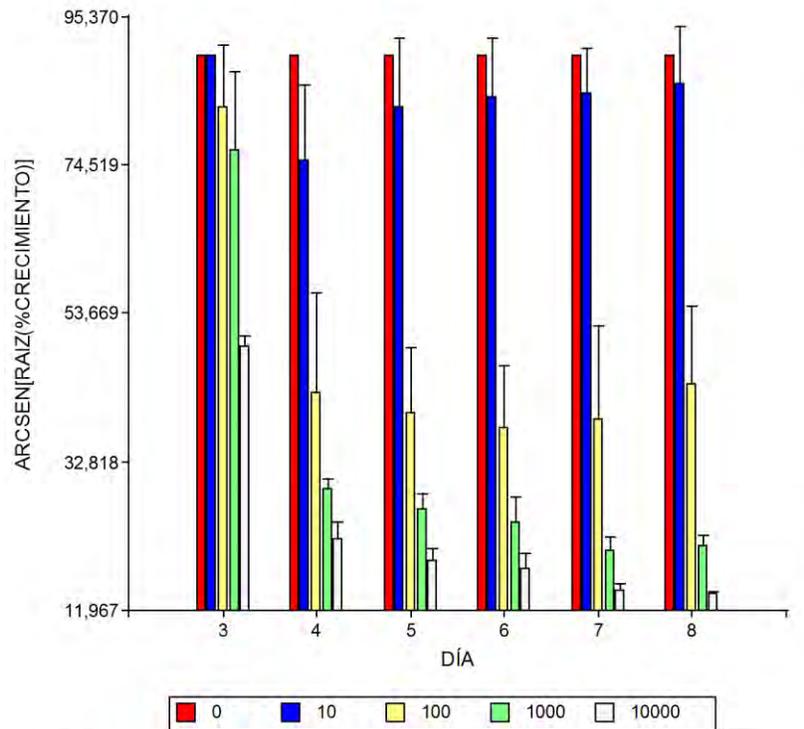
Gráfica 9. Crecimiento *in vitro* de *A. pisi* durante los días 3 a 8



En esta primera valoración se aprecia claramente que no hubo crecimiento del patógeno durante los días 1 y 2, por lo que la evaluación se realizó solo durante los días 3 a 8. Un análisis preliminar de la gráfica 12 indica que los tratamientos de 100, 1.000 y 10.000 mg/L de bioinsumo de fique pasteurizado (BFP) muestran un menor crecimiento que los demás.

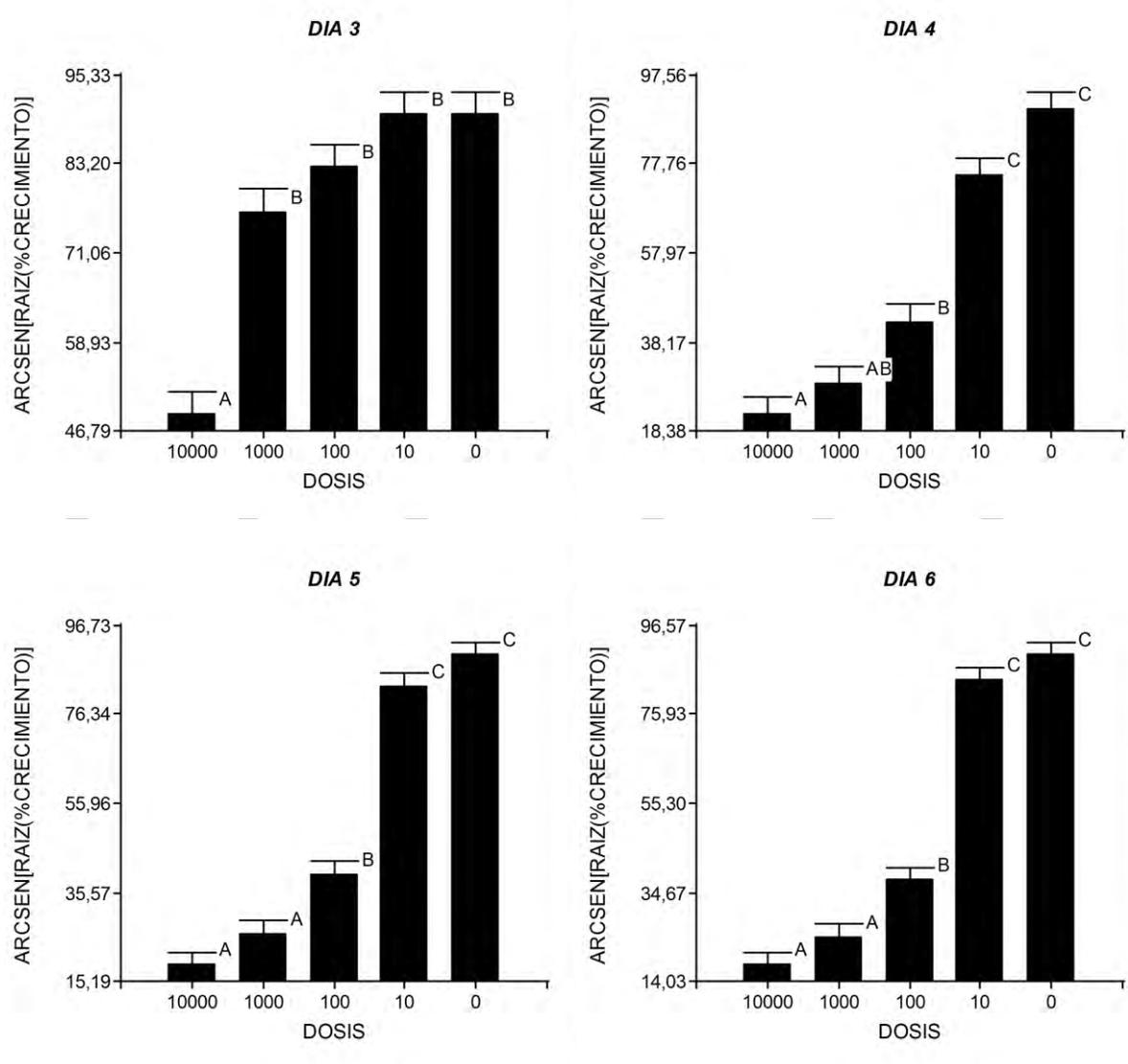
Con el fin de analizar e interpretar adecuadamente los resultados de crecimiento del patógeno, estos se normalizaron utilizando la transformación Arcsen [$\sqrt{(\%Crecimiento)}$], con el fin de asegurar la distribución normal de los datos. Estos se observan en la tabla A5 (Anexo), y en la gráfica 10.

Gráfica 10. %Crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* durante los días 3 a 8 – Resultados normalizados



A partir de la gráfica se deduce que el día 8 es en el que se tiene mayor crecimiento del patógeno. Para corroborar esta suposición, se realizaron análisis de varianza para cada uno de los días de tratamiento. Sus resultados y los de la prueba de medias correspondientes aparecen en las tablas A6 – A17 de los anexos. Los resultados de las pruebas de medias de Tukey para cada día de evaluación se muestran en la gráfica 11.

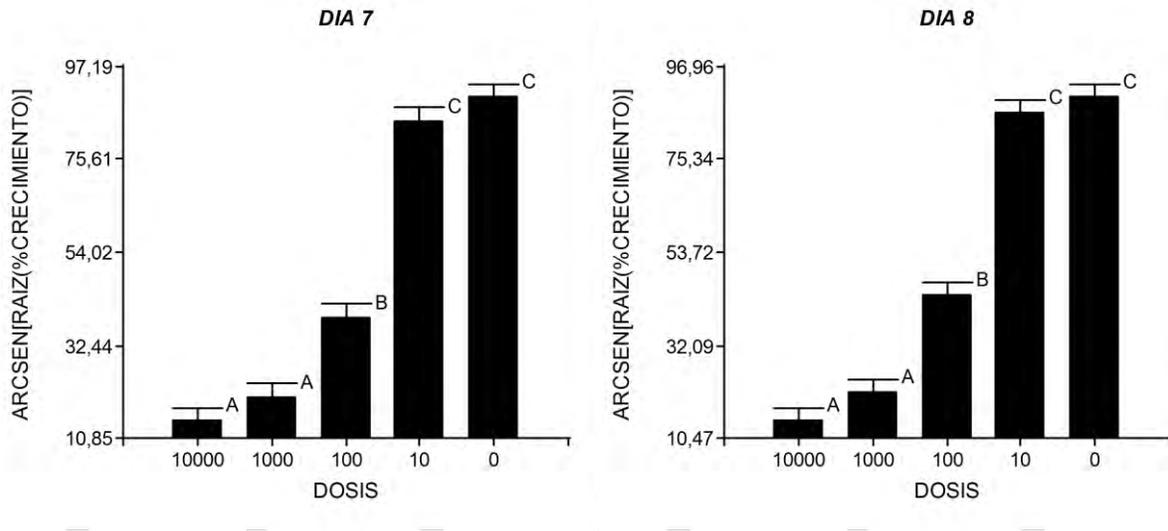
Gráfica 11. Prueba de medias de Tukey para el crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* durante los días 3 a 8 de evaluación.



En el día 3 el tratamiento de 10.000 mg/L tiene un menor porcentaje de crecimiento del patógeno mientras los otros tratamientos no son diferentes del testigo.

El día 4 de evaluación muestra tres grupos diferenciados con el tratamiento de 10.000 mg/L como el de menor crecimiento y donde el tratamiento a menor dosis (10 mg/L) es estadísticamente igual al control.

Gráfica 11. Prueba de medias de Tukey para el crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* durante los días 3 a 8 de evaluación (Cont).



La prueba de medias para los días 5 a 8, indica que en todos los periodos de evaluación las dosis superiores (10.000 y 1.000 mg/L) inhiben el crecimiento con respecto a la dosis de 10 mg/L que no es diferente al control, mientras que el tratamiento de 100 mg/L muestra una acción inhibitoria media.

Durante los días 3 a 8, se observó un incremento en los porcentajes de crecimiento del patógeno a la dosis más baja de aplicación del bioinsumo de 10 mg/L. Estos datos se observan en las tablas A6 – A17 anexas. Debido a ello, se decidió tomar el día 8 como el periodo más adecuado para evaluar su acción inhibitoria.

A continuación se muestran los datos de porcentaje de crecimiento medio de *Ascochyta* durante el día 8. Los datos de la tabla 23 se obtuvieron aplicando la transformación inversa de normalización para los experimentos realizados.

Tabla 23. Resultados de porcentaje de crecimiento promedio de *Ascochyta* en medio enmendado con jugo de fique a diferentes dosis – Día 8

DOSIS DE BIOINSUMO DE FIQUE PASTEURIZADO(mg/L)	% CRECIMIENTO PROMEDIO DE ASCOCHYTA
10000	6,2
1000	13,4
100	47,8
10	99,5
0	100

Acorde con los resultados, los tratamientos de 10000 y 1000 mg/L de bioinsumo de fique pasteurizado (BFP), tienen un alto porcentaje de inhibición, mientras que la dosis más baja es igual al testigo.

Ello llevó a concluir que el bioinsumo pasteurizado posee una acción inhibitoria sobre el patógeno durante el periodo evaluado.

Para validar los resultados y a partir de esta información, se realizaron ensayos durante 8 días con cinco repeticiones para cada tratamiento aplicado y como referencia para evaluar la acción del bioinsumo se tomaron las lecturas del día 8. Los resultados se consignan en la tabla A18 (Anexo), utilizando la misma transformación para normalizar los datos.

El análisis de varianza correspondiente se muestra en la tabla 24.

Tabla 24. ANAVA crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 8 de evaluación

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ARCSEN[RAIZ(% CRECIMIENTO)	25	0,97	0,97	7,02

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12790,16	4	3197,54	194,97	<0,0001
TRATAMIENTO	12790,16	4	3197,54	194,97	<0,0001
Error	328,01	20	16,4		
Total	13118,17	24			

Como se observa en el ANAVA, los tratamientos son diferentes entre sí a un $p < 0,05$. El análisis de Tukey para los datos normalizados, se muestra en la tabla 25.

Tabla 25. Prueba de medias de Tukey para %crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* durante el día 8 de evaluación

Alfa=0,05 DMS=7,66431 Error: 16,4004 gl: 20

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
10000	29,87	5	1,81	A
1000	37,1	5	1,81	A
100	56,12	5	1,81	B
10	75,4	5	1,81	C
0	90	5	1,81	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Los resultados indican que las dosis más altas de 1000 y 10000 mg/L de BFP mostraron un menor crecimiento micelial del patógeno y que las dosis de 100 y 10 mg/L tuvieron un mayor crecimiento que las dosis más altas pero menor que el testigo absoluto.

Los datos correspondientes luego de la aplicación de la función inversa de la transformación proporcionan la siguiente información.

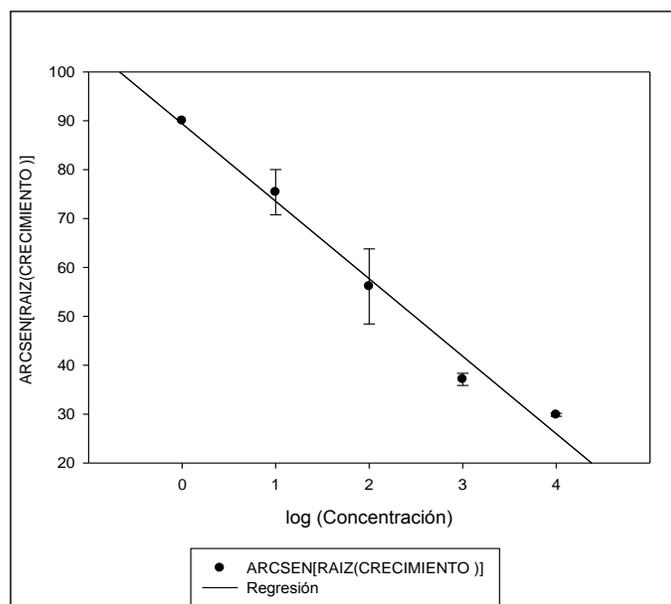
Tabla 26. Porcentaje de crecimiento promedio de *Ascochyta* en medio enmendado con jugo de fique a diferentes dosis evaluado el día 8

DOSIS DE BIOINSUMO DE FIQUE PASTEURIZADO(mg/L)	% CRECIMIENTO PROMEDIO DE ASCOCHYTA
10000	24,8
1000	36,38
100	68,92
10	93,65
0	100

La dosis más alta de BFP logró inhibir el crecimiento del patógeno hasta un 24,8% en relación con el testigo absoluto. Estos resultados muestran un efecto aceptable de inhibición del crecimiento, aunque no se alcanzó un 100% de inhibición que era lo que se buscaba. Por ello se decidió calcular primero la dosis efectiva 50 para posteriormente definir la dosis letal del bioinsumo a nivel *in vitro*.

3.5.3 Cálculo de la Concentración Efectiva 50 (EC50) para el día 8 de evaluación. Los datos de las 5 repeticiones se ajustaron a una recta como se observa en la Gráfica 12.

Gráfica 12. Cálculo de la EC₅₀ a nivel *in vitro*, sobre el complejo *Ascochyta* para el día 8 de evaluación



Fuente: Esta investigación

La ecuación linealizada del porcentaje de crecimiento del patógeno se definió como

$$\text{Arcsen}\left[\sqrt{\% \text{Crecimiento}}\right] = -15,8564 \log(\text{Concentración}) + 89,4088$$

Ec. 5. Cálculo de EC₅₀ para evaluación *in vitro* de Crecimiento micelial de *Ascochyta* durante el día 8.

El valor del coeficiente R^2 es de 0,96 lo que indica un buen ajuste de los datos al modelo propuesto.

El valor de la EC_{50} calculado a partir de la ecuación y transformando los datos con la función inversa fue 631,95 mg.L⁻¹.

Resultados similares reportan Álvarez *et al.* (2011), donde a partir de dosis de 100 ug mL⁻¹ (100 mg L⁻¹) de aplicación de bioinsumo de fique se redujo el porcentaje de crecimiento micelial en *P. infestans*. Chapagain *et al.* (2007) encontraron que el extracto de saponinas de *Yucca schidigera* (Agavacea) aplicado en concentraciones inferiores al 0,1% w/v (1.000 mg L⁻¹) y del 0,3% (3.000 mg L⁻¹) inhibió el 50% del crecimiento micelial de *Colletotrichum coccodes* y de *Alternaria solani*, respectivamente. Los resultados anteriores pueden explicarse en función del contenido de saponinas del bioinsumo de fique, pues diversos autores atribuyen propiedades antifúngicas a las saponinas (Oleszek *et al.*, 1990; Jasso de Rodriguez *et al.*, 2005; Barreto *et al.*, 2004; Gopiesh y Kannabiran, 2008).

De acuerdo con los reportes mencionados, las saponinas, independientemente de la planta de que sean aisladas, poseen un potencial interesante como sustancia antifúngica y antimicrobiana, que debe estudiarse más a fondo (Yang, C.-Ren *et al.*, 2006).

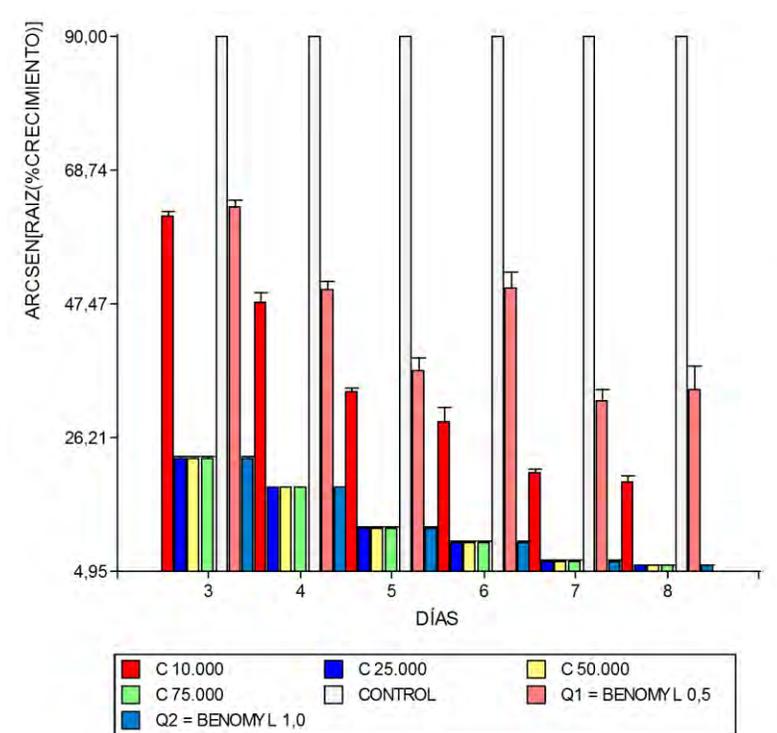
Con base en estos datos, se procedió a calcular el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria.

3.5.4 Cálculo de la Concentración Mínima Inhibitoria (MI) in vitro sobre el complejo Ascochyta. La dosis o concentración del bioinsumo que se acerca al 100% de control sobre el patógeno no se encontró en los primeros ensayos. De acuerdo a los trabajos realizados por Álvarez *et al.* (2011) y Latorre y Pantoja, (2011) sobre *Phytophthora infestans*, se decidió ampliar el rango de evaluación hasta los 75000 mgL⁻¹, con el fin de encontrar la dosis letal del bioinsumo.

Para esta segunda etapa de evaluación (Rango 2), se decidió introducir dos tratamientos más, para comparar la efectividad de aplicación del bioinsumo con un fungicida comercial (Benomyl), comúnmente recomendado para control de *Ascochyta* en arveja en dos dosis Q1= 0,5 g L⁻¹ y Q2 = 1,0 g L⁻¹. Se hicieron 4 repeticiones para cada tratamiento.

En la gráfica 13 se muestra el avance de crecimiento del patógeno durante los días 3 a 8, posteriores al tratamiento. Los días 1 y 2 se omiten, puesto que no hubo crecimiento apreciable en este periodo de tiempo.

Gráfica 13. Evolución del crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* en medio enmendado con bioinsumo de fique – Rango 2



Fuente: Esta investigación

El análisis de varianza realizado para el día 8 muestra los siguientes resultados y se puede observar en la gráfica 14:

Tabla 27. Análisis de varianza para cálculo de la MI del bioinsumo de fique contra *Ascochyta in vitro*

DÍAS	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
8	ARCSEN[RAIZ(CRECIMIENTO)]	28	0,99	0,99	12,14

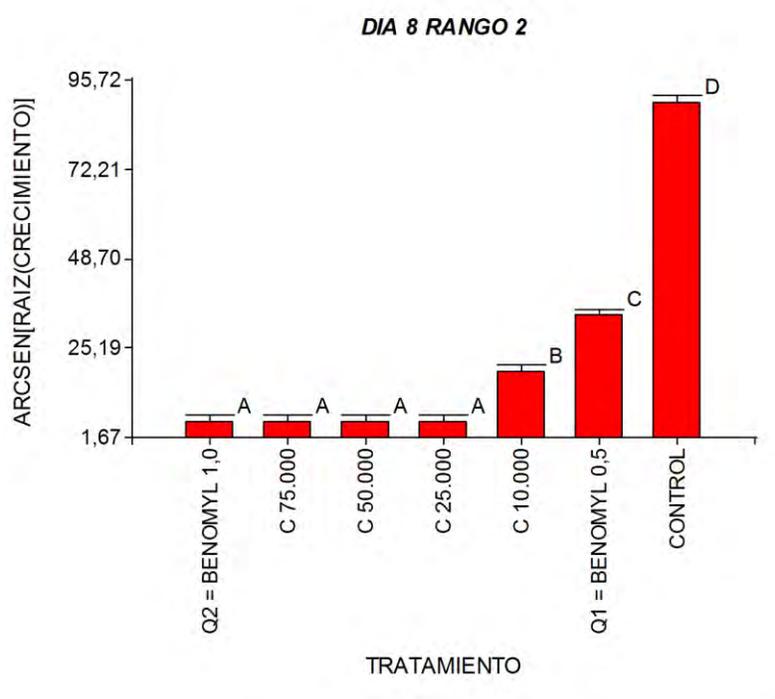
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	23120,27	6	3853,38	460,44	<0,0001
TRATAMIENTO	23120,27	6	3853,38	460,44	<0,0001
Error	175,75	21	8,37		
Total	23296,02	27			

Tabla 28. Prueba de medias de Tukey para cálculo de la MI del bioinsumo de fique contra *Ascochyta in vitro* – día 8

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
Q2 = BENOMYL 1,0	5,95	4	1,45	A
C 75.000	5,95	4	1,45	A
C 50.000	5,95	4	1,45	A
C 25.000	5,95	4	1,45	A
C 10.000	19,17	4	1,45	B
Q1 = BENOMYL 0,5	33,87	4	1,45	C
CONTROL	90	4	1,45	D

Aquí se aprecia claramente que los tratamientos de 25000 mg L⁻¹ a 75000 mg L⁻¹ fueron equivalentes al tratamiento químico Q2, ya que no hubo crecimiento micelial del patógeno en ese rango para ninguna de las dosis y no se encontraron diferencias entre ellas (p<0,05), como se observa claramente en la gráfica 14. Por lo tanto se puede afirmar con certeza que la concentración mínima inhibitoria de bioinsumo de fique para el complejo *Ascochyta* es de 250000 mgL⁻¹.

Gráfica 14. Crecimiento micelial *in vitro* de *Ascochyta* en medio enmendado con bioinsumo de fique para el día 8 – Rango 2.



Fuente: Esta investigación

Los resultados muestran una respuesta específica dependiente de la dosis aplicada de extractos de saponinas, contra el crecimiento micelial de este importante fitopatógeno. Estos dos comportamientos (la dependencia de crecimiento con la dosis aplicada y el efecto de las saponinas), han sido reportados ampliamente con anterioridad en otros microorganismos y hongos fitopatógenos (Sparg *et al.*, 2004; Chapagain *et al.*, 2007; Verástegui *et al.*, 2008; Gopiesh Khanna & Kannabiran, 2008; Soetan *et al.*, 2006).

La MIC encontrada para el bioinsumo de fique se encuentra dentro del rango encontrado por Jasso de Rodríguez *et al.* (2005) quienes reportan una dosis de 10^5 uL/L de jugo de *Aloe vera*, como la más adecuada para inhibir el crecimiento micelial de *R. solani*, *F. oxysporum* y *C. coccodes*; Chapagain *et al.*(2007), encontraron que el extracto de *Yucca schidigera* (YE) aplicado en dosis de 2,0% y 4,0%, tuvo un porcentaje de inhibición de crecimiento sobre *Colletotrichum coccodes* de 93,21%, y 100% respectivamente, en comparación con el control

positivo utilizado (prochloraz 100 y 200 ppm) que tuvo un porcentaje de inhibición de 95,25%.

Los resultados de las pruebas realizadas por Yang *et al.* (2006) indican que las saponinas esteroidales ensayadas fueron activas contra *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus*, en dosis de 20 ug/mL (20000 mgL⁻¹).

Los extractos de tres agaváceas: *Agave lechuguilla* Torr., *Yucca carnerosana* (Trel.) Mc Kelvey y *Yucca filifera* Chaub., se ensayaron contra *Rhizopus stolonifer*, *Colletotricum gloesporoides* y *Penicillium digitatum*, hongos que provocan enfermedades en importantes productos frutícolas durante la postcosecha. Los extractos etanólicos de *Y. filifera* inhibieron el crecimiento de *R. stolonifer* en más de un 60% a 2000 ul L⁻¹, alcanzando un 100% a 4000 ul L⁻¹. *Y. carnerosana* y *A. lechuguilla* inhibieron el patógeno hasta un 40% a 1.000 uL L⁻¹ y 5000 uL L⁻¹ respectivamente. *A. lechuguilla*, inhibió el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* en 100% a una dosis de 500 uL L⁻¹. Finalmente, el efecto del extracto etanólico de *Y. filifera* sobre *P. digitatum* fue del 80% a 1000 uL L⁻¹ (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2011).

Como se puede observar, las concentraciones estudiadas en esta investigación coinciden en los rangos encontrados en otros reportes, haciendo la salvedad de que en algunos casos se ha trabajado con extractos concentrados de jugos de agaváceas y el presente estudio se hizo con jugo sin concentrar.

Sin embargo, los resultados a escala *in vitro* son satisfactorios y consistentes con las investigaciones mencionadas, lo cual indica que este estudio es coherente con los hallazgos mencionados.

Dado que los estudios se hicieron bajo condiciones de laboratorio controladas, era necesario evaluar la efectividad en un ensayo *in vivo*, por lo cual se propuso como

siguiente etapa evaluar la efectividad del bioinsumo en una prueba de patogenicidad, que confirme los resultados de los análisis de laboratorio.

3.5.5 Prueba de patogenicidad. Los tratamientos se clasificaron así:

Tabla 29. Clasificación de los tratamientos para el ensayo de patogenicidad

Tratamiento	Clave
0	Testigo Absoluto
1	Benomyl 1,0 g/L
100	Bioinsumo 100 mL/L
150	Bioinsumo 150 mL/L
225	Bioinsumo 225 mL/L
325	Bioinsumo 325 mL/L
450	Bioinsumo 450 mL/L
600	Bioinsumo 600 mL/L
775	Bioinsumo 775 mL/L
975	Bioinsumo 975 mL/L
1.000	Bioinsumo 1.000 mL/L

Los resultados se aprecian la figura 22.

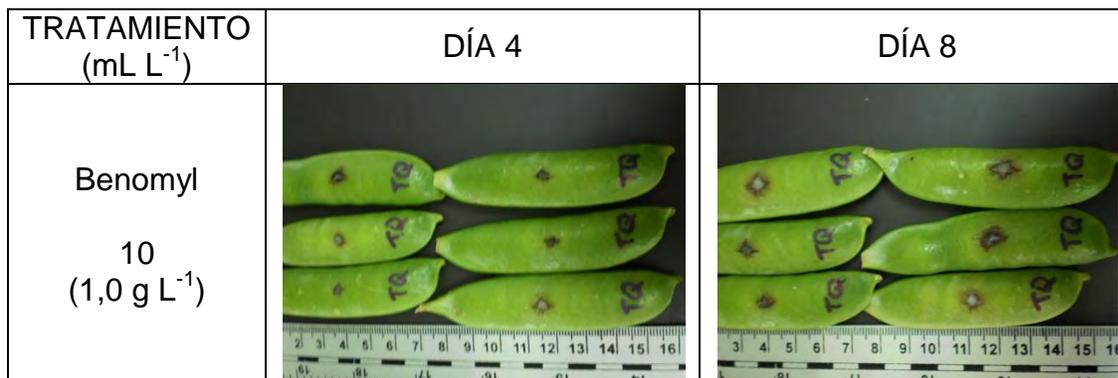
Figura 22. Fotografías de crecimiento micelial de *Ascochyta* sobre vainas

TRATAMIENTO (mL L ⁻¹)	DÍA 4	DÍA 8
11 (Testigo Absoluto)		
1 (100)		
2 (150)		
3 (225)		
4 (325)		

Figura 22. Fotografías de crecimiento micelial de *Ascochyta* sobre vainas (cont)

TRATAMIENTO (mL L ⁻¹)	DÍA 4	DÍA 8
5 (450)		
6 (600)		
7 (775)		
8 (975)		
9 (1000)		

Figura 22. Fotografías de crecimiento micelial de *Ascochyta* sobre vainas (cont)



Fuente: Esta investigación

En las fotografías se aprecia que todos los tratamientos aplicados tuvieron un efecto inhibitorio aceptable sobre el crecimiento micelial del hongo. Para verificar los datos visuales, se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la ecuación 3 y se transformaron los resultados para normalizarlos; posteriormente se realizó un análisis de varianza, cuyo resultado se muestra a continuación.

Tabla 30. ANAVA porcentaje de inhibición para ensayo de patogenicidad

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]	44	0,73	0,65	26,75

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20107,25	10	2010,73	8,92	<0,0001
CONCENTRACIÓN BIOINSUMO PAST	20107,25	10	2010,73	8,92	<0,0001
Error	7442,26	33	225,52		
Total	27549,51	43			

Tabla 31. Prueba de medias de Tukey para el ensayo de patogenicidad al día 8 de evaluación

Alfa=0,05 DMS=36,66434 Error: 225,5229 gl: 33

CONCENTRACIÓN BIOINSUMO PAST (mL/L)	Medias	n	E.E.			
1000	10,88	4	7,51	A		
975	34,21	4	7,51	A	B	
775	40,73	4	7,51	A	B	C
450	51,02	4	7,51		B	C D
600	51,94	4	7,51		B	C D
1 (BENOMYL 1 g/L)	54,23	4	7,51		B	C D E
150	62,34	4	7,51		B	C D E
225	67,85	4	7,51		B	C D E
325	76,78	4	7,51			C D E
100	77,68	4	7,51			D E
0 (TESTIGO)	90	4	7,51			E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Como resultado del análisis, los tratamientos que tuvieron mayor porcentaje de inhibición de *Ascochyta* fueron:

Tabla 32. % de crecimiento del patógeno al día 8 de evaluación – Interpretación de los resultados.

CONCENTRACIÓN BIOINSUMO PAST (mL/L)	Medias %Crecimiento
1000	3,56
975	31,61
775	42,58
450	60,43
600	62,00
1 (BENOMYL 1 g/L)	65,83
150	78,45
225	85,78
325	94,77
100	95,44
0 (TESTIGO)	100,00

La dosis aplicada que presentó un menor porcentaje de crecimiento del patógeno fue la de 1000 mL L⁻¹, (jugo puro) aunque no logró el 100% de inhibición, contrario a lo que sucedió en el análisis *in vitro*. El tratamiento químico aplicado tampoco logró la inhibición total del crecimiento micelial del patógeno, siendo estadísticamente igual al testigo y a los tratamientos de 100, 125, 225 y 325 mL L⁻¹, con una confianza del 95%.

Es necesario destacar este resultado, dado que el testigo químico utilizado es el producto más recomendado para el manejo de esta enfermedad en campo. Sin embargo, pueden existir diversos factores que explican este comportamiento.

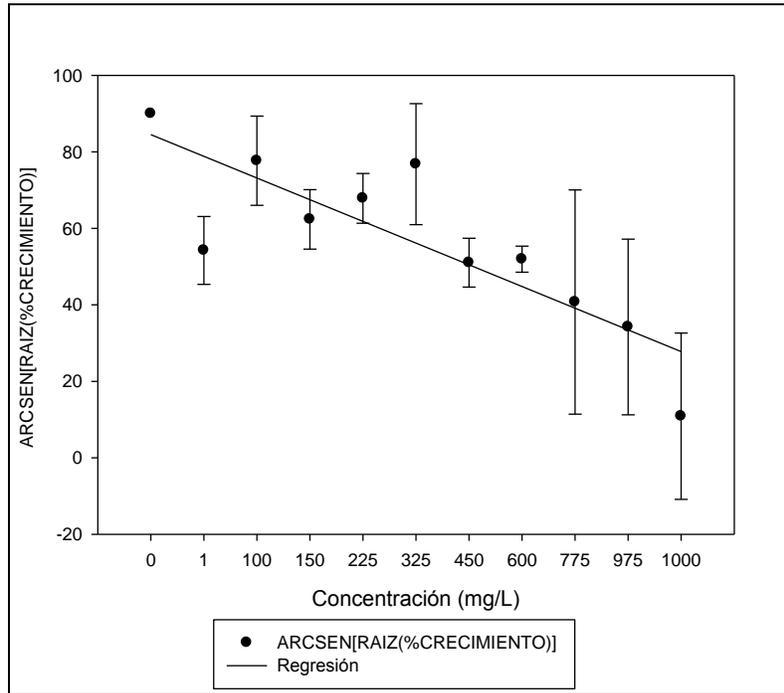
Uno de ellos puede ser la resistencia generada al patógeno, debido a las repetidas aplicaciones realizadas en los cultivos comerciales en temporadas de invierno, durante las cuales se recolectaron las vainas.

Otro factor a considerar es la diferencia en el número de estructuras de reproducción que puede existir al aplicar este método, pues no se controló el número de esporas en cada una de las unidades experimentales. A pesar de que se trabajó con micelio del hongo en crecimiento activo y que las muestras tomadas fueron iguales, puede existir una diferencia de crecimiento debida a este factor.

Lo más destacable del proceso es que el jugo pasteurizado en dosis altas (1000, 975 y 775 mL L⁻¹) mostró una acción inhibitoria del crecimiento. Este es un hallazgo importante dado que al correlacionar los resultados obtenidos de las mediciones de contenidos de saponinas por HPLC, se comprueba que el bioinsumo tratado térmicamente no pierde sus propiedades bioicidas y puede utilizarse en pruebas posteriores sobre este u otro fitopatógeno, para buscar su aplicación en otros cultivos de importancia comercial.

A partir de los resultados obtenidos, se calculó la EC₅₀ para este ensayo (gráfica 15), teniendo en cuenta que las dosis a que se trabajó se encuentran en unidades equivalentes

Gráfica 15. Gráfica de Patogenicidad Regresión Lineal



Fuente: Esta investigación

La ecuación que describe el comportamiento del porcentaje de inhibición versus el tratamiento es:

$$\text{Arcsen}[\text{Raíz}(\% \text{Crecimiento})] = 77,7109 - 0,0515 * \text{Concentración} \quad R^2 = 0,5205$$

Ecuación 7. Cálculo de la EC_{50} para ensayo de patogenicidad

Los cálculos realizados con esta ecuación indican que la $EC_{50} = 873,78 \text{ mL L}^{-1}$, es decir que la dosis que inhibe el 50% del crecimiento micelial está dentro del rango de los 900 mL L^{-1} de aplicación de bioinsumo de fique. Debido a que la dosis es tan alta, ninguno de los tratamientos, incluido el químico, logró un 100% de inhibición de crecimiento, incluido el tratamiento 1000 mL L^{-1} , que era jugo de fique puro.

Resultados similares reportan Castillo *et al.* (2010), quienes aplicaron gel de *Aloe vera* (Agavaceae) sobre uvas de mesa como tratamiento para medir la inhibición de crecimiento micelial de *B. cinerea* y *P. digitatum*. Luego de 72 h con dosis de 1 mL L⁻¹ se observó un 12% de inhibición en *P. digitatum* comparado con solo un 2,5% para *B. cinerea*, mientras que a la concentración más alta (100 mL L⁻¹) los porcentajes encontrados fueron de 99% y 87%, respectivamente.

La mayoría de investigaciones centran sus experimentos en la evaluación de extractos vegetales, por lo cual es difícil establecer si las dosis aplicadas son adecuadas para el manejo en campo.

Soetan *et al.* (2006) explican la ineficacia de las saponinas para controlar diversas clases de hongos y bacterias, por el efecto protector de las membranas microbianas. Las saponinas pueden no ser capaces de penetrar las membranas celulares de los microorganismos, lo cual puede confirmar los débiles efectos antibacterial y fungistático de la mayoría de saponinas. Farnsworth (1966) citado por los mismos autores, concluyó también que la efectividad antibiótica en mayor o menor grado es típica de todas las saponinas.

La falta de actividad antimicótica de las saponinas esteroides es consistente con otros reportes que indican que compuestos similares muestran poca actividad contra los fitopatógenos *P. oryzae* y *Hansenula anomala* (Yang *et al.*, 2006).

Los resultados encontrados por los mismos autores confirman que la actividad antifúngica de las saponinas esteroides está asociada con su grupo de aglicona y el número y la estructura de las unidades de monosacárido en sus cadenas de azúcar. Dentro de las 10 saponinas activas evaluadas, cuatro saponinas tigogenina con una porción de azúcar de cuatro o cinco unidades de monosacárido exhibieron una actividad significativa contra *C. neoformans* y *A. fumigatus*, comparable con el control positivo anfotericina B. Los extractos no exhibieron citotoxicidad con células de mamíferos. Por ello, sugieren que las

saponinas esteroides C-27 pueden considerarse como sustancias potencialmente prometedoras para control de mohos y levaduras (Yang *et al.*, 2006)..

Estas investigaciones explican que las saponinas que se encuentran en el jugo de fique tienen una potencial actividad antifúngica, pero ella depende tanto de su estructura como de la dosis aplicada y el fitopatógeno o microorganismo ensayado.

De acuerdo con la escala propuesta por Pacheco, los tratamientos se clasificaron dentro del rango 1 y 3 (1% y 5% del área de la vaina afectada, respectivamente) para todos los tratamientos. En la tabla 33 aparece el resultado de la evaluación de la escala para los tratamientos químico y bioinsumo puro, comparados con el testigo absoluto.

En todos los tratamientos se destaca que el porcentaje del área afectada por el patógeno se encuentra dentro del rango de 1 (1% del área afectada) a 3 (5% del área afectada), incluso para el testigo absoluto. Ello confirma que la cepa analizada no tuvo mucha agresividad, dado que el patógeno no colonizó una extensa área de la vaina, a pesar de tener las condiciones adecuadas para su crecimiento.

De acuerdo con Pacheco *et al.* (2011) una de las causas de esta baja severidad puede asociarse con el estado fenológico del cultivo en el momento de la recolección de las muestras; debido a que la época en que se hizo era de invierno, pudo haberse acelerado el ciclo normal del cultivo dejando al patógeno sin tiempo para producir un inóculo secundario.

Tabla 33. Escala de patogenicidad de Ascochyta

Tiempo	T0 = TESTIGO ABSOLUTO			TQ = BENOMYL 1 g/L			T9 = BIOINSUMO PURO		
	AV	AP	%AA	AV	AP	%AA	AV	AP	%AA
t1	34,371	0,32	0,93%	29,013	0,269	0,93%	24,719	0,161	0,65%
	32,675	0,326	1,00%	31,414	0,42	1,34%	21,229	0,151	0,71%
	33,471	0,371	1,11%	33,868	0,245	0,72%	22,822	0,22	0,96%
	32,563	0,354	1,09%	32,879	0,41	1,25%	23,456	0,191	0,81%
PROMEDIO	33,270	0,343	1,03%	31,794	0,336	1,06%	23,057	0,181	0,79%
t2 = 8 DÍAS	34,371	0,964	2,81%	29,013	0,42	1,45%	24,719	0,409	1,66%
	32,675	1,406	4,30%	31,414	0,914	2,91%	21,229	0,233	1,10%
	33,471	0,551	1,65%	33,868	0,605	1,79%	22,822	0,306	1,34%
	34,901	1,157	2,45%	32,023	0,9491	1,80%	26,48	0,382	1,22%
PROMEDIO	33,855	1,020	2,80%	31,580	0,722	1,99%	23,813	0,333	1,33%

AV = Área de la Vaina

AP = Área de la vaina afectada por el patógeno

%AA = Porcentaje de área afectada

t1 = Tiempo cero

t2 = Tiempo de evaluación

4. CONCLUSIONES

- Las enzimas peroxidasa (POD) y polifenoloxidasas (PPO) en jugo de fique fueron exitosamente inactivadas mediante un tratamiento de pasteurización a 75°C por un tiempo de 210 segundos (3,5 minutos). El tratamiento aplicado redujo el nivel de actividad residual de POD hasta el mínimo deseado de 10%, y un 14% en PPO, considerados como adecuados.
- El tiempo de conservación que se logró con este tratamiento fue de 9 días a temperatura ambiente, tiempo en el cual su color cambió a pardo, el cual es un indicador indirecto de la reactivación de las enzimas residuales presentes en él; el jugo refrigerado a 4°C se conservó durante 22 días sin cambios aparentes en su coloración normal, lo cual brinda un tiempo superior de vida útil, incrementando así su vida de anaquel hasta niveles aceptables.
- El contenido de hecogenina en el jugo de fique pasteurizado no tuvo cambios importantes atribuibles al tratamiento térmico. El jugo tratado tuvo una importante actividad fungistática, por lo que es posible que el tratamiento térmico a temperaturas superiores brinde mayores periodos de conservación manteniendo sus propiedades funcionales.
- Las concentración efectiva (EC_{50}) y mínima Inhibitoria (MCI) del bioinsumo de fique pasteurizado para la evaluación *in vitro* contra *Ascochyta* fue de 631,95 mg.L⁻¹ y 25.000 mg L⁻¹, respectivamente, que coincide con otras reportadas en literatura. Esto indica que el bioinsumo de fique pasteurizado tiene un amplio potencial como sustancia antifúngica contra este fitopatógeno de importancia económica para el cultivo de arveja en Nariño.
- En el ensayo de patogenicidad sobre vaina desprendida, la EC_{50} encontrada fue de 873,78 mL L⁻¹. A pesar de haber mostrado una fuerte

actividad en los ensayos *in vitro*, ninguno de los tratamientos aplicados en las pruebas sobre vaina mostró un 100% de inhibición. Sin embargo, es conveniente aclarar que el nivel de severidad encontrado en este ensayo no superó el 5% del área de la vaina afectada, por lo que se puede concluir que la aplicación del bioinsumo tuvo un efecto fungistático evaluado después de 8 días de aplicación.

- Finalmente, se puede afirmar que la actividad biológica exhibida por el bioinsumo pasteurizado de jugo de fique, así como su amplia distribución geográfica en el Departamento de Nariño, sugieren que esta especie puede tener una importante aplicación en la producción de biofungicidas a mediano plazo.

5. RECOMENDACIONES

- Es necesario ampliar las investigaciones referentes al uso del jugo de fique como biofungicida, pues los resultados son prometedores. Sería conveniente realizar pruebas en campo para verificar si el jugo aplicado en dosis altas presenta efectos fitotóxicos que impidan su utilización en cultivos comerciales.
- Los estudios en cuanto a los contenidos de saponinas en jugo de fique deben continuarse, pues existen muchos resultados contradictorios, lo que puede conducir a falsas interpretaciones. Los métodos de extracción, medición y comparación deben estudiarse más a fondo con el fin de definir una metodología adecuada y validada.
- Para futuras investigaciones es conveniente contar con los datos de edad del cultivo de fique, estado fenológico y de sanidad del mismo, pues estas variables también influyen sobre el contenido de metabolitos secundarios y son un factor importante a considerar para analizar adecuadamente los contenidos de los mismos.
- Es conveniente ampliar esta investigación con tiempos de evaluación de vida útil del jugo más amplios con el fin de confrontar el tiempo máximo de conservación del jugo con sus contenidos de saponinas.
- Finalmente, se recomienda continuar con la investigación respecto a los efectos que los tratamientos térmicos pueden tener sobre otros compuestos de interés en el jugo de fique.

BIBLIOGRAFÍA

Acevedo JF and Serna EY. Optimización del proceso de extracción de material orgánico procedente de fique (*Furcraea* spp.) y observación del efecto biofungicida. Universidad Pontificia Bolivariana de Medellín. Facultad de Ingeniería Química e Ingeniería Agroindustrial. 2004. 200 p.

Agrios GN. Plant Pathology. Academic Press, London. 2000.

Agüero MV, Ansorena MR, Roura SI, del Valle CE. Thermal inactivation of peroxidase during blanching of butternut squash. LWT - Food Science and Technology. 2008 Apr;41(3):401–7.

Allard C BL and Touraud G. L'antracnose du pois. Revue bibliographique et synthèse. Agronomie. 1993; 13 (1): 5-24.

Álvarez, David; Salazar, Claudia; Hurtado, Andrés; Delgado, Derian; Arango O. Sensibilidad *in vitro* de *Phytophthora infestans* al extracto de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) y fungicidas sistémicos. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011;9(2):96–104.

Álvarez, David; Delgado, Derian; Hurtado, Andrés. Evaluación de la concentración efectiva cincuenta (EC) del extracto de fique (*Furcraea macrophylla* Vent) sobre *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. Memorias XXXVII Congreso Nacional / Internacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. México, 2010.

Anthon GE and Barrett DM. Kinetic parameters for the thermal inactivation of quality-related enzymes in carrots and potatoes. J. Agric. Food Chem. 2002; 50: 4119- 4125.

Arnason JT, Philogene BJR and Morand P (Eds.). ACS Symposium Series No. 387. 1989.

Avallone C, Crauzov A, Montenegro S and Pellizzari E. Estudio de la actividad de la peroxidasa, pectinesterasa y polifenol oxidasa en extracto enzimático de sandía (*Citrullus vulgaris* Schard). 2000; [Consultado en línea 12 de enero de 2011] <http://www1.unne.edu.ar/cyt/2001/7-Tecnologicas/T-074.pdf>

Baquero LE, Castro JA and Narváez CE Catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa en Pitaya Amarilla (*Acanthocereus pitajaya*): maduración y senescencia. Acta Biológica Colombiana. 2005; 10 (2): 49-59.

Barreto AF, Araújo E, Bonifacio BF, Ferreira Da Silva ORR, Belém LF. Qualidade fisiológica e a incidência de fungos em sementes de algodoeiro herbáceo tratadas com extratos de agave. Revista Brasileira de oleaginosas e fibrosas. 2004; 8(1): 839-849.

Bajwa R, Khalid A and Cheema TS. Antifungal activity of allelopathic plant extracts III. Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. Pakistan J. Plant Pathol. 2003; 2: 145–156.

Beeck CP, Wroth JM, Falk DE, Khan T and Cowling WA. Two Cycles of Recurrent Selection Lead to Simultaneous Improvement in Black Spot Resistance and Stem Strength in Field Pea. Crop Sci. 2008; 48: 2235–2244

Benavides OL, Hurtado A, Arango O, Bacca D and Rojas M. Estudio fitoquímico del jugo de fique de las variedades Negra Común y Uña de Águila de los municipios de El Tambo y Guaitarilla (Nariño-Colombia). XXIX Congreso Latinoamericano De Quimica. 2010: Cartagena.

Bernstein, B.; Zehr, E.I.; Dean, R.A.; Shabi E. Characteristics of *Colletotrichum* from Peach, Apple, Pecan and Other Hosts. Plant Disease. 1995;79(5):478–82.

Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D and Osbourn A. Asaponin-detoxifying enzymemediates suppression of plant defenses. Nature. 2002; 418: 889–892.

Boerema GH and Dorenbosch MMJ. The Phoma and Ascochyta species described by Wollenweber and Hochapfel in their study on fruit-rotting. *Studies in Mycology*, No. 3. 15 June 1973. www.cbs.knaw.nl/publications/.../content.htm

Bretag TW and Ramsey M. Foliar diseases caused by fungi. In: Kraft, J.M., Pflieger, F.L. (Eds.), *Compendium of Pea Diseases and Pests*. 2nd ed. 2001. The American Phytopathology Society, St Paul, Minnesota, pp. 24–28.

Bretag TW, Keane PJ and Price TV. The epidemiology and control of ascochyta blight in field peas: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*. 2006; 57: 883–902.

Buckow R, Weiss U, Knorr D. Inactivation kinetics of apple polyphenol oxidase in different pressure–temperature domains. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Elsevier Ltd; 2009 Oct;10(4):441–8.

Bull MK, Zerdin K, Howe E, Goicoechea D, Paramanandhan P, Stockman R. The effect of high pressure processing on the microbial, physical and chemical properties of Valencia and Navel orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2004 Jun;5(2):135–49.

Cadefique. *Guía ambiental del subsector figuero 2º Edición*. ISBN 958-97785-3-4 Bogotá D.C. Enero de 2006.

Camargo SM, Rivera NJ, Manosalva M, Pacheco JC, Cély VH and Rozo WE. Extracción e identificación de hecogenina del jugo de fique de la especie *Furcraea macrophylla* (Uña de Águila) obtenido mediante cultivo de bulbos semi-estériles, como alternativa agroindustrial ecoeficiente para el sector figuero de Boyacá. XXIX Congreso Latinoamericano de Química. XVI Congreso Colombiano de Química - VI Congreso Colombiano de Cromatografía. Cartagena, 2010.

Carvalho AS, Pinho e Melo E, Ferreira BS, Neves-Petersen MT, Petersen SB and Aires-Barrosa MR. Heme and pH-dependent stability of an anionic horseradish peroxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2003; 415: 257–267.

Castillo S, Navarro D, Zapata PJ, Guillen F, Valero D, Serrano M and Martínez-Romero D. Antifungal efficacy of *Aloe vera in vitro* and its use as a preharvest treatment to maintain postharvest table grape quality. *Postharvest Biology and Technology*. 2010; 57(3): 183-188.

Castro JL, García CM, Durango DL and Palacio GL. Actividad antifúngica de la mezcla de saponinas esteroidales hecogenina- tigogenina aislada de *Furcraea* spp. XXIX Congreso Latinoamericano de Química. XVI Congreso Colombiano de Química - VI Congreso Colombiano de Cromatografía. Cartagena, 2010.

Chapagain BP, Wiesman Z and Tsrer L. In vitro study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 2007; 26 S: 109-115.

Charles-Rodriguez A, Nevarez-Moorillon G, Zhang Q, Ortega-Rivas E. (2007) Comparison of Thermal Processing and Pulsed Electric Fields Treatment in Pasteurization of Apple Juice. *Food and Bioproducts Processing* 85:93-97. doi: 10.1205/fbp06045

Chilvers MI, Rogers JD, Dugan FM, Stewart JE, Chen W, Peever TL. *Didymella pisi* sp. nov., the teleomorph of *Ascochyta pisi*. *Mycological research*. Elsevier Ltd; 2009 Mar;113(Pt 3):391–400.

Chisari M, Barbagallo RN, Spagna G. Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase and influence on browning of cold stored strawberry fruit. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2007 May 2;55(9):3469–76.

Choi S and Chung MH. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*. 2003; 1(1): 53-62.

Chutintrasri B, Noomhorm A. Thermal inactivation of polyphenoloxidase in pineapple puree. *LWT - Food Science and Technology*. 2006; 39(5): 492-495.

Cousin R, Resources G. Peas (*Pisum sativum* L .). *Field Crops Research*. 1997;53:111–30.

Cruz R, Vieira MC and Silva CL. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). *Journal of Food Engineering*. 2006; 72: 8–15.

Dalmadi I, Rapeanu G, van Loey A, Smout C and Hendrickx M. Characterization and inactivation by thermal and pressure processing of strawberry (*Fragaria ananassa*) polyphenol oxidase: a kinetic study. *Journal of Food Biochemistry*, 2006; 30: 56–76.

Davidson JA and Kimber RBE. Integrated disease management of ascochyta blight in pulse crops. In: Tivoli B, Baranger A Muehlbauer FJ, Cooke BM. *Ascochyta blights of grain legumes*. Publisher: Springer Netherlands Isbn: 978-1-4020-6065-6; 2007 p. 99-110.

Deahl K, Inglis D, DeMuth S. Testing for resistance to metalaxyl in<i>Phytophthora infestans</i> isolates from northwestern Washington. *American Journal of Potato Research*. Springer New York; 1993;70(11):779–95.

Deepak SA, Oros G, Sathyanarayana SG, Shetty NP, Shetty HS and Sashikanth S. Antisporulant activity of leaf extracts of Indian plants against *Sclerospora graminicola* causing downy mildew disease of pearl millet. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 2005; 38(1): 31-39.

Dinan L, Harmatha J and Lafont R. Review. Chromatographic procedures for the isolation of plant steroids. *Journal of Chromatography A*. 2001; 935: 105–123

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat versión 2010*. Grupo InfoStat FCA Universidad Nacional de Córdoba Argentina. FCA; 2010.

Duangmal K and Owusu Apenten RK. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano) Food Chemistry. 1999; 64: 351-359.

Duarte-Vásquez MA, Whitaker JR, Rojo-Domínguez A, García Almendárez BE and Regalado C. Isolation and Thermal Characterization of an Acidic Isoperoxidase from Turnip Roots. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2003; 51: 5096-5102.

Dugan FM, Akamatsu H, Lupien SL, Chen W, Chilvers ML, Peever TL. Ascochyta blight of chickpea reduced 38% by application of *Aureobasidium pullulans* (anamorphic Dothioraceae, Dothideales) to post-harvest debris. Biocontrol Science and Technology. 2009 May;19(5):537-45.

Encuesta Nacional Agropecuaria. Oferta agropecuaria. Corporación Colombia Internacional-MADR. 2009.

Estrada B, Bernal MA, Díaz J, Pomar F and Merino F. Fruit Development in *Capsicum annuum*: Changes in Capsaicin, Lignin, Free Phenolics, and Peroxidase Patterns. Journal of Agriculture and Food Chemistry 2000; 48: 6234-6239.

FAOStat. [Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.](http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#HOME) Disponible en internet http://faostat3.fao.org/home/index_es.html?locale=es#HOME. Consultado el 02 de marzo de 2011.

Forero Andrés Fernando y Ligarreto, Gustavo Adolfo. Evaluación de dos sistemas de tutorado para el cultivo de la arveja voluble (*Pisum sativum* L.) en condiciones de la Sabana de Bogotá. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas - Vol. 3 - No.1 - pp. 81 - 94, 2009

Fellows P. Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y Prácticas. Zaragoza (España) Editorial Acribia, 1994.

Femenia A, García-Pascual P, Simal S, Roselló C. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. Carbohydrate polymers. 2003; 51: 397-405.

Fortea MI, López-Miranda S, Serrano-Martínez A., Carreño J, Núñez-Delicado E. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). Food Chemistry. 2009 Apr;113(4):1008–14.

Gasull E and Becerra D. Caracterización de Polifenoloxidasas Extraídas de Pera (cv. Packam's Triumph) y Manzana (cv. Red Delicious). Inf. tecnol. 2006; 17(6): 69-74.

Gawlik-Dziki U, Złotek U and Swieca M. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa* var. capitata L.). Food Chemistry. 2008; 107: 129–135

Gómez JE. Evaluación del extracto de fique en el desarrollo *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporoides* (Penz) Penz & Sacc. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Corpoica Popayán:2001.

Gonçalves E, Cruz R, Abreu M, Brandão T, and Silva C. Biochemical and colour changes of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) during freezing and frozen storage. Journal of Food Engineering. 2009; 93: 32–39.

González EM, de Ancos B and Cano MP. Partial characterization of peroxidase and polyphenol oxidase activities in blackberry fruits. J. Agric. Food Chem. 2000; 48 (11): 5459 - 5464.

Gopiesh KV and Kannabiran K. Antimicrobial activity of saponin fractions of the leaves of *Gymnema sylvestre* and *Eclipta prostrata*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008; 24(11): 2737-2740.

Guerrero-Beltran JA, Swanson BG and Barbosa-Canovas GV. Inhibition of polyphenoloxidase in mango puree with 4-hexylresorcinol, cysteine and ascorbic acid. LWT - Food Science and Technology. 2005; 38(6): 625-630.

Guleria S and Kumar A. Antifungal activity of *Agave americana* leaf extract against *Alternaria brassicae*, causal agent of *Alternaria* blight of Indian mustard (*Brassica juncea*). Archives Of Phytopathology And Plant Protection. 2009; 42:4; 370 — 375.

Guo L, Ma Y, Shi J and Xue S. The purification and characterisation of polyphenol oxidase from green bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Food Chemistry. 2009; 117(1): 143-151.

Halpin BR Pressey Jen J and Mondy N. Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). J. Food Sci. 1989; 644-649.

Hanson JR. The classes of natural product and their isolation. 2003 ISBN: 978-1-84755-153-5.

Hollaway GJ, Bretag TW and Price, TV. The epidemiology and management of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisii*) of field pea (*Pisum sativum*) in Australia: a review. Australian Journal of Agricultural Research. 2007; 58: 1086–1099.

Hwang SF, Zhang R, Chang KF, Gossen BD, Turnbull GD and Bing DJ. Comparison of three methods for assessing disease reaction to *Mycosphaerella pinodes* in field pea (*Pisum sativum*). Journal of Plant Diseases and Protection. 2006; 113 (1): 20–23.

Institut National de la Recherche Agronomique INRA. Hypermedia en protection des plantes (section pathologie) HYPP Pathology [15 de mayo de 2011] URL: <http://www.inra.fr/hyp3/pathogene/6ascpis.htm#con>.

Image J software. Image processing and analysis in Java. National Institute of Health. 2004. Disponible en internet <http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>.

Jasso de Rodriguez D, Hernandez-Castillo D, Rodríguez-García R, Angulo-Sánchez JL. Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 2005; 21(1): 81-87

Jasso de Rodríguez D, Rodríguez-García R, Hernández-Castillo FD, Aguilar-González CN, Sáenz-Galindo A, Villarreal-Quintanilla JA, Moreno-Zuccolotto LE. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*. 2011; 34(1): 960-966.

Jin JM, Liu XK and Yang CR. Three new hecogenin glycosides from fermented leaves of *Agave americana*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2003; 5(2): 95-103.

Kahn V. Some biochemical properties of polyphenoloxidase from two avocado varieties differing in their browning rate. *Journal of Food Science*. 1977; 42: 38–43.

Kite GC, Porter EA and Simmonds MSJ. Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1148 (2): 177-183.

Koike ST, Gladders P and Paulus AO. *Vegetable Diseases: A Colour Handbook* Copyright © 2007 Manson Publishing Ltd ISBN-10: 1-84076-075-3 ISBN-13: 978-1-84076-075-0.

Koning RE. Enzyme Kinetics. *Plant Physiology Information Website*. 1994. Consultado el [7-26-2011]. URL:http://plantphys.info/plant_physiology/enzymekinetics.shtml.

Kraft JM, Dunne B, Goulden D and Armstrong S. A Search for Resistance in Peas to *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Disease*. 1998; 251-253.

Ling A, Lund D. 1978. Determining kinetic parameter for thermal inactivation of heat-resistant and heat-labile isozymes from thermal destruction curves. *J Food Sci* 43(4): 1307-1310.

López P, Sala FJ, De la Fuente JL, Condón S, Raso J and Burgos J. Inactivation of peroxidase, lipoxygenase and polyphenol oxidase by manothermosonication. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1994; 42: 252-256.

Ludikhuyze, L., Ooms, V., Weemaes, C., & Hendrickx, M. (1999). Kinetic study of the irreversible thermal and pressure inactivation of myrosinase from broccoli (*Brassica oleracea* L. Cv. Italica). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(5), 1794–1800.

Luiz RC, Medeiros H and Clemente E. Cinética de inactivação da polifenoloxidase e peroxidase de abacate (*Persea americana* Mill). *Cienc. Agrotec.* 2007; 31(6): 1766-1773.

Machado M and Saraiva J. Inactivation and reactivation kinetics of horseradish peroxidase in phosphate buffer and buffer-dimethylformamide solutions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002; 20: 451–457.

Martínez A. Saponinas esteroides. Universidad de Antioquia Facultad de química farmacéutica. 2001; Consultado en línea [2011-07-07] URL:<http://farmacia.udea.edu.co/~ff/saponinas2001.pdf>

Martínez, Angélica María y Caicedo, Tania Ximena. Bioensayo de toxicidad de los jugos de fique en peces, en el municipio de Tambo (Nariño). Bogotá: Universidad El Bosque, 2002. 26 p. Tesis de Postgrado en la especialización de Salud Ambiental.

Marulanda ML, Isaza AL, María VA, La IDE, Colletotrichum EDE, et al. Scientia Et Technica Identification of Colletotrichum specie responsable for anthracnose of Andean blackberry in crops grown. 2007; Pereira UTD, XIII:585–90.

Mayer AM. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review, *Phytochemistry*. 2006; 67(21): 2318-2331.

McDonald GK and Peck D. Effects of crop rotation, residue retention and sowing time on the incidence and survival of ascochyta blight and its effect on grain yield of field peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*. 2009; 111: 11–21.

McPhee K. Dry pea production and breeding: A minireview. *Food Agric. Environ*. 2003; 1:64–69.

Mdluli KM. Partial purification and characterisation of polyphenol oxidase and peroxidase from marula fruit (*Sclerocarya birrea* subsp. *Caffra*). *Food Chemistry*. 2005; 92: 311–323.

Morales-Blancas, E.F., Chandia, V.E. and Cisneros-Zevallos, L. Thermal Inactivation Kinetics of Peroxidase and Lipoxygenase from Broccoli, Green Asparagus and Carrots. *Journal of Food Science*, 67 (1), 2002, p. 146-154.

Morales-de la Peña, L., Salvia-Trujillo, M. A., Rojas-Graü, M. A., & Martín-Belloso, O. (2011). Changes on phenolic and carotenoid composition of high intensity pulsed electric field and thermally treated fruit juice–soymilk beverages during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 129, 982–990.

Muehlbauer FJ. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes. *Euphytica*. 2006; 147: 223–253.

Narváez-Cuenca CE. Extracción y medida de peroxidasa en pulpa de arazá (*Eugenia stipitata* MC Vaugh). *Quím. Nova*. 2008; 31(8).

Ndiaye C, Xu SY and Wang Z. Steam blanching effect on polyphenoloxidase, peroxidase and colour of mango (*Mangifera indica* L.) slices. *Food Chemistry* 2009; 113: 92–95

Núñez-Delicado E, Serrano-Megías M, Pérez-López AJ and López-Nicolás JM. Characterization of polyphenol oxidase from Napoleon grape. *Food Chem*. 2007; 100: 108–114.

Oleszek W and Bialy Z. Review. Chromatographic determination of plant saponins—An update (2002–2005). *Journal of Chromatography A*. 2006; 1112: 78–91.

Onfroy C, Baranger A and Tivoli B. Biotic factors affecting the expression of partial resistance in pea to ascochyta blight in a detached stipule assay. *Eur J Plant Pathol*. 2007; 119:13–27.

Osorio CA, Blanco C, Combariza MY. Sapogeninas obtenidas a partir del bagazo del fique (*Furcraea macrophylla*). XXIX Congreso Latinoamericano de Química. XVI Congreso Colombiano de Química - VI Congreso Colombiano de Cromatografía. Cartagena, 2010.

Osorio O, Martínez-Navarrete N, Moraga G, and Carbonell JV. Effect of Thermal Treatment on Enzymatic Activity and Rheological and Sensory Properties of Strawberry Purees. *Food Science and Technology International*. 2008; 14: 103-108.

Pacheco CA, Vergara MC and Ligarreto GA. Clasificación de 85 accesiones de arveja (*Pisum sativum* L.), de acuerdo con su comportamiento agronómico y caracteres morfológicos. *Agronomía Colombiana*. 2009; 27(3): 323-332.

Pacheco CA, Vergara MC and Ligarreto GA. Clasificación de 42 Líneas Mejoradas de arveja (*Pisum sativum* L.) por Caracteres Morfológicos y Comportamiento Agronómico. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín* 2010; 63(2): 5543-5553.

Pantoja AL y Latorre LI. Evaluación de tratamientos térmicos para la inactivación de las enzimas polifenoloxidasas y peroxidasa en el jugo de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) producido en el departamento de Nariño. Tesis de Grado Universidad de Nariño Facultad de Ingeniería Agroindustrial 2011.

Papadopoulou K ,Melton RE, Leggett M, Daniels MJ and Osbourn AE. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *PNAS*. 1999; 96: 1923–1928.

Pereira da Silva B, Oliveira Campos P and Paz Parente J. Chemical structure and biological activity of steroidal saponins from *Furcraea gigantea*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2006; 42 (3): 316-321.

Plaza, L., Sánchez-Moreno, C., De Ancos, B., Elez-Martínez, P., Martín-Belloso, O., & Cano, M. P. (2011). Carotenoid and flavanone content during refrigerated storage of orange juice processed by high-pressure, pulsed electric fields and low pasteurization. *LWT—Food Science and Technology*, 44, 834–839.

Polata H, Wilinska A, Bryjak J and Polakovic M. Thermal inactivation kinetics of vegetable peroxidases. *Journal of Food Engineering*. 2009; 91: 387–391.

Polaina J and MacCabe AP, editors. *Industrial Enzymes. Structure, Function and Applications*. Dordrecht, The Netherlands. © 2007 Springer.

Queiroz C, Mendes Lopes ML, Fialho E and Valente-Mesquita VL. Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*. 2008; 24(4): 361 — 375.

Quiroga EN, Sampietro AR and Vattuone MA. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 2001; 74(1): 89-96.

Rapeanu G, Van Loey A, Smout C and Hendrickx M. Biochemical characterization and process stability of polyphenoloxidase extracted from Victoria grape (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*). *Food chemistry*. 2006; 94(2): 253-261.

Rasband W (National I of H. Image J software. Image processing and analysis in Java. 2004.

Robinson, S. P., Loveys, B. R., & Chacko, E. K. (1993). Polyphenol oxidase enzymes in the sap and skin of mango fruit. *Australian Journal of Plant Physiology*, 20, 99–107.

Rodrigo C, Rodrigo M, Alvarruiz A, and Frígola A. Thermal inactivation at high temperatures and regeneration of green asparagus peroxidase. *Journal of food protection*. 1996; (59): 1065-1071.

Rodríguez-González, V.M. et al., 2011. Effects of pasteurization on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymers from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydrate Polymers*, 86(4), pp.1675-1683.

Roe S., editor. Protein Purification Techniques-Second Edition. Oxford University Press, 2001. ISBN 019 963673 7 Oxford.

Roger C, Tivoli B and Huber L. Effects of temperature and moisture on disease and fruit body development of *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*) Plant Pathology. 1999a; 48 (1): 1–9

Roger C, Tivoli B and Huber L. Effects of interrupted wet periods and different temperatures on the development of ascochyta blight caused by *Mycosphaerella pinodes* on pea (*Pisum sativum*) seedlings. Plant Path. 1999b; 48: 10–18.

Rojas M, Bacca D, Hurtado A, Benavides O and Arango O. Análisis de sapogeninas obtenidas a partir de jugo de fique (*Furcraea gigantea*) mediante cromatografía líquida de alta resolución y detector de arreglo de diodos (HPLC-PDA). XXIX Congreso Latinoamericano de Química. XVI Congreso Colombiano de Química - VI Congreso Colombiano de Cromatografía. Cartagena, 2010.

Rojas M. Elaboración y evaluación de un bioinsumo a partir de jugo de fique para el control de la gota (*Phytophthora infestans*) del cultivo de la papa en el Departamento de Nariño. Informe de investigación. Pasto, 2008.

Rudra-Shalini G, Shivare US and Basu S. Thermal inactivation kinetics of peroxidase in mint leaves. Journal of Food Engineering. 2008; 85(1): 147 – 153.

Saks Y, Barkai-Golan R. *Aloe vera* gel activity against plant pathogenic fungi. Postharvest Biology and Technology. 1995; 6(1-2): 159-165.

Sánchez E, Heredia N, and García S. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. International Journal of Food Microbiology. 2005: 271-279.

Schmidt H and Pennacchiotti I. Las enzimas en los alimentos: Su importancia en la química y la tecnología de los alimentos. Edición Digital. Biblioteca Digital de la Universidad de Chile. 2001. [03-03-2011]. URL: http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/sc_hmidth02/

Serrano-Martínez A., Fortea MI, del Amor FM, Núñez-Delicado E. Kinetic characterisation and thermal inactivation study of partially purified red pepper (*Capsicum annum* L.) peroxidase. *Food Chemistry*. 2008 Mar;107(1):193–9.

Sessa DJ and Anderson RL. Soybean peroxidases: purificación and some properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1981.

Setti B, Bencheikh M, Henni J and Neema C. Morphological and virulence variation among isolates of *Mycosphaerella pinodes* the causal agent of pea leaf blight. *African Journal of Agricultural Research*. 2011; 6(5): 1067-1075.

Silva FVM and Gibbs P. Target Selection in Designing Pasteurization Processes for Shelf-Stable High-Acid Fruit Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004; 44(5): 353 — 360.

Simmons-Boyce JL, Tinto WF, McLean S and Reynolds WF. Saponins from *Furcraea selloba* var. *marginata*. *Fitoterapia*. 2004; 75 (7-8): 634-638.

Skoglund LG, Harveson RM, Chen W, Dugan F, Schwartz HF, Markell SG, Porter L, Burrows ML and Goswami R. Ascochyta blight of peas. *Online Plant Health Progress*. 2011.

Soetan, K.O.; Oyekunle, M. A.; Aiyelaagbe, O. O.; Fafunso, M.A., 2006. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum Bicolor* L. Moench. *African Journal of Biotechnology*, 5(23), pp.2405-2407.

Solarte, Rubén D.; Osorio, Oswaldo; Hurtado, Andrés M.; Mejía, Diego F. Evaluación del Bioinsumo de Fique (*Furcraea spp*) pulverizado para el control *in*

in vitro de *Phytophthora infestans* en papa (*Solanum tuberosum* L). Inf. Tecnol. 23(3), en prensa (2012).

Soysal C and Söylemez Z. Kinetics and inactivation of carrot peroxidase by heat treatment. Journal of Food Engineering. 2005; 68: 349 – 356.

Sparg SG, Light ME and Van Staden J. Review. Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 94: 219-243.

Stichting Academisch Erfgoed. Ascochyta Pisi - the Memory of the Netherlands (het Geheugen van Nederland) [Internet]. Koninklijke Bibliotheek. Het Geheugen van Nederland Koninklijke Bibliotheek; [cited 2011 Apr 12]. Available from: <http://www.geheugenvannederland.nl/?/en/items/previous:next/&p=1&i=2&o=1&st=ASCOCHYTA+PISI&sc=%28cql.serverChoice+all+ASCOCHYTA++AND+PISI%29>

Taborda O., Gonzalo; Zuluaga R Martha V. Evaluación del contenido de saponinas presentes en el jugo del fique a diferentes grados de fermentación por cromatografía líquida (HPLC). XXIX Congreso Latinoamericano de Química. XVI Congreso Colombiano de Química - VI Congreso Colombiano de Cromatografía. Cartagena, 2010.

Tamayo PJ. Enfermedades del cultivo de la arveja en Colombia: Guía de reconocimiento y control. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica. Regional 4. Centro de investigación “La Selva”. Apartado Aéreo 100, Rionegro, Antioquia, Colombia. Boletín Técnico. 52 páginas. 2000.

Tyler VE, Brady LR, Robbers JE. Pharmacognosy, eighth ed. Lea & Ferbiger, Philadelphia. 1981; p. 67 (ISBN 0-8121-0793-4).

Taylor PWJ and Ford R. Diagnostics, genetic diversity and pathogenic variation of *Ascochyta* blight of cool season food and feed legumes. Eur J Plant Pathol. 2007; 119:127–133.

Thongsook T and Barrett DM. Heat Inactivation and Reactivation of Broccoli Peroxidase. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2005; 53: 3215-3222.

Tijskens LMM, Rodis PS, Hertog MLATM, Waldron KW, Ingham L, Proxenia N and van Dijk C. Activity of Peroxidase during Blanching of Peaches, Carrots and Potatoes. *Journal of Food Engineering*. 1997; 34: 355-370.

Timaná Y, Valencia A and Checa OE. Evaluación del complejo *Ascochyta Ascochyta pisi* y *Mycosphaerella pinodes* en 20 líneas de arveja (*Pisum sativum* L.) Tesis de Grado Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Nariño, 2011.

Tivoli B, Baranger A, Avila CM, Banniza S, Barbetti M Chen W, Davidson J, Lindeck K, Kharrat M, Rubiales D, Sadiki M, Sillero JC, Sweetingham M and Cousin R. Peas (*Pisum sativum* L.). *Field Crops Research*. 1997; 53: 111-130.

Valderrama P, Marangoni F and Clemente E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em maçã (*Mallus comunis*). *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2001; 21 (3): 321–325.

Verástegui MA, Sánchez CA, Heredia NL and García-Alvarado JS. Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *Journal of Ethnofarmacology*. 1996; 52: 175-177.

Verástegui A, Verde J, García S, Heredia N, Oranday A and Rivas C. Species of Agave with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008; 24:1249–1252.

Wang H, Hwang SF, Chang KF, Li X, Gossen BD, Turnbull GD and Howard RJ. Reaction of pea cultivars to metabolites of *Mycosphaerella pinodes* detected using Thin-layer Chromatography. *International Journal of Agriculture & Biology*. 2007; 09(3): 387–391.

Wang TF, Gossen BD and Slinkard AE. Lodging increases severity and Impact of *Mycosphaerella* blight on field pea. *Canadian Journal of Plant Science*, 2006; 86: 855-863.

Weemaes, C.A., Ludikhuyze, L.R., Van den Broeck, I., Hendricks, M.E., Tobback, P.P., Activity, electrophoretic characteristics and heat inactivation of polyphenoloxidases from apples, avocados, grapes, pears and plums. 1998. LWT – Food Science and Technology 31 (1), 44–49.

Wesche-Ebeling, P., & Montgomery, M. W. (1990). Strawberry polyphenoloxidase: Its role in anthocyanin degradation. *Journal of Food Science*, 55(3), 731–734.

Wilbraham AC and Matta MS. Introducción a la química orgánica y biológica. Addison-Wesley Iberoamericana. 1989. ISBN 9686048502, 9789686048506. 540 p.

Xue AG and Warkentin TD. Partial resistance to *Mycosphaerella pinodes*. *Can. J. Plant Sci.* 2001; 81:535–540.

Xue AG, Warkentin TD, Greeniaus MT and Zimmer RC. Genotypic variability in seedborne infections of field pea by *Mycosphaerella pinodes* and its relation to foliar disease severity. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 1996; 18: 370-374.

Yang, C.-ren *et al.*, 2006. Antifungal Activity of C-27 Steroidal Saponins. , 50(5), pp.1710-1714.

Yemenicioglu A, Ozkan M, and Cemeroglu B. Partial Purification and Thermal Characterization of Peroxidase from Okra (*Hibiscus esculentum*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1998; 46: 4158-4163.

Yokosuka A and Mimaki Y. Steroidal Glycosides from *Agave utahensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 2007; 55(1): 145—149.

Yokosuka A and Mimaki Y. Steroidal saponins from the whole plants of *Agave utahensis* and their cytotoxic activity. *Phytochemistry*. 2009; 70: 807-815.

Yoruk R, Marshall MR. Physicochemical properties and function of plant Polyphenol Oxidase: A Review. *Journal of Food Biochemistry*. 2003;27(352):361–422.

Zhang R, Hwang SF, Gossen BD, Chang KF and Turnbull GD. A Quantitative Analysis of Resistance to *Mycosphaerella* Blight in Field Pea. *Crop Sci*. 2007; 47:162–167.

Zhang JX, Fernando WGD and Xue AG. Virulence and Genetic Variability Among Isolates of *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Disease*. 2003; 87(11): 1376-1383.

Zhong K, Wu J, Wang Z, Chen F, Liao X, Hu X and Zhang Z. Inactivation kinetics and secondary structural change of PEF-treated POD and PPO. *Food Chemistry*. 2007; 100: 115–123.

Zulueta, A., Barba, F. J., Esteve, M. J., & Frígola, A. Changes in Quality and Nutritional Parameters During Refrigerated Storage of an Orange Juice–Milk Beverage Treated by Equivalent Thermal and Non-thermal Processes for Mild Pasteurization. 2012. *Food and Bioprocess Technology*. doi:10.1007/s11947-012-0858-x.

ANEXOS

Tabla A1. Datos de Actividad Enzimática de POD y PPO para cada tratamiento
(Δ Abs/min)

TRAT	PEROXIDASA (POD)					POLIFENOLOXIDASA (PPO)				
	R1	R2	R3	PROM	SD	R1	R2	R3	PROM	SD
70-1	0,0551	0,0399	0,0704	0,0551	0,0152	0,0087	0,0075	0,0066	0,0076	0,0011
70-2	0,0546	0,0428	0,0666	0,0547	0,0119	0,0089	0,0089	0,0068	0,0082	0,0012
70-3	0,0463	0,0422	0,0250	0,0378	0,0113	0,0087	0,0087	0,0052	0,0075	0,0020
70-4	0,0431	0,0428	0,0570	0,0476	0,0081	0,0074	0,0090	0,0072	0,0079	0,0010
72,5-1	0,0411	0,0452	0,0262	0,0375	0,0100	0,0038	0,0037	0,0039	0,0038	0,0001
72,5-2	0,0422	0,0361	0,0140	0,0308	0,0148	0,0050	0,0038	0,0042	0,0043	0,0006
72,5-3	0,0352	0,0271	0,0115	0,0246	0,0120	0,0051	0,0037	0,0062	0,0050	0,0013
72,5-4	0,0366	0,0207	0,0122	0,0232	0,0124	0,0081	0,0116	0,0072	0,0090	0,0023
75-1	0,0601	0,0321	0,0429	0,0450	0,0141	0,0081	0,0062	0,0070	0,0071	0,0010
75-2	0,0253	0,0229	0,0354	0,0279	0,0066	0,0064	0,0060	0,0054	0,0059	0,0005
75-3	0,0359	0,0237	0,0229	0,0275	0,0073	0,0035	0,0037	0,0052	0,0041	0,0009
75-4	0,0342	0,0236	0,0199	0,0259	0,0074	0,0041	0,0036	0,0037	0,0038	0,0003
77,5-1	0,0319	0,0542	0,0311	0,0391	0,0131	0,0032	0,0046	0,0049	0,0042	0,0009
77,5-2	0,0201	0,0299	0,0386	0,0295	0,0093	0,0043	0,0092	0,0065	0,0067	0,0025
77,5-3	0,0216	0,0314	0,0332	0,0287	0,0062	0,0044	0,0037	0,0048	0,0043	0,0006
77,5-4	0,0215	0,0241	0,0368	0,0275	0,0082	0,0027	0,0028	0,0029	0,0028	0,0001
80-1	0,0278	0,0482	0,0444	0,0401	0,0108	0,0048	0,0042	0,0036	0,0042	0,0006
80-2	0,0191	0,0424	0,0322	0,0312	0,0117	0,0050	0,0052	0,0062	0,0055	0,0006
80-3	0,0160	0,0235	0,0289	0,0228	0,0065	0,0023	0,0017	0,0037	0,0026	0,0010
80-4	0,0153	0,0223	0,0197	0,0191	0,0035	0,0016	0,0033	0,0034	0,0028	0,0010

Los índices -1,-2,-3 y -4 indican los tiempos de retención de la temperatura para cada tratamiento, así: -1 = 60 segundos; -2= 145,2 segundos; -3 = 250,8 segundos y -4 = 360 segundos.

Tabla A2. Datos de Actividad Enzimática Específica de POD y PPO para cada tratamiento (Δ Abs/min/mL de extracto enzimático)

TRAT	PEROXIDASA (POD)					POLIFENOLOXIDASA (PPO)				
	R1	R2	R3	PROM	SD	R1	R2	R3	PROM	SD
70-1	0,4592	0,3325	0,5867	0,4594	0,1271	0,0290	0,0250	0,0220	0,0253	0,0035
70-2	0,4550	0,3567	0,5550	0,4556	0,0992	0,0297	0,0297	0,0227	0,0273	0,0040
70-3	0,3858	0,3517	0,2083	0,3153	0,0942	0,0290	0,0290	0,0173	0,0251	0,0067
70-4	0,3592	0,3567	0,4750	0,3969	0,0676	0,0247	0,0300	0,0240	0,0262	0,0033
72,5-1	0,3425	0,3767	0,2183	0,3125	0,0833	0,0127	0,0123	0,0130	0,0127	0,0003
72,5-2	0,3517	0,3008	0,1167	0,2564	0,1236	0,0167	0,0127	0,0140	0,0144	0,0020
72,5-3	0,2933	0,2258	0,0958	0,2050	0,1004	0,0170	0,0123	0,0207	0,0167	0,0042
72,5-4	0,3050	0,1725	0,1017	0,1931	0,1032	0,0270	0,0387	0,0240	0,0299	0,0077
75-1	0,5008	0,2675	0,3575	0,3753	0,1177	0,0270	0,0207	0,0233	0,0237	0,0032
75-2	0,2108	0,1908	0,2950	0,2322	0,0553	0,0213	0,0200	0,0180	0,0198	0,0017
75-3	0,2992	0,1975	0,1908	0,2292	0,0607	0,0117	0,0123	0,0173	0,0138	0,0031
75-4	0,2850	0,1967	0,1658	0,2158	0,0619	0,0137	0,0120	0,0123	0,0127	0,0009
77,5-1	0,2658	0,4517	0,2592	0,3256	0,1093	0,0107	0,0153	0,0163	0,0141	0,0030
77,5-2	0,1675	0,2492	0,3217	0,2461	0,0771	0,0143	0,0307	0,0217	0,0222	0,0082
77,5-3	0,1800	0,2617	0,2767	0,2394	0,0520	0,0147	0,0123	0,0160	0,0143	0,0019
77,5-4	0,1792	0,2008	0,3067	0,2289	0,0682	0,0090	0,0093	0,0097	0,0093	0,0003
80-1	0,2317	0,4017	0,3700	0,3344	0,0904	0,0160	0,0140	0,0120	0,0140	0,0020
80-2	0,1592	0,3533	0,2683	0,2603	0,0973	0,0167	0,0173	0,0207	0,0182	0,0021
80-3	0,1333	0,1958	0,2408	0,1900	0,0540	0,0077	0,0057	0,0123	0,0086	0,0034
80-4	0,1275	0,1858	0,1642	0,1592	0,0295	0,0053	0,0110	0,0113	0,0092	0,0034

Tabla A3. Datos de medición de Actividad Enzimática Residual de POD Y PPO

TRATAMIENTO	PEROXIDASA (POD)					POLIFENOLOXIDASA (PPO)				
	R1	R2	R3	PROM	SD	R1	R2	R3	PROM	SD
70-1	21,5881	15,6328	27,5826	21,6011	5,9749	25,1305	21,6643	19,0646	21,9531	3,0432
70-2	21,3922	16,769	26,0938	21,4183	4,6625	25,7083	25,7083	19,6423	23,6863	3,5022
70-3	18,1403	16,5339	9,795	14,823	4,4279	25,1305	25,1305	15,0206	21,7605	5,837
70-4	16,8865	16,769	22,3325	18,6627	3,1787	21,3754	25,9971	20,7977	22,7234	2,8498
72,5-1	16,1029	17,7093	10,2651	14,6924	3,9174	10,9766	10,6877	11,2654	10,9766	0,2889
72,5-2	16,5339	14,1439	5,4852	12,0543	5,8132	14,4428	10,9766	12,132	12,5171	1,7649
72,5-3	13,7913	10,6177	4,5057	9,6382	4,7197	14,7317	10,6877	17,9091	14,4428	3,6194
72,5-4	14,3398	8,1102	4,7799	9,0767	4,8527	23,3974	33,5074	20,7977	25,9008	6,7145
75-1	23,5471	12,5767	16,8081	17,644	5,5327	23,3974	17,9091	20,22	20,5088	2,7555
75-2	9,9125	8,9722	13,8697	10,9181	2,599	18,4868	17,3314	15,5983	17,1388	1,4538
75-3	14,0656	9,2856	8,9722	10,7745	2,8545	10,11	10,6877	15,0206	11,9394	2,684
75-4	13,3995	9,2464	7,7968	10,1476	2,908	11,8431	10,3988	10,6877	10,9765	0,7642
77,5-1	12,4984	21,2355	12,1849	15,3063	5,1372	9,2434	13,2874	14,154	12,2283	2,621
77,5-2	7,8751	11,7148	15,1234	11,5711	3,6263	12,4208	26,5748	18,7757	19,2571	7,0893
77,5-3	8,4628	12,3025	13,0077	11,2577	2,4459	12,7097	10,6877	13,8651	12,4208	1,6083
77,5-4	8,4237	9,4423	14,4182	10,7614	3,2076	7,7991	8,088	8,3768	8,088	0,2889
80-1	10,892	18,8847	17,3958	15,7242	4,2505	13,8651	12,132	10,3988	12,132	1,7332
80-2	7,4833	16,6123	12,6159	12,2372	4,5762	14,4428	15,0206	17,9091	15,7908	1,8571
80-3	6,2688	9,2073	11,323	8,933	2,5382	6,6437	4,9106	10,6877	7,414	2,9646
80-4	5,9945	8,7371	7,7184	7,4833	1,3863	4,6217	9,5323	9,8211	7,9917	2,9221

Tabla A4. Datos de crecimiento micelial *in vitro* del complejo Ascochyta
(Áreas en cm²)

3 días					
REP	10.000 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	CONTROL
1	1,15	1,834	2,062	1,926	1,926
2	1,037	1,524	1,835	1,914	1,914
3	1,081	1,832	1,781	1,945	1,945
4	1,099	1,944	1,907	1,888	1,888
5	1,053	1,763	2,114	1,924	1,924
4 días					
REP	10.000 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	CONTROL
1	1,15	2,068	6,128	7,251	7,808
2	1,139	2,059	2,512	7,621	9,282
3	1,152	1,502	2,092	10,147	6,514
4	1,119	2,114	4,388	8,677	9,638
5	1,076	2,146	6,057	9,608	10,959
5 días					
REP	10.000 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	CONTROL
1	1,209	2,282	7,787	11,907	12,177
2	1,085	1,956	4,368	10,57	12,005
3	1,125	1,986	2,516	15,079	8,516
4	1,156	2,31	3,89	12,261	11,575
5	1,121	2,333	8,284	10,518	12,012
6 días					
REP	10.000 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	CONTROL
1	1,281	2,496	9,446	16,563	16,747
2	1,187	1,854	6,225	13,519	14,832
3	1,352	2,471	2,939	20,011	10,598
4	1,277	2,505	3,393	15,85	13,793
5	1,284	2,52	10,511	11,55	13,18
7 días					
REP	10.000 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	CONTROL
1	1,401	2,621	15,734	21,548	22,276
2	1,395	2,486	6,211	21,155	22,032
3	1,441	2,881	3,989	21,423	18,648
4	1,348	2,399	9,232	27,489	23,528
5	1,42	2,541	14,738	22,901	25,634
8 días					
REP	10.000 mg L ⁻¹	1.000 mg L ⁻¹	100 mg L ⁻¹	10 mg L ⁻¹	CONTROL
1	1,444	3,109	14,077	25,86	24,321
2	1,398	3,231	8,773	20,713	22,336
3	1,401	2,386	5,79	27,498	21,946
4	1,398	3,184	15,428	25,26	22,643

Tabla A5. Datos normalizados de % de crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* –
Días 3 a 8

ARCSEN[$\sqrt{(\%CRECIMIENTO)}$]					
DOSIS DE BIOINSUMO DE FIQUE PASTEURIZADO					
DÍA	10.000 mg L⁻¹	1.000 mg L⁻¹	100 mg L⁻¹	10 mg L⁻¹	CONTROL
3	50,624	77,420	90,000	90,000	90,000
3	47,392	63,125	78,237	90,000	90,000
3	48,245	76,168	73,140	90,000	90,000
3	49,729	90,000	90,000	90,000	90,000
4	22,582	30,997	62,375	74,579	90,000
4	20,487	28,099	31,332	64,958	90,000
4	24,898	28,685	34,541	90,000	90,000
4	19,938	27,904	42,454	71,622	90,000
5	18,360	25,658	53,130	81,494	90,000
5	17,517	23,830	37,085	69,720	90,000
5	21,284	28,881	32,956	90,000	90,000
5	18,421	26,551	35,450	90,000	90,000
6	16,081	22,706	48,677	83,720	90,000
6	16,439	20,732	40,391	72,746	90,000
6	20,916	28,881	31,803	90,000	90,000
6	17,698	25,214	29,736	90,000	90,000
7	14,537	20,060	57,140	79,737	90,000
7	14,596	19,633	32,073	78,521	90,000
7	16,141	23,141	27,581	90,000	90,000
7	13,827	18,602	38,756	90,000	90,000
8	14,123	20,977	49,552	90,000	90,000
8	14,477	22,333	38,829	74,365	90,000
8	14,655	19,269	30,931	90,000	90,000
8	14,359	22,024	55,588	90,000	90,000

Tabla A6. ANAVA para %Crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 3

DÍA	Variable	N	R ²	R ² Aj
3	ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]	20	0,89	0,86

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4615,68	4	1153,92	29,53	<0,0001
DOSIS	4615,68	4	1153,92	29,53	<0,0001
Error	586,1	15	39,07		
Total	5201,79	19			

Tabla A7. Prueba de medias de Tukey día 3 de evaluación Alfa=0,05

DMS=13,64876 Error: 39,0736 gl: 15

DOSIS BFP (mg/L)	Medias	n	E.E.	
10000	49	4	3,13	A
1000	76,68	4	3,13	B
100	82,84	4	3,13	B
10	90	4	3,13	B
0	90	4	3,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla A8. ANAVA para %Crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 4

DÍA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
4	ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]	20	0,94	0,92	15,3

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14028,62	4	3507,15	55,88	<0,0001
DOSIS	14028,62	4	3507,15	55,88	<0,0001
Error	941,41	15	62,76		
Total	14970,03	19			

Tabla A9. Prueba de medias de Tukey día 4 de evaluación Alfa=0,05

DMS=17,29798 Error: 62,7607 gl: 15

DOSIS BFP (mg/L)	Medias	n	E.E.		
10000	21,98	4	3,96	A	
1000	28,92	4	3,96	A	B
100	42,68	4	3,96		B
10	75,29	4	3,96		C
0	90	4	3,96		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

El día 4 de evaluación muestra tres grupos diferenciados con el tratamiento de 10.000 mg/L como el de menor crecimiento y donde el tratamiento a menor dosis (10 mg/L) es estadísticamente igual al control.

Tabla A10. ANAVA para %Crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 5

DÍA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
5	ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]	20	0,97	0,96	11,74

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	17216,33	4	4304,08	117,7	<0,0001
DOSIS	17216,33	4	4304,08	117,7	<0,0001
Error	548,55	15	36,57		
Total	17764,87	19			

Tabla A11. Prueba de medias de Tukey día 5 de evaluación. Alfa=0,05

DMS=13,20422 Error: 36,5698 gl: 15

DOSIS BFP (mg/L)	Medias	n	E.E.	
10000	18,9	4	3,02	A
1000	26,23	4	3,02	A
100	39,66	4	3,02	B
10	82,8	4	3,02	C
0	90	4	3,02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)**Tabla A12.** ANAVA para %Crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 6

DÍA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
6	ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]..	20	0,97	0,97	11,09

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18429,76	4	4607,44	145,13	<0,0001
DOSIS	18429,76	4	4607,44	145,13	<0,0001
Error	476,19	15	31,75		
Total	18905,95	19			

Tabla A13. Prueba de medias de Tukey día 6 de evaluación. Test:Tukey Alfa=0,05

DMS=12,30263 Error: 31,7463 gl: 15

DOSIS BFP (mg/L)	Medias	n	E.E.	
10000	17,78	4	2,82	A
1000	24,38	4	2,82	A
100	37,65	4	2,82	B
10	84,12	4	2,82	C
0	90	4	2,82	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla A14. ANAVA para %Crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 7

DÍA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
7	ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]	20	0,97	0,96	13,15

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	20148,66	4	5037,16	117,94	<0,0001
DOSIS	20148,66	4	5037,16	117,94	<0,0001
Error	640,66	15	42,71		
Total	20789,32	19			

Tabla A15. Prueba de medias de Tukey día 7 de evaluación. Alfa=0,05

DMS=14,26986 Error: 42,7107 gl: 15

DOSIS BFP (mg/L)	Medias	n	E.E.	
10000	14,78	4	3,27	A
1000	20,36	4	3,27	A
100	38,89	4	3,27	B
10	84,56	4	3,27	C
0	90	4	3,27	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla A16. ANAVA para %Crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 8

DÍA	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
8	ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]	20	0,97	0,97	11,87

Tabla A17. Prueba de medias de Tukey día 8 de evaluación. Test:Tukey Alfa=0,05

DMS=13,24047 Error: 36,7708 gl: 15

DOSIS BFP (mg/L)	Medias	n	E.E.	
10000	14,4	4	3,03	A
1000	21,15	4	3,03	A
100	43,73	4	3,03	B
10	86,09	4	3,03	C
0	90	4	3,03	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Tabla A18. Datos normalizados de % de crecimiento *in vitro* de *Ascochyta* para el día 8

REPETICIÓN	TRATAMIENTO	CRECIMIENTO	ARCSEN[RAIZ(%CRECIMIENTO)]
1	10000	0,0594	29,33
1	1000	0,1278	36,87
1	100	0,5788	60,67
1	10	0,9367	80,02
1	0	1	90,00
2	10000	0,0626	30,00
2	1000	0,1447	38,05
2	100	0,3928	52,53
2	10	0,9273	78,46
2	0	1	90,00
3	10000	0,0638	30,00
3	1000	0,1087	35,06
3	100	0,2638	45,57
3	10	0,747	68,03
3	0	1	90,00
4	10000	0,0617	30,00
4	1000	0,1406	37,46
4	100	0,6814	65,65
4	10	0,8844	75,82
4	0	1	90,00
5	10000	0,0621	30,00
5	1000	0,141	38,06
5	100	0,4776	56,17
5	10	0,8604	74,65
5	0	1	90,00

PÁGINA 116 Tabla 28. Resultados del cálculo de %Inhibición para el ensayo de patogenicidad *in vivo* – Datos Transformados

TRATAMIENTO	% INHIBICIÓN (x)	RAIZ (x)	RADIANES	ARCSEN \sqrt{x}
0	25,76	5,0754	0,0886	0,0887
0	34,92	5,9093	0,1031	0,1033
0	45,76	6,7646	0,1181	0,1183
1	59,66	7,7240	0,1348	0,1352
1	55,25	7,4330	0,1297	0,1301
1	48,14	6,9383	0,1211	0,1214
100	35,93	5,9942	0,1046	0,1048
100	25,08	5,0080	0,0874	0,0875
100	58,64	7,6577	0,1337	0,1341
150	47,8	6,9138	0,1207	0,1210
150	35,93	5,9942	0,1046	0,1048
150	34,58	5,8805	0,1026	0,1028
225	56,27	7,5013	0,1309	0,1313
225	29,83	5,4617	0,0953	0,0955
225	28,14	5,3047	0,0926	0,0927
325	50,85	7,1309	0,1245	0,1248
325	41,02	6,4047	0,1118	0,1120
325	100	10,0000	0,1745	0,1754
450	58,98	7,6798	0,1340	0,1344
450	56,95	7,5465	0,1317	0,1321
450	62,71	7,9190	0,1382	0,1387
600	50,85	7,1309	0,1245	0,1248
600	57,29	7,5690	0,1321	0,1325
600	51,19	7,1547	0,1249	0,1252
775	63,39	7,9618	0,1390	0,1394
775	63,05	7,9404	0,1386	0,1390
775	100	10,0000	0,1745	0,1754
975	63,73	7,9831	0,1393	0,1398
975	100	10,0000	0,1745	0,1754
975	100	10,0000	0,1745	0,1754
1000	100	10,0000	0,1745	0,1754
1000	66,1	8,1302	0,1419	0,1424
1000	100	10,0000	0,1745	0,1754