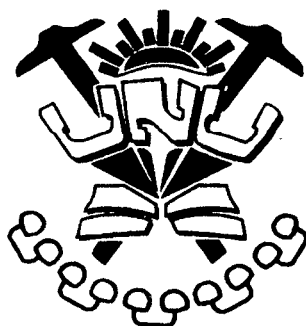


UNIVERSIDAD NACIONAL DE UCAYALI

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**ALTERACIONES BIOQUÍMICAS QUE OCASIONAN LAS PLANTAS
SUPERIORES PARÁSITAS EN CAMU CAMU (*Myrciaria
dubia* H.B.K. Mc Vaugh), PUCALLPA, PERÚ**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE

INGENIERO AGRÓNOMO

*** RAMÓN LÓPEZ GONZÁLES**

PUCALLPA - PERÚ

2010

DEDICATORIA

**A Dios que me da la fuerza y la salud para
seguir adelante**

**A mis padres a quienes amo y a mis
hermanos, con mucho cariño.**

**A Gina mi esposa y a mi hijo,
Jhonatan Elías quienes están
conmigo siempre, los amo**

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional de Ucayali y a los docentes de la facultad de ciencias agropecuarias por los conocimientos vertidos en mi preparación profesional.
- Al Ing. Eliel Sánchez Marticorena y a la Bióloga Zoyla Mirella Clavo Peralta, asesor y coasesora; por su apoyo.
- Al Dr. Víctor Sotero Solís jefe del laboratorio de Biotecnología y Sustancias Naturales bioactivas del Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana y al químico farmacéutico Martha Milagros Maco Lujan por su apoyo en los análisis fitoquímicos.
- A todas aquellas personas que directa o indirectamente cooperaron en la realización del trabajo de tesis.

Esta tesis fue sometida a consideración para su aprobación por el Jurado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Nacional de Ucayali, integrado por los siguientes docentes:

Ing. Fernando Pérez Leal

M.Sc.

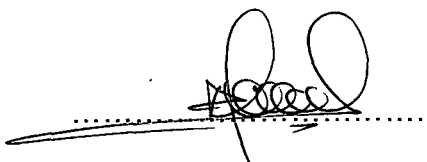

.....
Presidente

Ing. Felipe A. Ramos Macedo

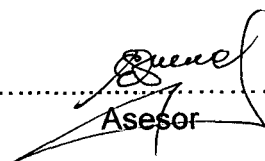

.....
Secretario

Ing. Héctor Arbildo Paredes


M.Sc.


.....
Miembro

Ing. Eliel Sánchez Marticorena


.....
Asesor

Bach. Ramón López Gonzáles


.....
Candidato

INDICE

	Página.
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	x
Lista de gráficos.....	xi
Lista de cuadros.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de esquemas.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	01
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	02
2.1. Generalidades del cultivo de camu camu.....	02
2.2.1. Clasificación taxonómica.....	03
2.1.2. Método de propagación.....	03
2.2. De las plantas parásitas.....	03
2.2.1. Generalidades.....	03
2.2.2. Propagación y diseminación.....	04
2.2.3. Ventajas y desventajas del habito parásito.....	06
2.3. Clasificación taxonómica.....	07
2.3.1. Loranthaceae (matapalos).....	07
2.3.2. Daños y elementos.....	07
2.3.3. Caracterización botánica y morfológica de la planta parásitas del género <i>Oryctanthus</i>	08
2.3.4. Caracterización del ciclo biológico.....	08
2.4. Formas que actúan los patógenos sobre las plantas.....	11
2.4.1. Armas químicas de los patógenos.....	11
3. Degradación de las sustancias de la pared celular.....	12
3.1. Degradación de las sustancias pécticas.....	12
3.2. Degradación de la celulosa.....	13
3.3. Degradación de la hemicelulosa.....	13
3.4. Degradación de la lignina.....	14
3.5. Degradación de proteínas estructurales de la pared celular.....	14

3.6. Degradación de las sustancias dentro de la planta.....	14
3.7. Degradación de proteínas dentro de la célula.....	15
4. Fitoalexinas como mecanismo de defensa de las plantas.....	15
4.1. Inductores en la producción de fitoalexinas.....	16
5. Marcha fitoquímica preliminar.....	17
5.1. Metodología en el análisis fitoquímico.....	17
6. Tamizaje fitoquímico.....	18
6.1. Saponina.....	18
6.1. Estructura.....	19
6.2. Polifenoles.....	19
6.3. Taninos.....	19
6.4. Flavonoides.....	20
6.5. Quinonas y antraquinonas.....	20
6.6. Cumarinas.....	21
6.7. Glicósidos cardiotónicos.....	21
6.8. Lactonas terpénicas.....	21
6.9. Esteroides y triterpenoides.....	22
6.10. Alcaloides.....	22
7. Método de Kjeldahl.....	23
III. MATERIALES Y METODOS.....	24
3.1. Ubicación y duración del estudio.....	24
3.2. Caracterización climática y edáfica de la zona de extracción de muestras.....	24
3.3. Método de selección de plantas parasitadas.....	25
3.4. Extracción de muestra para análisis en laboratorio.....	25
3.5. Tratamiento preliminar de las muestras.....	25
3.6. Embalaje y transporte de las muestras al laboratorio del IIAP- Loreto.....	26
3.7. Tratamiento de las muestras en el laboratorio del IIAP- Iquitos.....	26
3.8. Determinación de proteínas.....	26
3.8.1. Materiales.....	26

3.8.2. Insumos y reactivos.....	26
3.8.3. Equipos.....	27
3.8.4. Procedimiento.....	27
a). Digestión.....	28
b). Destilación.....	28
3.9. Tamizaje fitoquímico.....	29
a). Métodos.....	29
b). Técnica operatoria.....	29
1. Identificación de alcaloides.....	30
• Ensayo de Dragendorff.....	30
• Ensayo de Mayer.....	30
• Ensayo de Wagner.....	31
2. Identificación de triterpenos y esteroides.....	31
• Ensayo de Salkowski.....	31
• Ensayo de Liebermann-Burchard.....	31
3. Identificación de quinonas.....	32
• Ensayo de Borntrager.....	32
4. Identificación de cumarinas.....	32
• Ensayo de baljet.....	32
5. Identificación de saponinas.....	32
• Ensayo de la espuma.....	32
6. Identificación de fenoles y taninos.....	33
• Ensayo de cloruro férrico.....	33
7. Identificación de aminoácidos y amina.....	33
• Ensayo de ninhidrina.....	33
8. Identificación de flavonoides.....	33
• Ensayo de shinoda.....	33
9. Identificación de glicósidos.....	33
• Ensayo de Molish.....	33
3.10. Determinación polifenoles totales.....	34
Procedimiento.....	34

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
4.1. Contenido de proteína en ramas de camu camu sanas y ramas parasitadas.....	35
4.2. Tamizaje fitoquímicos.....	37
4.3 .Polifenoles totales.....	39
V. CONCLUSIONES.....	42
VI. RECOMENDACIONES.....	43
VII. BIBLIOGRAFIA.....	44
ANEXOS.....	46

RESUMEN

El trabajo de tesis, se realizó en la parcela experimental de camu camu, de la Universidad Nacional de Ucayali en la ciudad de Pucallpa, donde se identificaron ramas recientemente inoculadas, con plantas hemiparasitas, allí se desarrollo las actividades de selección y corte de muestras; y en el laboratorio, el trabajo de tratamiento, conservación y embalaje. Los análisis fitoquímicos se hicieron en el laboratorio especializado del Instituto de Investigación de la Amazonía Peruana, mediante estudios de Proteínas y polifenoles totales a ramas sanas y ramas parasitadas de 15, 30, 45, y 60 días después de la infección (DDI), y un tamizaje fitoquímico a ramas sanas y ramas de 30 y 60 DDI, encontrando alteraciones bioquímicas de la rama del camu camu frente al tiempo del parasitismo teniendo como resultado una concentración elevada de polifenoles totales, a los 15 y 30 DDI como mecanismo de defensa frente al ataque.

El proceso de penetración de la planta parásita al tejido del hospedero, está influenciada por enzimas que van ayudar a desintegrar los componentes estructurales de los tejidos, entre ellas la cutícula, membrana celular y pared celular. Esta elevada concentración de enzimas se observa a los 15 y 30 DDI, que es el tiempo en que la planta hemiparásita esta en pleno proceso de penetración.

Como conclusión del estudio se comprobó que el camu camu reacciona químicamente a los 15, 30 y 60 DDI elevando la concentración de fenoles, en respuesta a la síntesis de enzimas de la planta parásita como producto del ataque, pero esto no impide a la planta hemiparásita en su proceso de penetración y colonización.

ABSTRACT

The thesis work was conducted in the experimental plot of camu camu, National University of Ucayali in the city of Pucallpa, where branches were identified recently inoculated with Hemiparasites plants, there is development activity selection and cutting of samples; and in the laboratory, the work of processing, storage and packaging. The phytochemical analysis made in the specialized laboratory of the Research Institute of Peruvian Amazonia, studies of proteins and polyphenols to healthy branches and twigs parasitized 15, 30, 45 and 60 days after infection (DDI), and a phytochemical screening of healthy branches and branches of 30 and 60 DDI, finding biochemical changes of the branch of camu camu parasitism versus time resulting in a high concentration of polyphenols, at 15 and 30 DDI as a defense mechanism against attack. The process of penetration of the parasite, the host tissue is influenced by enzymes that will help break the structural components of tissues, including the cuticle, cell membrane and cell wall. This high concentration of enzymes was observed at 15 and 30 DDI, which is the time when the plant hemiparasite is in the process of penetration. As a conclusion, the study found that chemically reacts camu camu 15, 30 and 60 DDI raising the concentration of phenols, in response to the synthesis of enzymes of the parasitic plant as a result of the attack, but this does not prevent the plant hemiparasite in the process of penetration and colonization.

LISTA DE GRÁFICOS

En el texto	Página
Gráfico	
01. Frecuencia del contenido de proteína vs. tiempo de parasitismo.....	35
02. Frecuencia del contenido proteico.....	36
03. Curva estándar de polifenoles totales.....	41

LISTA DE CUADROS

En el texto	Página
Cuadro	
01. Resultados de análisis de proteínas IIAP- Iquitos2009.....	35
02. Resultado del tamizaje fitoquímico.....	37
03. Solución de stock como punto de referencia.....	39
04. Resumen general de los polifenoles totales.....	41

LISTA DE FIGURAS

En el texto	Página
Figuras	
01. Ciclo biológico de <i>Oryctanrhus. florulenthus</i>	10
02. Penetración de espора de hongo en tejido vegetal.....	15

LISTAS DE ESQUEMAS

En el Anexo	
01. Obtención e identificación de los metabólicos secundarios de los extractos.....	46
02. Obtención de metabolitos secundarios a partir de extractos etéreo....	47
03. Obtención de metabolitos secundarios a partir de extracto etanólico..	48
04. Obtención de metabolitos secundarios a partir de extracto acuoso.....	49

I. INTRODUCCIÓN

Dentro del mecanismo de defensa de la planta del camu camu frente al ataque de una planta parásita, el camu camu sintetizan una serie de sustancias metabólicas que intervienen en los procesos fisiológicos del parasitismo. Estas sustancias metabólicas, están constituidos por compuestos fenólicos y flavonoides, En este sentido, se conocen algunos trabajos que ponen de manifiesto la posibilidad de inducir la acumulación de fitoalexinas como respuesta a la infección; Algunas fitoalexinas pueden ser desactivadas y probablemente también catabolizadas por el patógeno generando productos de menor toxicidad. Aquellos patógenos, que no son capaces de detoxificar las fitoalexinas vegetales, sufren alteraciones y retardo en su proceso de infección; Si bien cada tipo de infección, desencadena unos mecanismos de respuestas diferentes, hay una respuesta que es común a ambos casos de infección, que es la síntesis de compuestos fenólicos.

Las plantas superiores parásitas consideradas como patógenos vegetales, por los daños que ocasionan, generan una serie de reacciones bioquímicas dentro del hospedero, durante la penetración y colonización, sobre todo en el periodo de germinación y establecimiento que dura hasta los 60 días después que la semilla haya sido inoculada.

Los mecanismos constitutivos de las plantas suelen ser de tipo estructural (topología de la superficie vegetal) como la estructura de la cutícula, la cera epicuticular, la pared celular y membrana celular. Puede haber otros mecanismos constitutivos de naturaleza química como compuestos sintetizados previamente que son almacenados en compartimentos celulares, y se liberan durante las interacciones con patógenos, algunos ejemplos son los compuestos fenólicos, las saponinas y los flavonoides. La infección de plantas parásitas, a lo largo del tiempo o a lo largo de los tejidos del vegetal, producen cambios que pueden afectar las diversas funciones del metabolismo de la planta incluyendo la fotosíntesis.

El trabajo de tesis tuvo como objetivo general, determinar las alteraciones bioquímicas que se producen al inicio y durante el proceso de infección de plantas superiores parásitas en camu camu.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. Generalidades del cultivo de camu camu.

Vásquez (2 000), menciona que dentro de la diversidad de frutales nativos, que existen en la Amazonía peruana, el camu camu arbustivo resalta por su alto contenido de ácido ascórbico, y por ello actualmente es considerado de primer orden para la industria farmacológica y alimentaria, contando en toda la Región Amazónica con 1,400 Ha de camu camu y una producción de fruta fresca de 3,250 T/año y una demanda efectiva de 36.300T/año, que muestra una amplia oportunidad de desarrollo económico.

Según Salvador (1 997), menciona que es un arbusto o árbol pequeño de 4 – 8 m de altura, fuste delgado de hasta 15 cm de diámetro, bastante ramificado desde la base, corteza externa pardo bronceado con ritidoma que se desprende como pequeñas placas laminares; corteza viva liza gris o pardo verdoso, hojas simples, opuestas y sin estípulas; lamina lanceolada u ovoide de 3 – 12 cm de largo y 1,5 – 4,5 cm. de ancho, margen entero ligeramente ondulado, ápice caudado acuminado, base sub obtusa a redondeada, haz verde oscuro ligeramente lustroso, envés verde claro y opaco, nerviación prominente en el envés, presenta abundante puntos translucidos; pecíolo corto de 3 – 8 mm y 1 mm de diámetro. Inflorescencia axilar; flores agrupadas en número de 1 – 12, subsesiles, bisexuales, cáliz con 4 lóbulos ovoides, corola con 4 pétalos blancos; ovario Infero y unos 1256 estambres. El fruto es una baya globosa o esférica de 1 – 3 cm de diámetro y peso variable de 2 – 20 gr; el epicarpio es delgado, liso, brillante con puntos glandulares y de color rosado a negro purpura; la pulpa es carnosa, ácida y de sabor y aroma agradable; las semillas en número de 1 – 4, son elípticas o reniforme, conspicuamente aplanados, cubierto por una malla de fibrillas blancas, de 8 – 15 mm de largo por 5,5 – 11 mm de ancho.

Chávez (1 993), indica que el camu camu se encuentra a lo largo del río Amazonas en Brasil, así como en la cuenca superior del Orinoco. Sin embargo, la presencia de la especie en estas zonas no es tan frecuente y abundante como las observadas a lo largo de los ríos y lagos de la Amazonía peruana.

2.1.1. Clasificación taxonómica.

Villachica (1 996), menciona que el camu camu tiene la siguiente clasificación: División, Fanerogama; Subdivisión, Angiosperma; Clase, Dicotiledóneas; Orden, Mirtales; Familia Mirtaceae; Género, Myrciaria; Especie dubia H.B.K. Mc. Vaugh.

2.1.2. Método de propagación.

Según Vásquez (2 000), menciona que actualmente, en trabajos de propagación, se viene empleando principalmente el método de injerto. Sin embargo el injerto, no es el más indicado para la propagación de plantas madres, en el trabajo de mejoramiento, por la probable influencia de la yema del patrón, sobre la calidad genética o la expresión fenotípica. En cambio en la propagación por estacas, se logra una réplica del ADN, es decir toda la información genética de la planta madre.

2.2. De las plantas parásitas.

2.2.1. Generalidades.

Según Lock (1 988), a diferencia de la gran mayoría de plantas de vida libre, que germinan y crecen sobre el suelo, las plantas parásitas, desarrollaron durante su evolución, la capacidad particular de establecerse y crecer sobre otras plantas, (hospedero), tomando de ellas recursos como agua, nutrientes y en algunos casos también carbono, que utilizan en su metabolismo. Para ello, estas plantas poseen raíces modificadas o haustorios que les permiten establecer conexiones, entre su sistema de transporte de sustancias y el de su planta hospedera; Esta conexión funcional, es la que diferencia a las plantas parásitas, de las epífitas, que crecen usando otras plantas como soporte, pero sin alimentarse a expensas de ellas.

En este cambio evolutivo de vida libre a parásita, muchas plantas han conservado su capacidad de fotosintetizar, obteniendo una parte de sus sustancias carbonadas, a partir del aire, y de la energía lumínica del sol, y el

resto extrayéndolo del hospedero. A estas parásitas verdes, se las denomina hemiparásitas; Otras plantas, sin embargo, han adoptado un hábito netamente parásito, carecen de clorofila y obtienen la totalidad de sus recursos, del hospedero, son las llamadas holoparásitas.

A su vez, según donde establecen su conexión, encontramos parásitas de rama y parásitas de raíz, mientras las primeras adhieren sus semillas y germinan sobre partes aéreas de la planta hospedera, las segundas, dispersan sus semillas al suelo, donde crecen pareciendo plantas de vida libre, aunque subterráneamente establecen una conexión entre sus raíces y las de la planta hospedera.

2.2.2. Propagación y diseminación.

Según Wetmore (1 984), menciona, que uno de los rasgos que ha sido señalados como indicadores, de estrecha interrelaciones coevolutivas entre las plantas y sus diseminadores, ha sido el alto contenido de nutrientes de la pulpa de los frutos, y la alta calidad de pulpa, que puede ser empleado por las aves y que traen como resultado final, un grado de beneficio total elevado para la aves.

El valor nutritivo de la pulpa de los frutos, ha sido considerado uno de los rasgos más importantes que define, el grado de coevolución entre la aves frugívoras y la planta que diseminan, y el principal costo de una planta para conseguir una alta calidad en su diseminación. Wetmore (1 984), propone dos patrones de coevolución: uno basado en frutos con una pulpa muy nutritivas y aves especialistas y otro basado en frutos con una pulpa poco nutritiva y aves oportunistas. Herrera en (1 981), recalca además, la importancia que tiene la arquitectura o diseño de las frutas en el grado de beneficio total, que puede ofrecer una planta a sus diseminadores, y como otra posibilidad abierta para la evolución, de interacciones muy estrecha de tipo coevolutivo entre las plantas y sus diseminadores. Se ha considerado que las plantas parásitas pertenecientes a las familias Viscaceae y Loranthaceae, sus diseminadores han desarrollado coadaptaciones (Wetmore 1 984), entre otras razones, por el grado de dependencia de las aves que las diseminan, a la ausencia de una cubierta

dura, en las semillas y finalmente al alto contenido de nutrientes en la pulpa de los frutos.

Sin embargo, no todas las aves que se alimentan de frutos son diseminadoras, algunas son predadores de semilla; bien sea porque la destruyen con su digestión o porque emplean materias nutritiva, logrando solo algunas semillas sobrevivir porque son olvidadas, o porque únicamente utilizan la parte carnosa de las frutas, sin tocar las semillas; por lo tanto, para que ocurra una diseminación efectiva, los diseminadores deben cumplir varios requisitos como son: no destruir las semillas, removerlas de la vecindad de la planta materna, las deben transportar ha habitas adecuados para su germinación y crecimiento y deben visitar la planta regularmente (Howe & Estabrook 1 977).

Chapingo (2 005), menciona que las plantas parásitas epifitas, pertenecientes a la familia Viscaceae y Loranthaceae, presentan requerimientos únicos, como por ejemplo, el que sus semillas sean depositadas intactas sobre las ramas de sus hospederos potenciales, siendo las aves sus diseminadores principales.

También menciona que las relaciones de los muérdagos (plantas parásitas), y las aves que lo diseminan han sido objeto de numerosos estudios principalmente en Europa.

La idea de que ha ocurrido coevolución, o de que existe interacciones mutualistas entre los muérdagos y las aves que lo diseminan, se originan básicamente en los siguientes hechos:

El tubo digestivo de algunos géneros de aves que se alimentan de los frutos, se encuentran modificados, aunque sigue el patrón general de las aves frugívoras, esto es un intestino corto con un lumen amplio y un estomago muscular poco desarrollado.

En América el tubo digestivo de *Euphonia* y *Clorophonia* fue estudiado por Wetmore (1 984), él encontró que el tubo digestivo carecía de un estomago muscular, o molleja desarrollada, y que como remanente solo quedaba una zona angosta entre el proventrículo y el duodeno con sus paredes delgadas y membranosas, y con un calibre mayor que los de las partes adyacentes

Wetmore (1 984) especuló que los muérdagos (*Phoradendron* y *Dendrophthora*) ofrecían frutos con una pulpa muy nutritiva, un alto porcentaje de ella esta compuesta por varias gomas, los cuales actúa como un vehículo para varias

sales de potasio, calcio y magnesio, ácidos vegetales y óxido de hierro, una combinación tónica altamente purgativa.

Las aves que se alimentan de los frutos de los muerdagos son considerados como especialistas y/o oportunistas

2.2.3. Ventajas y desventajas del hábito parásito.

A primera vista, ser una planta parásita parecería tener solamente ventajas; de sostén, agua, nutrientes y alimento asegurados de por vida; sin embargo estas plantas se enfrentan a limitaciones y dilemas que las plantas de vida libre no tienen. Quizás el principal problema que afrontan las plantas parásitas es cómo encontrarse con su planta hospedadora. Las plantas parásitas suelen ser específicas, es decir tienen la capacidad de infectar solamente una o pocas especies de plantas. A diferencia de las plantas de vida libre que simplemente liberan sus semillas al suelo, las parásitas deben asegurar que sus semillas lleguen a determinadas plantas hospedadoras para poder germinar e infectarlas. La gran mayoría de las plantas hemiparásitas de ramas logran dispersar sus semillas a través de mutualismos con animales frugívoros, es decir, un ave o un mamífero que consume sus frutos carnosos y defeca una semilla pegajosa sobre la misma u otra planta hospedadora. Sin embargo unos pocos grupos de hemiparásitas, como los *Misodendrum* de la Patagonia, poseen estrategias totalmente diferentes, ya que dispersan sus semillas con el viento o la gravedad.

Las plantas parásitas al igual que los parásitos animales, se enfrentan a un dilema crucial que es: tengo recursos de mi hospedador, sin embargo éstos no son infinitos. Si me excedo en su uso, mato a mi hospedador y me muero antes de poder reproducirme. Muchos estudios muestran que la selección natural ha determinado que parásitos muy letales se reproduzcan rápido, vivan poco tiempo y se dispersen eficientemente hacia otros hospedadores. Por otra parte, parásitos de vida larga y con una limitada capacidad de infectar a otros hospedadores obligatoriamente deben "cuidar" a su hospedador haciendo un uso limitado de los recursos (Fuentealba 1971).

2.3. Clasificación taxonómica.

Las especies de la familia Loranthaceae son las principales plantas hemiparásitas de las regiones tropicales y subtropicales del viejo y nuevo mundo, junto con otras familias dentro del Orden Santalales, comprendiendo cerca de 71 géneros y 960 especies. Su importancia radica en el hecho de considerárseles plagas de especies de interés económico (Sarget 1 995).

2.3.1. Loranthaceae (matapalos).

Según Sarget (1 995), los matapalos son arbustos, o lianas parásitos de las ramas de otros árboles, y obtienen todos sus nutrientes y agua formando conexiones directas con el xilema (tejido de conducción de la mayor parte del agua y de los minerales) del hospedero. Los matapalos no pueden desarrollar raíces normales y por lo tanto dependen completamente del hospedero. Todos tienen pigmento fotosintético y producen sus propios azúcares. Las Loranthaceas son polinizadas por aves, insectos y murciélagos y dispersadas por aves. Las plantas hemiparásitas constituyen especies vegetales que poseen clorofila y realizan la función fotosintética, pero son incapaces de tomar el agua y los nutrientes del suelo necesarios para desarrollar este proceso; es por ello que requieren absorberlos de las especies hospedera (Fuentealba 1 971).

Se ha reportado que la presencia de hemiparásitas sobre los hospederos origina una interferencia en su normal desarrollo, fenotipo y salud; principalmente con la extracción de nutrientes, espacio y daños mecánicos en los puntos de contacto (Ventosa & Oviedo 2 002).

2.3.2. Daños y elementos.

Según Ventosa & Oviedo (2 002), la primera consecuencia para el huésped del parásito, es una merma en su abastecimiento hídrico y nutriciona, posteriormente se desarrolla una atrofia progresiva a partir de la zona de implantación.

En suelos pobres poco profundos el efecto del ataque del parásito, se manifiesta más rápidamente por no poder disponer el árbol de aporte extra necesario para mantener esta planta hemiparásita. En periodo de sequía los árboles que sufren mayor infección pueden morir. El debilitamiento general de esta planta suele ser aprovechadas por otros agentes patógenos en periodos de estrés.

2.3.3. Caracterización botánica y morfológica de la planta parásitas del género (*Oryctanthus*).

Según Ramírez (2 007), que realizó estudios de plantas superiores parasitas del camu camu y limoneros clasificó al género *Oryctanthus florulentus* en la siguiente manera en las cuales se muestran a continuación.

Oryctanthus florulentus

Raíz	:	4 Raíces epicorticales
Tallo	:	Cuadrangular cuando es joven y redondeado al envejecer
Hoja	:	entera pinnada y lanceolada de 4 7 cm. x 2 -3.5 cm.
Inflorescencia:		Espiga indeterminado; uno por axila foliar
Flor:		individual simple sésil, perfecta rodeada por dos bractéolas laterales de 2 mm de 15 a 20
Fruto:		baya elipsoide anaranjado o rojo anaranjado, hundido en eje, de 6 x 4 mm.

2.3.4. Caracterización del ciclo biológico.

Según Ramírez (2 007), las semillas inoculadas en forma natural sobre las superficies de los tallos, ramas u hojas, se fijan mediante una sustancia matriz mucilaginoso, que es sustituida progresivamente por el disco haustorial, estructura de fijación inicial verdadera, desde las 24 horas de su arribo. Probablemente la dispersión desde la fuente de inóculo se produce mediante las aves, especialmente *Crotophaga sp*, que se alimenta de las bayas, posteriormente su semilla son excretada sobre los órganos de los árboles, y en

menor proporción la dispersión esta dada por otros factores que aún se desconoce. Las semillas de *O. florulenthus* germina entre los 7 y 15 días después de la inoculación (DDI), esta fase concluye cuando las dos hojas cotiledonales se muestran completamente abiertos.

Luego de la germinación las plántulas entran a un periodo de establecimiento que dura entre 60 y 90 días, según las condiciones micro climáticas predominantes; éste se caracteriza por la diferencia de su crecimiento y emisión foliar cero; pasado este periodo se, inicia la emisión de sus primeras hojas verdaderas, a partir de allí alcanza un índice de emisión foliar de 1:18, es decir, un par de hojas verdaderas cada 18 días, hasta la aparición de la inflorescencia; después de ello el índice de emisión foliar asciende a 1:10. durante su crecimiento se observa 3 periodos marcados: El establecimiento, crecimiento lento y crecimiento rápido, este ultimo coincide con la floración .La primera estructura que aparece luego de la germinación es el apesorio, estructura en forma de disco que crecen en la base del tallo, y por debajo de este encuentra el punto de inserción principal, a partir del cual internamente se origina varios punto de ingreso, que mas tarde se unen y crecen independientemente, circundando la estela ingresan hasta la medula del tallo del hospedero. Durante su ingreso hacia la medula, las células del tejido haustorial tienen contacto con las células del xilema y el floema del hospedero, de donde absorben agua minerales y fotosintatos lo que ocasiona la disminución de vitalidad del órgano infectado. Agrios (1 996), señala que se altera el equilibrio hormonal del hospedero en el área afectada produciendo hipertrofia e hiperplasia en las células, originando hinchamiento y deformaciones en las superficies de los órganos comprometidos.

La aparición de los primordios de la primera raíz epicortical es muy variable de planta a planta, su aparición fluctúa entre 35 y 133 DDI; a partir del cual su crecimiento en longitud y diámetro es relativamente rápido. La aparición de la segunda tercera y cuarta raíz epicortical también es sucesible y variable en el tiempo todas se ramifican en hasta el quinto orden y se entrecruzan, en ocasiones pierden la dominancia apical y mueren, quedando cortos hasta formar una herida casi lineal en la superficie del órgano infectado. Las raíces epicorticales tienen la capacidad de reproducción asexual, es decir que si se efectuara un mal control manual dejando fragmentos de raíces sobre el

hospedero, habrá un brotamiento de nuevas plantas a partir de ella, puede llegar a tener hasta 80 puntos de inserción por planta. Un punto de inserción significa una herida sobre el hospedero, el número varía de acuerdo a la longitud de la raíz que mide 20 cm. Las ramas secundarias comienzan a crecer desde la primera hasta la séptima yema axilar, aunque a veces puede aparecer en axilas superiores, esto también tiene la capacidad de producir inflorescencia, flores y fruto, igual que el tallo principal, la aparición de los primordios de la inflorescencia inicia entre los 180 y 210 DDI a partir de la sexta axila foliar, después de la polinización se da el crecimiento de los frutos, que también tiene una duración de 21 días, al finalizar este, el fruto se encuentra en madures absoluta y su desprendimiento desde la inflorescencia es progresivo. Luego la planta entra en reposo por un periodo de 30 días, para reiniciar con otro ciclo reproductivo. Sin embargo, la fructificación es continua en el tiempo dentro de una población, por cada espiga tiene 19 flores, poliniza el 50 por ciento, y llega a la madures entre 35 y 40 por ciento, que equivale de 6 ó 7 frutos. El ciclo biológico tiene una duración de 240 a 270 días.

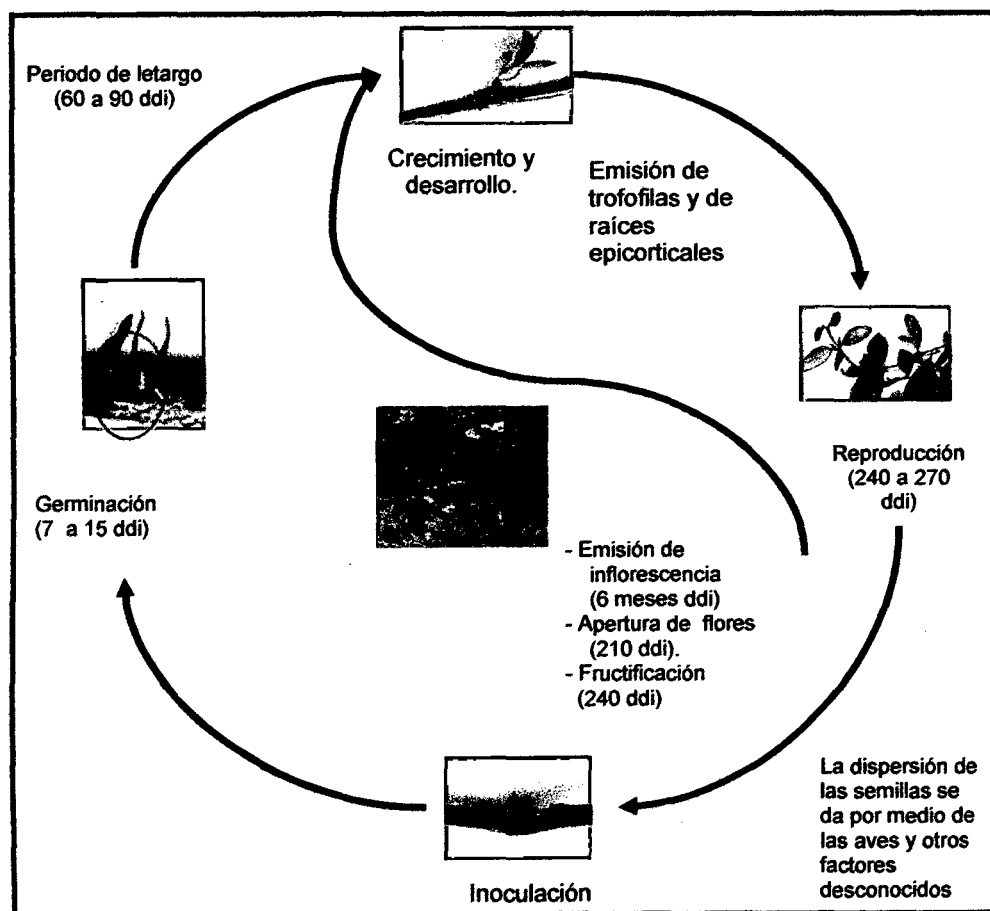


Figura 01. Ciclo biológico de *O. florulenthus*, Pucallpa, Perú, (Ramírez 2 007).

2.4. Formas que actúan los patógenos sobre las plantas.

Según Rastrepo (1 987), para que un patógeno pueda infectar una planta debe ser capaz de:

- Construir un camino dentro y a través de la planta
- Obtener nutrientes de la planta
- Neutralizar las defensa de las plantas

Fuerzas mecánicas que ejercen los patógenos sobre las plantas

- Algunos hongos, plantas parásitas y nematodos aplican “presión mecánica”
- La presión mecánica muchas veces no es suficientes, existe un cierto grado de ablandamiento y secreciones enzimáticas que favorecen al patógeno

Para que un hongo o planta parásita pueda penetrar necesita adherirse a la superficie mediante los siguientes mecanismos

- Fuerzas intermoleculares de las superficies en contacto.
- Mucilago y/o enzimas secretado por la hifa
- Superficies húmedas
- Sustancias adhesivas

Luego del contacto:

- Formación de apresorio (Incrementa la adherencia)
- Debajo del apresorio se forma la hifa de penetración (degradación enzimática de las sustancias pécticas).

2.4.1 Armas químicas de los patógenos.

Según Rastrepo (1 987), los efectos de los patógenos en la planta son el resultado de reacciones bioquímicas entre las sustancias del patógeno y de la planta hospedera y las sustancias involucradas están, enzimas (ej. *Erwinia carotovora*), toxinas (ej. Bipolares), reguladores de crecimiento (ej. *Agrobacterium*) y polisacáridos (ej. *Ralstonia*). Con excepción de los virus y viroides todos los patógenos producen estas sustancias

Rastrepo (1 987), dice que las enzimas son grandes moléculas proteínicas que catalizan toda reacciones interrelacionadas en una célula viva, para cada reacción química hay una enzima distinta que cataliza la reacción en la célula y las funciones que realizan son:

- Desintegrar los componentes estructurales.
- Degradan sustancias nutritivas inertes.

Afectan los protoplastos interfiriendo con sistemas funcionales de la célula, ya que estos compuestos conforman el mecanismo de defensa química de la planta ante el estrés producido por un patógeno entre ellas las plantas parásitas (Rastrepo 1 987).

Toxinas:

- Actúan sobre el protoplasto dificultando la permeabilidad y funcionamiento celular

Reguladores de crecimiento:

- Efecto hormonal (afecta la capacidad de dividirse y crecer)

Polisacáridos:

- Importante en enfermedades vasculares

3. Degradación de las sustancias de la pared celular.

Según Domínguez (1 979), la mayoría de los hongos y los parásitos de la plantas atraviesan mecánicamente la ceras cuticular, y algunos patógenos producen enzimas que degradan las ceras.

Cutina.

- Hongos y bacterias producen cutinasas.
- Los hongos constantemente producen bajos niveles de cutinasas.

3.1. Degradación de las sustancias pécticas.

Las pectinasas, enzimas pectolíticas o pectinolíticas, degradan las sustancias pécticas.

Enzimas pectinolíticas.

a. Pectin metil esterasa (PME).

Remueve pequeñas ramificaciones de las cadenas pectínicas, no afectan la longitud, altera la solubilidad de la pectina y la vuelve más sensible al ataque de otras enzimas.

b. Poligalacturonasas (PG, PMG)

Rompen las cadenas pécticas añadiendo una molécula de agua e hidrolizando el enlace entre dos moléculas de ácidos galacturónico.

c. Pectinliasas (PTE, PATE).

Rompen las cadenas pécticas removiendo una molécula de agua y liberando productos con un doble enlace insaturado.

3.2. Degradación de la celulosa.

Según Rastrepo (1 987), las celulosas son moléculas de glucosa unidas en cadena, son microfibrillas y son la unidad básica estructural de la pared celular.

a. Endogluconasa (endo β 1.4-gluconasa; C1, C2).

Rompen los enlaces transversales entre las cadenas

b. 1.4 B glucano celobiohidrolasa (Cx).

Degradan la celulosa a celiobosa.

c. glucosidasa

Degradan la celulosa a glucosa

3.3. Degradación de la hemicelulosa.

Las hemicelulosas son mezclas complejas de polímeros de polisacáridos, su composición es variable entre plantas, partes de la planta y estado fonológico de la planta. Los polímeros hemicelulósicos incluyen.

- Xiloglucano
- Glucomanamos
- Galactomananos
- Arabinogalactomanano

Para la degradación de la hemicelulosa intervienen enzimas

- Xylanasas
- Galactanasas
- Gluconasas
- Arabinasas
- Manasas

3.4. Degradación de la lignina.

- Fenilpropano. Unidad básica estructural.
- Presente en lamina media y pared celular secundaria de vasos xilemáticos y fibras de planta
- Es el más resistente a la degradación enzimática.

3.5. Degradación de proteínas estructurales de la pared celular.

- 5 tipos de proteína
 - Extensinas (glicoproteínas)
 - Proteínas ricas en prolina.
 - Proteínas ricas en glicina
 - Lectinas
 - Proteínas arabinogalactonanos.
- Se acumulan en respuesta a moléculas elicitoras liberada por el hongo
- El desdoblamiento de estas proteínas es similar a aquellas encontradas dentro de la planta.

3.6. Degradación de las sustancias dentro de la planta.

- Algunos nutrientes (aminoácidos y azúcares) son pequeños y pueden ser absorbidos directamente por los patógenos
- Otros nutrientes como proteínas y almidón y lípidos tiene que ser desdoblados para poder utilizarse como nutrientes

3.7. Degradación de proteínas dentro de la célula.

Dentro de la célula se encuentra una proteína formada por la unión de muchas moléculas de aminoácidos (alrededor de 20 tipos diferentes)

- Proteasas, es la enzima que degrada esta proteína es similar a enzimas de animales (Rastrepo1 987).

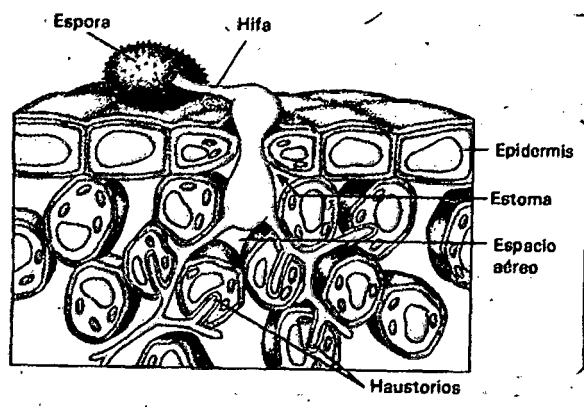


Figura 2. Penetración de espora de hongo en tejido vegetal.

4. Fitoalexinas como mecanismo de defensa de las plantas.

Según García-Mateo & Pérez (2 005), la fitoalexinas son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides de bajo peso molecular, que se sintetizan en los vegetales después de una infección microbiana. La síntesis se puede disparar por acción de factores como elicitores o inductores, tanto exógenos, producidos por patógenos, agentes químicos, daños mecánicos; como endógenos, producidos por la planta en respuesta a determinadas situaciones de estrés. Los inductores de la síntesis y acumulación de fitoalexinas no solo provienen de la planta hospedera, sino del huésped (hongos, bacterias y virus). Se ha identificado principalmente en dicotiledóneas. Existen pocos reportes de su presencia en monocotiledóneas y gimnospermas. La técnica de cultivo *in Vitro* es una alternativa para la producción de fitoalexinas y la investigación de estos metabolitos una contribución para el control de ciertas plagas.

Según Fuentealba (1 971), la base fisiológica y bioquímica de la resistencia de la planta al ataque de patógenos, se encuentra relacionada con la biosíntesis

de metabolitos secundarios implicados en los procesos infecciosos. Muchos cambios bioquímicos ocurren en las plantas después de una infección y algunos de estos cambios se han asociado con la expresión del mecanismo de defensa, produciendo sustancias llamadas fitoalexinas.

Algunos investigadores sugieren que las fitoalexinas son metabolitos secundarios, producto del estrés, inducido por altos niveles de radiación ultravioletas, heridas, descenso de temperaturas y por la aplicación de fungicidas Garcia-Mateo & Perez (2 005).

Las fitoalexinas se sintetizan en las células sanas adyacentes a las células dañadas y se acumulan tanto en tejidos necróticos resistentes, como susceptibles, es decir, se producen restringidamente en un sitio alrededor del lugar de infección. La resistencia ocurre cuando una o mas fitoalexinas alcanzan una concentración suficiente para inhibir el desarrollo del patógeno (Agrios, 1996). Se ha descrito que antes de una infección, se encuentran en una concentración casi detectable, después de una infección son sintetizadas rápidamente, casi en horas después del ataque del patógeno y son toxicas para un amplio espectro de hongos y bacterias patógenas (Taiz & Zeiger, 1 991).

Los polifenoles considerados dentro de las fitoalexinas son metabolitos secundarios de naturaleza química diversa, principalmente flavonoides de bajo peso molecular, que se sintetizan en los vegetales después de una infección patógena.

4.1. Inductores en la producción de fitoalexinas.

Para responder efectivamente a la invasión de hongos y bacterias las plantas deben reconocer su presencia para iniciar la producción. Taiz & Zeiger, (1 991), describieron la presencia de fragmentos de polisacáridos, producto de la pared celular del hongo, involucrados en el proceso de reconocimiento huésped-patógeno. Estos fragmentos probablemente producto de la hidrólisis enzimática de la pared celular vegetal como respuesta a la infección de la planta son considerados los inductores de la síntesis de la fitoalexinas. El termino inductor "elicitors" se ha usado para referirse a compuestos que inducen la síntesis de fitoalexinas en plantas.

Los inductores de la síntesis y acumulación de fitoalexinas no sólo provienen de la planta hospedera, sino del huésped. Muchos tipos de inductores se han identificado: hongos, bacterias, virus y otros patógenos que liberan o producen inductores de diversa naturaleza química como sales inorgánicas, carbohidratos complejos oligoglucanos, lípidos, ácidos grasos, oligómeros de tipo quitosanos, polipéptidos y etileno. Domínguez (1979), algunos de ellos son producto de la hidrólisis enzimática de la pared celular de las plantas también pueden ser inductores de la síntesis de fitoalexinas, cuando se presentan no sólo una infección sino algún daño mecánico, bajas temperaturas y radiaciones ultravioletas.

El mecanismo de inducción de la producción de estas sustancias aun no está claro, pero se ha descrito que en varias especies estos inductores producidos por patógenos, estimulan la transmisión del ARN mensajero del hospedero, el cual codifica la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de las fitoalexinas <http://www.virtual.unal.edu.com/cursos/ciencias>.

5. Marcha fitoquímica preliminar.

Según Domínguez (1979), una serie de métodos ha sido desarrollado, y aplicado para una detención preliminar de los constituyentes químicos en las plantas, basados en la extracción de estos con solventes apropiados y en la aplicación de pruebas de coloración.

Estas pruebas de coloración nos permite clasificar cualitativamente las sustancias presentes en un tejido vegetal.

5.1. Metodología en el análisis fitoquímicos.

En términos generales un análisis fitoquímico debe comprender cuatro etapas bien definidas.

- a). Recolección y clasificación botánica de la especie en estudio.
- b). Extracción, separación y purificación de constituyentes químicos.
- c). determinación estructural y ensayos farmacológicos.

Los ensayos farmacológicos deben ser realizados a lo largo de todo el análisis fitoquímicos, su ubicación como etapa, es meramente el tener que indicarlo en algún lugar dentro de las relación de actividades.

6. Tamizaje fitoquímico.

Según Sharapin (2 000), el tamizaje fitoquímico o "screening" fitoquímico, es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta y, a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de principios activos de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración, precipitación y otras. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con el "screening" farmacológico.

El tamizaje ("screening") fitoquímico se realiza para identificar las principales familias de metabolitos secundarios presentes en una planta.

6.1. Saponina.

Según Domínguez (1 979), Los metabolitos secundarios o productos naturales, juegan un rol muy importante en la estrategia de defensa de las plantas, cuya principal función es, mantener su integridad frente a competidores, predadores y patógenos. Dentro de los metabolitos secundarios se tienen los siguientes grupos: Alcaloides, flavonoides, saponinas, antraquinonas, terpenos y otros.

Las saponinas son glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades como las del jabón; cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando son agitadas en agua.

Las saponinas son tóxicas, se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides: Las saponinas podrían romper las membranas de las células.

6.1.1. Estructura.

Las saponinas son glicósidos, en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicón. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esterooidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales respectivamente (Domínguez 1 979).

6.2. Polifenoles.

Generalmente todos los vegetales, como producto de su metabolismo secundario normal, son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas, otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc). A pesar de que todos ellos presentan una estructura fenólica (núcleo aromático que contiene un grupo hidroxílico libre o sustituido) se diferencian de otros compuestos, que también poseen esta estructura, en su origen biosintético.

Taninos, flavonoides y cumarinas son los polifenoles de mayor presencia en un vegetal. La prueba genérica más representativa para la determinación de polifenoles es la de Folin-Ciocalteu.

6.3. Taninos.

Los taninos son compuestos polifenólicos, más o menos complejos, de origen vegetal, masa molecular relativamente elevada, capaces de formar uniones estables con las proteínas y otros polímeros como la celulosa y la pectina, por tal motivo se han venido utilizando industrialmente para curtir cueros e inhibir algunas enzimas. Debido a su toxicidad se piensa que los taninos juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas.

Los taninos se les clasifica como hidrolizables (pirogálicos) y condensados (catéquicos). Las pruebas más utilizadas para su determinación son: Gelatina/Sal y FeCl_3 .

6.4. Flavonoides.

Estos son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Desde el punto de vista químico derivan de la estructura C6-C3-C6, es decir, 2 anillos de benceno unidos por una cadena de tres átomos de carbono. Estos metabolitos son responsables de muchas coloraciones de las plantas con lo cual facilitan la polinización; además actúan como reguladores de crecimiento vegetal y como sustancias protectoras frente al ataque de microorganismos. Estos compuestos han sido muy estudiados y se ha podido demostrar que tienen actividad edulcorante, estrogénica, anticancerígena y que disminuyen la fragilidad capilar.

Para la determinación de este tipo de metabolitos se pueden realizar gran variedad de pruebas, sin embargo la más reconocida es la de Shinoda o reacción de la Cianidina que puede complementarse a través de cromatografía de papel y revelando con luz UV.

6.5. Quinonas y antraquinonas.

Las quinonas son dicetonas insaturadas que por reducción se convierten en polifenoles fácilmente regeneradas por oxidación, son abundantes en la naturaleza, en el reino vegetal se encuentran tanto en vegetales superiores como en hongos y bacterias. Dependiendo del grado de su complejidad química, si son estructuras monocíclicas, bicíclicas o tricíclicas pueden clasificarse en benzoquinonas, naftoquinonas o antraquinonas. Por sus colores, que van del amarillo al violeta, contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales y de algunos animales. El estudio de estas sustancias tiene gran interés en la actualidad por que algunos investigadores han demostrado que poseen una significativa actividad antimicrobiana y antitumoral. La prueba para quinonas más utilizada es la de Borntrager-Krauss confirmada por cromatografía de capa delgada.

6.6. Cumarinas.

Con el nombre de cumarinas se conoce a un grupo muy amplio de principios activos fenólicos que se encuentran en plantas medicinales y tienen en común una estructura química de 2H-1-benzopiran-2-ona, denominada cumarina. Sobre esta estructura, que se origina biosintéticamente por lactonización del ácido cumarínico (2-hidroxi-Zcinámico), se disponen sustituyentes de distinta naturaleza química lo que da lugar a distintos tipos de cumarinas: sencillas y complejas. Este metabolito tiene importancia biológica como agente fotosensibilizante de la piel, por su acción anticoagulante, sedante, vasodilatadora, antibacteriana, antifúngica y antihelmíntica. La mejor manera de evidenciar la presencia de cumarinas es realizando un análisis de cromatografía de capa delgada.

6.7. Glicósidos cardiotónicos.

Son sustancias amargas derivadas de los esteroides que tienen acción sobre el corazón; estos compuestos se dan tanto en plantas como en secreciones de ranas y sapos y son de gran utilidad en la defensa contra depredadores, son conocidos por sus propiedades venenosas.

Para detectar este tipo de compuestos se pueden realizar las pruebas de Baljet, Kedde y Raymond y cromatografía de capa delgada. La digitoxigenina ilustra la estructura de un aglicón derivado de un glicósido cardíaco.

6.8. Lactonas terpénicas.

Son compuestos con 15 átomos de carbono formados a partir del ácido mevalónico por la unión cabeza-cola de tres unidades isoprenoides (2-metilbutadieno -1,3), son poco distribuidas en los vegetales, se encuentran principalmente en las compuestas (Asteraceas). Su grupo principal es un ester cíclico¹⁹. Se ha demostrado que las plantas que poseen este tipo de compuesto causa dermatitis en humanos y son tóxicos para el ganado. Se han estudiado diferentes actividades biológicas entre ellas, su acción antiprotozoarios, alelopática, antimicrobiana, citotóxica y antitumoral.

Se realizan las pruebas de "hidroxamato férrico", ensayo de "legal" y cromatografía de capa delgada.

6.9. Esteroides y/o triterpenoides.

Los terpenos y los esteroides, elaborados a partir del mismo precursor, constituyen un amplio conjunto de metabolitos secundarios de los vegetales.

Todos los terpenos, tienen algo esencial en común: se puede considerar que se forman por el acoplamiento de un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas, derivadas de 2-metil butadieno.

La principal fuente de los compuestos terpenoides son los aceites esenciales, que en su mayoría son mezclas de monoterpenos y de sesquiterpenos; estos pueden ser hidrocarbonatos y oxigenados. Los terpenoides son liposolubles y se encuentran localizados en el citoplasma de las células vegetales. Los aceites esenciales son fundamentales para las plantas en el proceso de polinización y a nivel industrial son muy apetecidos, principalmente en la cosmetología y perfumería.

Estos metabolitos se extraen de los tejidos vegetales con éter de petróleo, éter etílico o cloroformo, y se separan por cromatografía sobre sílica gel o alúmina con los mismos disolventes.

6.10. Alcaloides.

No existe una definición sencilla de alcaloides puesto que es difícil tener en cuenta las diferencias entre estructuras y propiedades de 6000 compuestos descritos al grupo de alcaloides. No obstante, una definición general de alcaloides es que son sustancias orgánicas de origen natural (sobre todo del reino vegetal) nitrogenadas, de carácter básico, de distribución restringida y dotadas de propiedades farmacológicas. Además de ser tóxicos para los insectos también lo son para el hombre como para animales superiores, lo que hace que protejan a la planta que los posee de depredadores. Existe una gran utilidad de ellos en la industria como es el caso de la cafeína, la nicotina y morfina, entre otros.

Para la determinación de los alcaloides se realizan las siguientes pruebas: Dragendorff, Mayer, Valser, Reineckato de amonio y cromatografía de capa delgada.

7. Método de Kjeldahl.

El método de Kjeldahl se basa en la hidrólisis ácida de la materia orgánica de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico concentrado y sulfato de potasio en presencia de un catalizador sulfato de cobre. El nitrógeno se reduce en la sal sulfato de amonio, de la cual se libera con hidróxido de amonio en la forma de amoniaco y se destila. El destilado se valora con una solución patrón de ácido clorhídrico o sulfúrico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación y duración del estudio.

Las ramas de camu camu inoculadas naturalmente, con plantas parásitas en sus diferentes estadios; fueron obtenidas de la plantación experimental de camu camu de 8 años de edad de la Universidad Nacional de Ucayali, ubicada en el Km. 6.0 de la C.F.B. y los análisis de laboratorio fueron realizados en el Instituto de investigación de la Amazonía Peruana (IIAP-Loreto), ubicada geográficamente a 3°48'48.9" S y 73°19'18.2"W con una altitud de 128 msnm, y está situado en la comunidad Quistococha, a la altura del kilómetro 4.5 de la carretera Iquitos Nauta en el departamento de Loreto provincia de Maynas.

El experimento se inició en el mes de abril; y concluyó en el mes de diciembre del 2009, teniendo una duración de 9 meses.

3.2. Características climáticas y edáficas de la zona de extracción de muestras.

La parcela de camu camu, de donde se obtuvo las muestras, se encuentran ubicadas en un ecosistema mayor de Bosque Tropical semi siempre verde estacional (Cochrane 1 982); y según el sistema Holdrige, la amazonía peruana en su gran parte se clasifica en "Bosque Húmedo Tropical", con predominancia de los ultisol e inceptisol, de textura franco arenosa, son de color rojo y anaranjado cuando están bien drenados, y gris a crema cuando están en proceso de reducción de hierro por el mal drenaje, son ácidos de pH 4.5 a menos y con más de 70 por ciento de saturación de aluminio; además son de baja fertilidad natural en fósforo, calcio, magnesio, potasio, así como de bajo contenido de materia orgánica.

La temperatura media anual es de 25 °C, con una humedad relativa de 85 por ciento y precipitación pluvial media anual de 1 750 mm que incluye un periodo seco y otro lluvioso.

3.3. Método de selección de plantas parasitadas.

La selección de ramas de camu camu parasitadas, fueron seleccionadas de plantas francas, que presentaban buen estado sanitario y apariencia fenotípica, sobre los cuales, se logró identificar semillas de plantas parásitas recientemente inoculadas, marcándolas con una plantilla metálica de 5 cm x 4 cm rotulando la fecha de identificación, y días de parasitismo esta actividad se hizo cada dos días por el periodo de un mes, tiempo que permitió tener suficiente material de cada tratamiento para los análisis correspondiente.

3.4. Extracción de muestra para análisis en laboratorio.

La obtención de muestras (ramas) para los análisis de laboratorio, consintió en cortar ramas de camu camu con plantas parásitas de 15, 30, 45 y 60 días desde la inoculación (DDI), el diámetro promedio de las ramas a cortar fue de 2 cm de diámetro y 10 cm de largo, quedando la planta parásita en el centro de la rama; Estas ramas cortadas fueron llevadas al laboratorio de fitopatología para su tratamiento preliminar. También se corto ramas sanas (ramas que nunca fueron parasitadas) las cuales eran consideradas como tratamiento testigo para comparar las sustancias químicas presentes en ramas sanas y como estas sustancias se alteran según el tiempo de parasitismo.

3.5. Tratamiento preliminar de las muestras.

El tratamiento de las muestra (ramas de camu camu parasitadas), agrupadas según los días del parasitismo de 15, 30, 45, 60 DDI, consistió primero, en un lavado, para eliminar toda impureza externa, luego secadas en estufa eléctrica, a una temperatura de 45 °C por 12 horas para no alterar el estado de las sustancias bioquímicas, presentes en la rama y que el contenido de proteína no se desnaturalice. Una vez seco las muestras fueron colocadas en bolsas de polietileno y selladas herméticamente y puestas en refrigeración a una temperatura de 5 °C para su conservación.

3.6. Embalaje y transporte de las muestras al laboratorio del IIAP- Loreto.

Las muestras preparadas y conservadas, fueron empacadas y llevadas al laboratorio especializado de sustancias naturales del IIAP- Iquitos, donde se realizó los diferentes ensayos fitoquímicos.

3.7. Tratamiento de las muestras en el laboratorio del IIAP- Iquitos.

Una vez en el laboratorio del IIAP – Iquitos; se procedió a cortar las ramas en trozos pequeños con la ayuda de una tijera podadora y nuevamente fueron sometidas a un tiempo complementario de secado a 45 °C por 12 horas, posteriormente se molieron los trozos pequeños en una maquina moladora manual; una vez molida las muestras estaban listas para los diferentes ensayos a realizar, como tamizaje fitoquímico, identificación de proteínas según kjendahl, y determinación de polifenoles totales.

3.8. Determinación de proteínas.

3.8.1. Materiales.

- Guantes quirúrgicos
- Titulador
- Matraz de 60 ml
- Pipetas
- Probetas
- Vaso deprecipitado
- Cucharas
- Papel filtro
- Balón de digestión

3.8.2. Insumos y reactivos.

- 0,2 g de muestra seca desengrasada

- 1,5 g de sulfato de potasio (K_2SO_4)
- 0,05 gr. sulfato de cobre (CuO_4S)
- 3,5 ml de ácido sulfúrico concentrado H_2SO_4
- Agua destilada
- Hidróxido de cobre ($NaHO$) al 50%
- Acido bórico + verde de bromocresol
- Rojo de metilo
- HCL al 0,1

3.8.3. Equipos.

- Cocina de digestión kjendhl
- Balanza analítica
- Equipo de destilación

3.8.4. Procedimiento.

Desengrasado de muestras

1. Hacer un cartucho con papel de filtro, y agregar de 2 a 5 g de muestra molida.
2. Colocar el cartucho con la muestra seca molida en el cuerpo del aparato soxhlet y luego agregar hexano hasta que una parte del mismo descienda por sifón hacia el balón, conectar la fuente de calor (cocina eléctrica).
3. El solvente (hexano) al calentarse se evapora a $69\text{ }^\circ\text{C}$ y asciende a la parte superior de la cámara de extracción se condensa por refrigeración con agua y cae sobre la muestra regresando posteriormente al balón por el sifón, arrastrando consigo la grasa. El ciclo es cerrado y la velocidad de goteo del hexano debe ser de 45 a 60 gotas por minuto.
4. Esta operación dura 3 horas. El balón debe sacarse del aparato cuando este contiene poco hexano (momentos antes que este sea sifoneado desde la cámara de extracción)

5. Luego los cartuchos se colocan en un frasco de vidrio y se deja allí por 12 horas hasta que la muestra este completamente fría y seca para continuar con el proceso de digestión y destilación.

a) Digestión.

1. Pesar 0,2 g de muestra seca (desengrasada) adicionar catalizador (1,5 g de sulfato de potasio + 0,05 g de sulfato de cobre)
2. Colocar en el balón de digestión.
3. Adicionar 3,5 ml de H₂SO₄ concentrado.
4. Colocar el balón en la cocina de digestión kjeldahl (iniciar a temperatura baja).
5. Aumentar la temperatura al máximo cuando el contenido de balón muestre transparencia (continuar la digestión por 45 min mas) el tiempo total de digestión no debe ser menor de 2 horas.
6. La digestión termina cuando el contenido del balón está completamente cristalino.

b) Destilación.

1. Dejar enfriar la muestra digerida en el aparato de destilación.
2. Diluir la muestra con 50 ml de agua destilada y colocar en el equipo de destilación.
3. Agregar ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 50% lentamente hasta que la muestra digestaza y diluida cambie de color y anotar los ml usado.
4. Colocar en un vaso de precipitado 20 ml de solución de ácido bórico conteniendo el verde de bromocresol, luego se agrega 2 ml de rojo de metilo.
5. Conectar la salida de vapor en el vaso conteniendo la solución de ácido bórico para que se produzca la destilación y destilar la muestra hasta obtener 40 ml de volumen final.
6. Titular lo obtenido con HCL a 0,1 N y anotar el gasto.

cálculos:

$$\% N = \text{gasto HCL} \times 0,1 \times 0,014 \times 100 / \text{peso muestra}$$

$$\% \text{ Proteína} = N \times \text{factor proteico}$$

donde:

$$\text{Factor proteico} = 6,25$$

3.9. Tamizaje fitoquímicos.

b). Métodos.

El método que se utilizó para el tamizaje de las muestras, fue el descrito por los departamentos de farmacognosia de la Universidad medica de Budapest, en Hungría y por el departamento de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y alimentos de la Universidad de la Habana y adoptado por departamento de fitoquímica del IMETEsSALUD, mediante el protocolo de estudio respectivo.

c). Técnica operatoria.

1. Se macera 50 g de muestra seca molida en 500 ml de éter dietílico, durante 24-48 horas al medio ambiente. Luego se filtra para obtener el extracto etéreo y se distribuye en alícuotas de 5 ml en 4 tubos de ensayo; se concentran los tubos a sequedad en baño maría, para identificar: alcaloides, triterpenos-esteroides, quinonas y cumarinas.

El residuo sólido del filtrado, se seca en medio ambiente para que volatilice el éter.

2. El residuo sólido, ya libre de éter dietílico, se macera en etanol al 95 % por 24 – 48 horas. Luego se filtra para obtener el extracto etanólico y el residuo sólido se seca a temperatura ambiente para que el etanol se volatilice. El extracto etanólico obtenido se distribuye en 4 tubos de ensayo, de 5 ml cada uno y se concentra a sequedad para identificar: aminoácidos y aminos, curaminas, saponinas, fenoles y taninos. Los ml restantes del filtrado etanólico se concentra a sequedad en baño maría y se rediluye con 10 ml de HCL al 10 %, se calienta y se filtra; con 1 ml del

filtrado se realiza la prueba para alcaloides y el resto se ajusta a pH 9 con amoniaco, y se añade 0.9 g de Sulfato de sodio y se extrae con 15 ml de cloroformo en una pera de bromo, en la fase acuosa se identifica flavonoides y la fase clorofórmica, se distribuye en 3 tubos de ensayo con 5 ml cada uno y se concentran a sequedad para identificar flavonoides y quinonas.

3. El residuo libre de etanol se macera con agua destilada por 24 – 48 horas, luego se filtra y se distribuye en ocho tubos de ensayo con 5 ml cada uno, para la identificación de saponinas, alcaloides, fenoles y taninos, y flavonoides.

En el esquema N° 01 (Ver Anexos) se muestra el flujo completo del proceso de recolección y análisis de datos seguido en el presente trabajo, donde puede observarse el orden secuencial de los procedimientos descritos.

La identificación de la presencia o no de los metabolitos secundarios, estuvieron sujetos a la aplicación de los siguientes ensayos.

1. Identificación de alcaloides.

• Ensayo de Dragendorff.

La fracción seca obtenida en 3,9 C1, se disuelve en 1 ml de solución de ácido clorhídrico al 1 %, con ausencia de solvente orgánico, se mezcla con una gota del reactivo Dragendorff, si hay opalencia se considera (+), turbidez definida (++) , precipitado (+++) de color rojo ladrillo. Si el Extracto es acuoso, a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado y se procede de la misma forma.

• Ensayo de Mayer.

Se procede de la forma descrita anteriormente, hasta obtener la solución ácida. Se añade una pizca de cloruro de sodio en polvo, se agita y se filtra. Se añade 2 a 3 gotas del reactivo; si se observa opalescencia (+), turbidez definida (++) o precipitado coposo (+++) de color crema, indica la reacción positiva.

- **Ensayo de Wagner.**

Se parte al igual que en los casos anteriores de la solución ácida, añadiendo 2 o 3 gotas de reactivo Wagner, clasificando los resultados de la misma forma.

Un resultado positivo se indica por un precipitado carmelita.

2. Identificación de triterpenos y esteroides.

- **Ensayo de Salkowski.**

La fracción seca se disuelve en 1 ml cloroformo, se añade 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Un ensayo positivo se indica por una coloración amarilla rojizo.

- **Ensayo de Liebermann-Burchard.**

La fracción se mezcla bien con 1 ml de ácido acético, por la pared del tubo de ensayo se deja correr 2 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado, sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

- Rosado – azul, muy rápido
- Verde intenso, es visible aunque rápido
- Verde oscuro- negro, final de la reacción

Muy pocas veces se puede observarse el primer cambio. El tercer cambio ocurre generalmente cuando el material evaluado tiene cantidades importante de triterpenos y esteroides.

Esta reacción se emplea también para diferenciar las estructuras esteroidales de los triterpenoides, las primeras presentan coloración azul o azul verdoso, mientras que para las segundas se observa rojo, rosado y púrpura.

Estas coloraciones pueden variar por interferencias producidas por carotenos xantofilas y esteroides saturados que puedan estar presentes.

3. Identificación de quinonas.

- **Ensayo de Borntrager.**

La fracción disuelta en 1 ml de cloroformo, se agita con 1 ml de solución de hidróxido de sodio, potasio o amonio al 5% en agua. Si la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado a rojo el ensayo se considera positivo (naftaquinona y antraquinona).

4. Identificación de cumarinas.

- **Esayo de Baljet.**

Permite reconocer en un extracto la presencia de compuestos con agrupamientos lactónicos en particular curaminas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar positivos el ensayo, como: las lactosas sesquiterpénicas, cardiotónicos, etc.

Para ello si la alícuota del extracto no se encuentra en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño maría y disolverse en la menor cantidad de alcohol (1 ml). En estas condiciones se adiciona 1 ml de reactivo Baljet, considerándose un ensayo positivo la aparición o coloración de precipitado rojo.

5. Identificación de saponinas.

- **Ensayo de la espuma.**

Permite reconocer la presencia de saponinas tanto del tipo esferoidal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volúmen en agua y se agita la muestra fuertemente durante 2 minutos. El ensayo se considera positivo si aparece espuma de 2 mm de altura en la superficie del líquido y persiste por más de 2 minutos.

6. Identificación de fenoles y taninos.

- **Ensayo de cloruro férrico.**

A la fracción disuelta en 1 ml de etanol, se añade 0,5 ml de una solución de cloruro férrico al 5% en solución salina. La aparición de un color o precipitado verde oscuro indica la presencia de fenoles y/o taninos. En el extracto acuoso se adiciona acetato de sodio previo al ensayo.

7. Identificación de aminoácidos y aminas.

- **Ensayo de ninhidrina.**

Se toma una alícuota de extracto en alcohol, si el extracto se encuentra en otro solvente orgánico, este se evapora a sequedad, en ambos casos se mezclan con 2 ml de solución al 2% de ninhidrina en alcohol. La mezcla se calienta de 5 – 10 minutos en baño de agua. Este ensayo se considera positivo cuando se desarrolla un color azul violáceo.

8. Identificación de flavonoides.

- **Ensayo de shinoda.**

A 2 ml de fracción acuosa o el residuo disuelto en 2 ml de agua, se le adiciona 1 ml de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de magnesio metálico o zinc. Cuando la reacción termina, se añade 1 ml de alcohol amílico y se agita. El ensayo se considera positivo cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja o rojo; intenso en todos los casos.

9. Identificación de glicósidos.

- **Ensayo de Molish.**

2 ml del extracto acuoso se coloca en un tubo de ensayo y se le añade unas gotas de solución alfa naftol al 5% en etanol, se mezcla y por la pared del tubo se adiciona 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. La aparición de un anillo violáceo en la interfase indica una reacción positiva.

3.10. Determinación polifenoles totales.

Se utilizó el método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton y Rossi (1965) modificado por Sato y col (1996), por medio de un espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm.

Procedimiento.

A 2 g de muestra, previamente seca y molida, se le añaden 20 ml de metanol, se calienta en baño maría por 10 minutos a 60 °C y se filtra en caliente, obteniéndose así la fracción total a una concentración de 100 mg/ml.

Se prepara una solución stock de 50 mM de catequina en metanol, y a partir de ella disoluciones de 3 mg/ml, 1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.1 mg/ml y 0 mg/ml para construir la curva estándar. Posteriormente se agregan 1,58 ml de agua milipore a 20 µl de los estándares, muestras (por triplicado) y un control (agua milipore), vortéar.

Agregar 100 µl de la solución de folin ciocalteu, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente; neutralizar la reacción agregando 300 µl de una solución de carbonato de Sodio al 20%, dejar reposar por 2 horas, en el que hay una reacción completa. Colocar 1 ml de cada uno de los tubos, en una cubeta de poliestireno y leer la absorbancia por espectrofotometría a 700 nm. Previamente, se realizó la curva estándar obtenida de los estándares de catequina. Para la determinar la concentración de polifenoles totales se utilizar la siguiente expresión:

$$\text{Polifenoles, mg/mL} = [(Ac - Am) / Ac] \times n$$

Donde:

Ac = Absorbancia del control,

Am = Absorbancia de la muestra (soluciones stock),

n = Factor para corregir la dilución de la muestra.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Contenido de proteína.

Los porcentajes de contenidos proteicos analizados en ramas sanas y ramas parasitadas, a los 15, 30, 45, 60 DDI con tres repeticiones cada uno se muestra en el cuadro 01.

Cuadro 01. Resultado de análisis de proteínas IIAP-Iquitos, 2009

muestras	% proteína	% (N)	% de volumen de gasto de HCL	Desviación estándar
0 (Testigo)	5,54	0,89	1,2	0,25
15 DDI	6,85	1,10	1,5	0,25
30 DDI	6,85	1,10	1,5	0,25
45 DDI	5,83	0,93	1,3	0,25
60 DDI	6,12	0,98	1,4	0,44

Grafico 01. Frecuencia del contenido de proteína vs. tiempo de parasitismo.

IIAP – Iquitos, 2 009

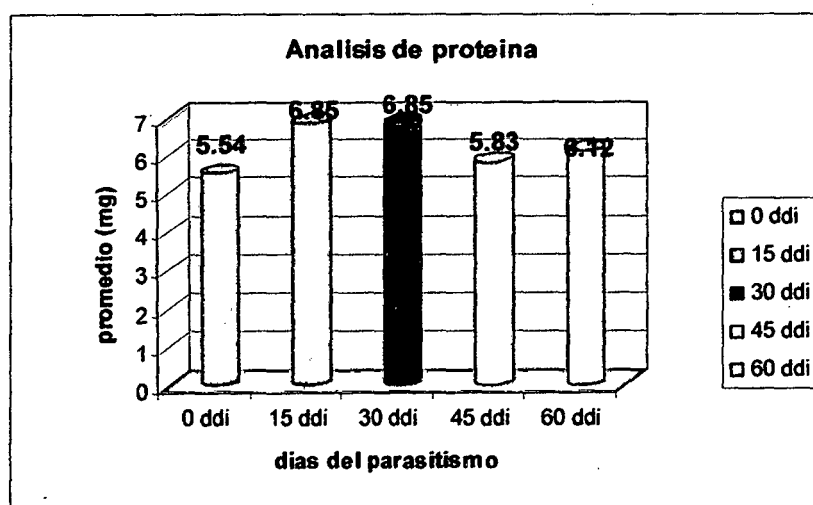
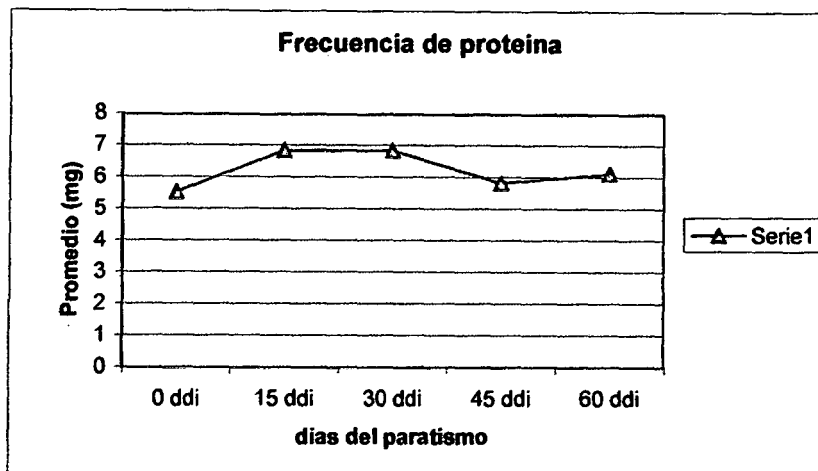


Grafico 02. Frecuencia de contenido proteico IIAP – Iquitos, 2 009.

Los contenidos de proteínas en ramas sanas es de 5,54 % consideradas como proteínas estructurales presentes en el tejido vegetal, cuando la rama de camu camu es parasitada, el contenido de proteína va en aumento a los 15 y 30 DDI (días después de la Infección), esto porque la planta parásita sintetiza enzimas que le permiten ablandar y disolver los compuestos estructurales de la planta hospedera entre ella la cutícula, membrana celular y pared celular para facilitar la penetración de sus haustorios dentro el tejidos del hospedero, hasta que haya conexión directa con el xilema, concordando lo que menciona Rastrepo (1 987), que los efectos de los patógenos en la planta, son el resultado de reacciones bioquímicas entre las sustancias del patógeno, y de la planta hospedera, y las sustancias involucradas están, las enzimas que son grandes moléculas proteínicas que catalizan toda reacciones interrelacionadas en una célula viva, para cada reacción química hay una enzima distinta que cataliza la reacción en la célula y la funciones que realizan son: la desintegración de componentes estructurales, degradación de sustancias nutritivas inertes que afectan directamente el protoplastos, interfiriendo con los sistemas funcionales de la célula.

Con los resultados obtenidos, se cuantificó el contenido de proteína según el tiempo de parasitismo concluyendo que la planta parásita segrega mayor cantidad de enzima que estarían alterando l concentraciones a los 15 y 30 días después de la infección, etapa que estaría relacionada con el proceso

de penetración en los tejidos vegetales, para pasar a la siguiente etapa que es la colonización, que según los análisis comenzaría a los 60 DDI por lo que se observa que el contenido de proteínas empieza a incrementarse en este tiempo, quedando demostrado con los resultados obtenidos. En conclusión de este análisis, se afirma que existe alteraciones bioquímica cuando empieza la fase de penetración y colonización de la planta parásita en relación a la concentración en una rama sana.

4.2. Tamizaje fitoquímicos.

Los ensayos preliminares y la marcha fitoquímica a ramas de camu camu sanas y ramas parasitadas de 30 y 60 DDI tanto en extracto etéreo, etanólico y acuoso que son análisis cualitativos permiten determinar la presencia de metabolitos secundarios y la cantidad de éstos en forma muy cualitativa. Los resultados de estos ensayos se aprecian en los cuadros 02.

Cuadro 02. Resultados de tamizaje fitoquímico IIAP – Iquitos 2 009.

METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS	REACCIONES								
		0 DDI			30 DDI			60 DDI		
		Eter	EtOH	H2O	Eter	EtOH	H2O	Eter	EtOH	H2O
Alcaloides	Dragendorff	++	0	++	++	0	++	++	0	++
	Mayer	-	0	-	-	0	-	-	0	-
	Wagner	-	0	-	-	0	-	-	0	-
Triterpenos y esteroides	Salkowshi	++	0	0	+++	0	0	++	0	0
	Burchard	++	0	0	+++	0	0	++	0	0
Quinonas	Borntraeger	-	0	0	-	0	0	-	0	0
Cumarinas	Baljet	-	-	0	-	-	0	-	-	0
Saponinas	Espuma	0	+	++	0	+++	+	0	++++	+
Flavonoides	Shinoda	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Fenoles y Taninos	Cloruro Férrico	0	++	+	0	+++	+	0	++	+
Aminoácidos y aminas	Ninhidrina	0	-	0	0	-	0	0	-	0
Glicósidos	Molish	0	0	+++	0	0	+++	0	0	++++

(++++) Muy abundante; (+++) Abundante; (++) Moderado; (+) Leve; (-) Ausente; (0) No se realizó.

- **Alcaloides**, presencia de alcaloide moderado en ramas sanas y ramas parasitadas a los 30 y 60 DDI. No se observa ninguna diferencia en el contenido de alcaloides tanto en una rama sana y en ramas parasitada de 30 y 60 DDI.
- **Triterpenos**, se observa una presencia moderado en ramas sanas ramas parasitadas de 60 DDI, pero se observa abundante presencia a los 30 DDI.
- **Quinonas**, no se encontró presencia de quinonas en ninguno de los ensayos.
- **Cumarinas**, no se encontró en ninguno de los ensayos, según Domínguez (1 973) las cumarinas conocidas (son más de 115), se les encuentra libres en las plantas y se les encuentra comúnmente en las leguminosas, pese a su abundancia en la naturaleza y a su diversidad estructural, su papel fisiológico solo se conoce parcialmente. Se ha encontrado que pueden ser anticoagulantes como el dicoumorol y la cumarina, espasmódica e hipercolestermicas o inhibidoras del crecimiento vegetal. Cabe indicar que Luck (1 988), los considera parte de compuestos fenólicos.
- **Saponinas**, muy abundante en 60 DDI extracto etanólico, y leve en extracto acuoso, y moderado en extracto etanólico.
- **Fenoles y taninos**, en cloruro férrico tenemos presencia moderada en 0 y 60 DDI en extracto etanólico y leve en 0, 30, y 60 DDI extracto acuoso y abundante presencia en 30 DDI extracto etanólico,
En gelatina tenemos abundante en extracto acuoso en 0 DDI y leve en 30 DDI. Según Lock (1 988), los compuestos fenólicos son sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, en este grupo los más característicos son los flavonoides.
- **Aminoácidos**, sin presencia
- **Glicósidos**, abundante en extracto acuoso a los 0 y 30 DDI y muy abundante a los 60 DDI

Entonces se puede resumir, que en ramas de camu camu sanas existe una presencia de: tritérpenos y esteroides, saponinas, alcaloides, fenoles y taninos, Glicósidos en concentraciones moderada.

Las ramas de camu camu de 30 DDI presentan: alcaloides, tritérpenos y esteroides, en concentraciones moderadas y saponinas, fenoles y taninos, en concentraciones abundantes ya que estos compuestos conforman el mecanismo de defensa química de la planta ante la infección producida por un patógeno entre ellas las plantas parasitas (Rastrepo 1 987).

Las ramas de camu camu de 60 DDI presentan: alcaloides, tritérpenos, esteroides, fenoles y taninos, en concentraciones moderadas, y saponinas y glicósidos en forma muy abundante.

4.3. Polifenoles totales.

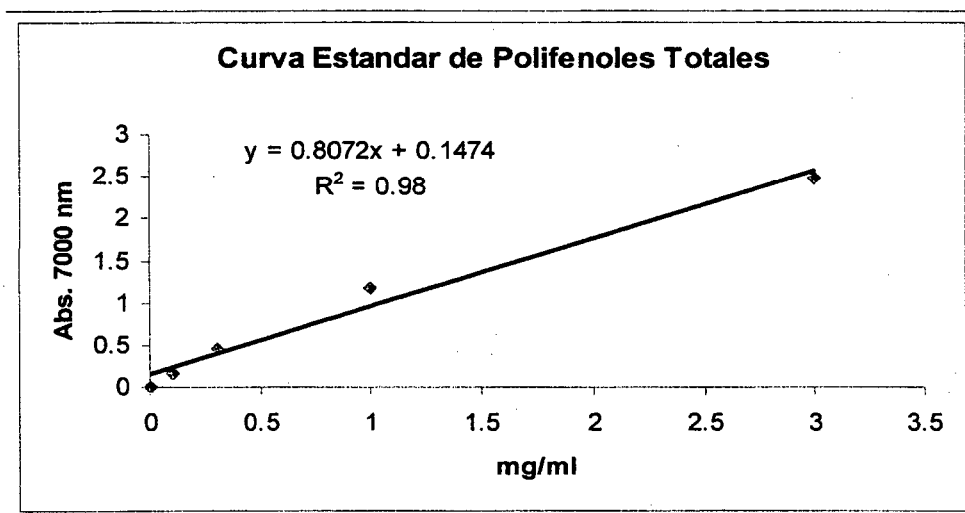
Grafico 03: Concentración de polifenoles totales

Solución de catequina

Extractos metabólicos

Cuadro03. Solución stock como punto de referencia para construir la curva estándar.

mg/L catequina	absorbancia 700nm
3	2.491
1	1.178
0.3	0.447
0.1	0.167
0	0.006



El gráfico 03 indica la concentración de polifenoles encontrado con los estándares de catequina en esta determinada longitud de onda; dando lugar a la ecuación de la línea de tendencia o regresión en la que "y" representa a cualquier otro punto de absorbancia a 700 nm y "x" a la concentración de polifenoles que expresa el punto "y". El valor R^2 , denominado coeficiente de determinación múltiple, nos indica que porcentaje de las variaciones no se explica a través del modelo de regresión, es como si fuera la varianza inexplicada considerada como varianza de los residuos. En nuestro solución stock R^2 es de 98 % por lo que solo conseguimos explicar el 98 % de las varianzas entre las variables independiente y la variables dependiente.

Cuadro 04. Resumen general de los polifenoles totales obtenidos de las muestras en estudio por medio de un espectrofotómetro UV/VIS a 700 nm.

muestra	Lecturas Abs. 700 nm	Conc. mg/ml	FD	cc final	mg/100g	promedio	desvest
M-0-1	1.522	1.7029	1600	2724.6779	272.4678		
M-0-2	1.483	1.6546	1600	2647.3736	264.7374	278.55	0.11
M-0-3	1.653	1.8652	1600	2984.3409	298.4341		
M-15-1	2.906	3.4175	1600	5467.9881	546.7988		
M-15-2	2.987	3.5178	1600	5628.5431	562.8543	539.66	0.17
M-15-3	2.717	3.1833	1600	5093.3598	509.3360		
M-30-1	2.001	2.2963	1600	3674.1328	367.4133		
M-30-2	1.773	2.0139	1600	3222.2002	322.2200	339.20	0.15
M-30-3	1.802	2.0498	1600	3279.6829	327.9683		
M-45-1	1.406	1.5592	1600	2494.7473	249.4747		
M-45-2	1.928	2.2059	1600	3529.4351	352.9435	282.97	0.38
M-45-3	1.391	1.5406	1600	2465.0149	246.5015		
M-60-1	1.814	2.0647	1600	3303.4688	330.3469		
M-60-2	2.244	2.5974	1600	4155.7978	415.5798	364.37	0.28
M-60-3	1.899	2.1700	1600	3471.9524	347.1952		

Se puede observar que en las ramas de camu camu parasitadas a los 15 y 30 DDI la concentración de polifenoles aumenta, debido a la influencia de enzimas metabolizadas por la planta parásita, durante el proceso de penetración, por lo que, cuando el contenido de proteína sube a los 15 y 30 DDI también la concentración de polifenoles se incrementa como acción de defensa de la planta hospedera; según Domínguez (1 979), los metabolitos secundarios o productos naturales juegan un rol muy importante en la estrategia de defensa de las plantas entre ellas las saponinas que son tóxicas, y se cree que su toxicidad proviene de su habilidad para formar complejos con esteroides.

En los ensayos realizados también se observan una elevada presencia de polifenoles a los 60 DDI pero no igual a los 15 DDI, dando como resultado que a los 15 DDI la planta parásita empieza a penetrar sobre el tejido del hospedero, para tener conexión con el xilema y es donde se produce la mayor cantidad de síntesis de polifenoles en respuesta a esta infección.

V. CONCLUSIONES

- Se realizó los análisis de proteínas a ramas de camu camu sanas y ramas parasitadas de 15, 30, 45 y 60 días después de la infección encontrando que la concentración de proteína se incrementa a los 15 y 30 días de parasitismo, porque en esta etapa, la planta parásita segrega enzimas que le favorecen su penetración a tejido del hospedero; y en los 45 días el contenido de proteína disminuye, para luego incrementarse a los 60 días de parasitismo para completar su etapa de colonización que dura hasta los 90 días.
- De acuerdo al tamizaje fitoquímico, existe una alta concentración de compuestos fenólicos, taninos, saponinas y moderada en alcaloides, cuando avanza el tiempo de parasitismo, estos generados por la planta hospedera como mecanismo de defensa, en respuesta a la infección, tratando de minimizar el ataque.
- El análisis de polifenoles totales de las muestras de ramas de camu camu sanas y ramas parasitadas (15, 30, 45, 60 DDI); se procedió a realizarlos por triplicado, y con los datos promedios se aplicó la regresión lineal, encontrando que la concentración de compuestos fenólicos aumente a los 15, 30 y 60 días de parasitismo, en comparación de una rama sana, esto debido a que la planta hospedera empieza a sintetizar polifenoles en su actividad metabólica como mecanismo de defensa ante la infección.
- Los estudios Fitoquímicos realizados con los diferentes ensayos, nos reflejan la reacción bioquímica que ocurre dentro de una rama de camu camu en respuesta a la infección de una planta superior parásita, y como estas sustancias se ven alteradas según el tiempo de parasitismo.

VI. RECOMENDACIONES

Mediante las conclusiones obtenidas se puede recomendar lo siguiente:

- Realizar estudios que pueda determinar, que tipo de enzimas, y cuanto de ella estaría favoreciendo a la penetración de la hifa infectiva de la planta parasita en tejido del hospedero.
- Realizar estudio de tamizaje fitoquímicos a la planta parásita, en sus diferentes estados de desarrollo, para conocer que sustancias tienen mayor concentración en ella y que tipo de enzimas y toxinas posee.
- Remover la planta parásita de la ramas de camu camu en los primeros días de su germinación, y penetración antes de llegar a su etapa de colonización para evitar mayores daños (heridas) a la rama del camu camu por lo que los daños o heridas producidas son irreversible.
- Realizar estudios de métodos de control fitoquímico de plantas superiores parásitas, preferentemente antes que estas empiecen a emitir sus hifas infectivas ya que de allí empieza la reacción bioquímica de la planta hospedera en respuesta a la ruptura de sus componentes estructurales.

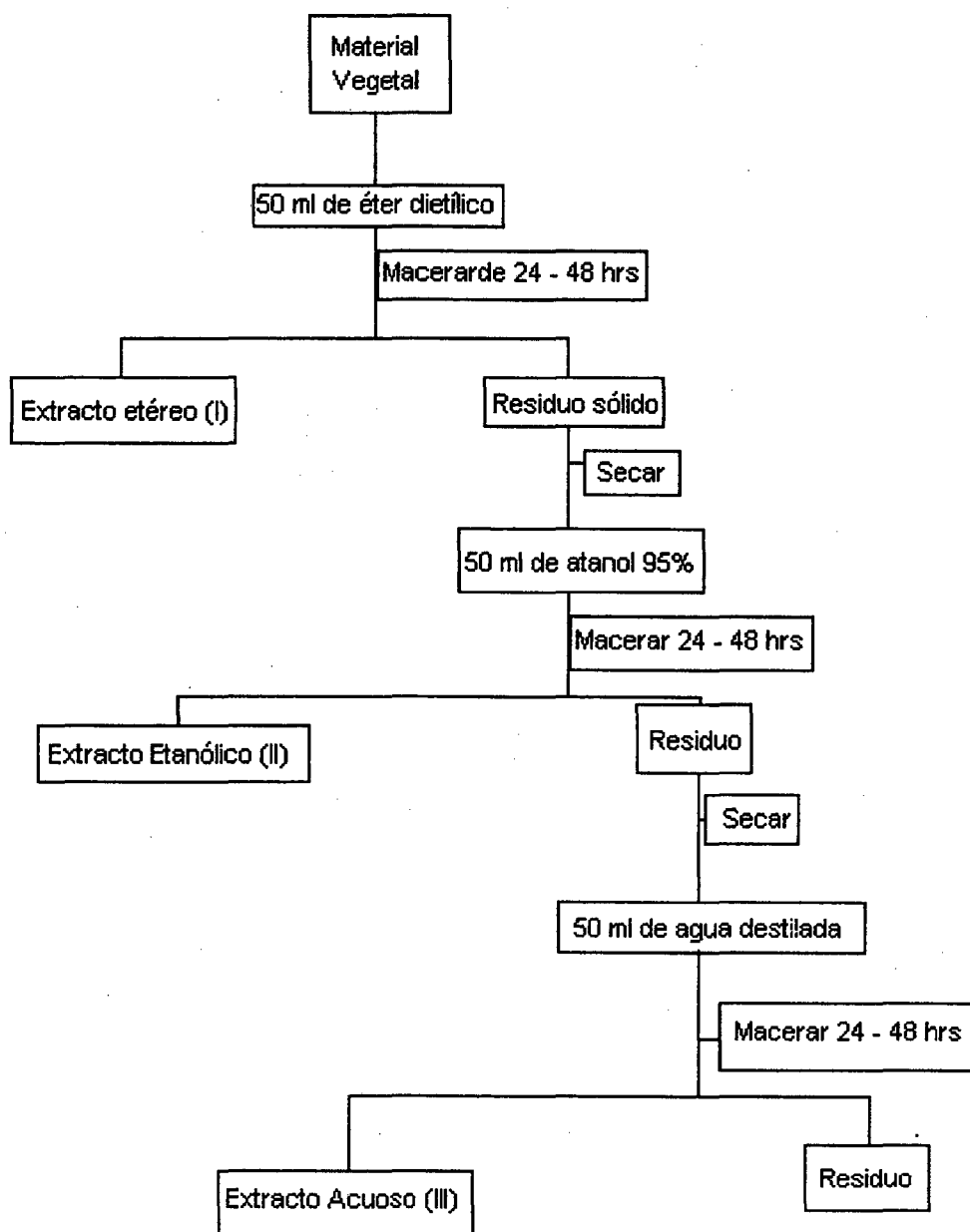
VII. BIBLIOGRAFIA.

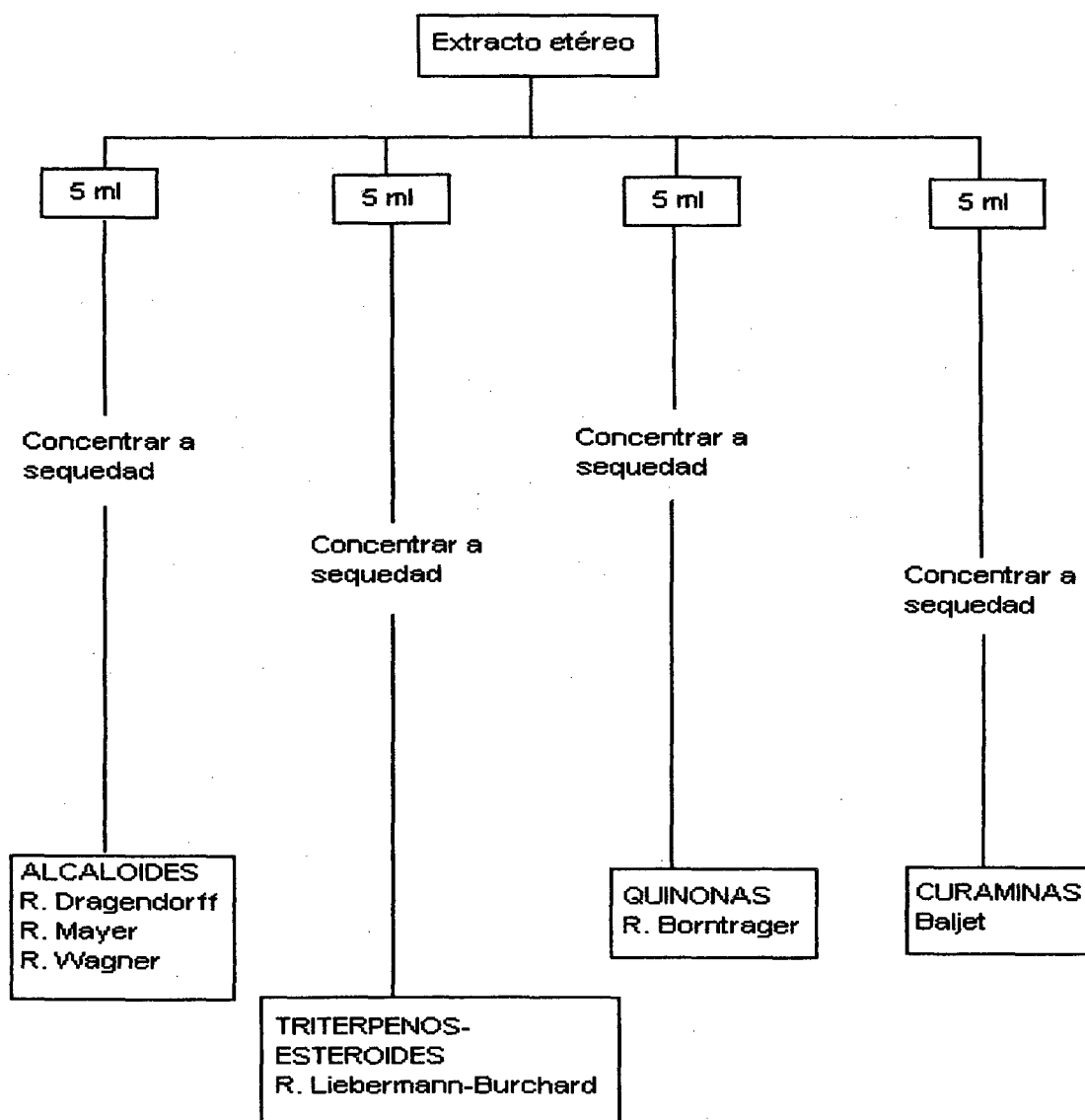
- AGRIOS G.1 996 Fitopatología: Editorial Limusa S.A. Segunda Edición México. D.F.
- CALZADA, B.J. 1980. 143 frutales nativos. Librería el estudiante. Lima. Pp75 -80
- COCHRANE, T.P.1982, Caracterización Agro ecológica para el desarrollo de Pastura de Suelos ácidos de América. Cali Colombia.
- CHAVEZ, F.W.B. 1993. Camu-camu. In: (Clay, J.W,& Clement, C.eds) Selected species and strategies to enhance income generathion from amazonia forests. FO: Mis/93/6.FAO, Working Paper. Rome.
- DIXON RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plan Cell*. 1995, 7: 1085 – 1097
- DOMINGUES A. 1979. Métodos de investigación fitoquímica, Ed. Limusa, 1ªed. México.
- FUENTEALBA A, J.E. 1971. Estudio sobre el transporte de compuestos fotosintetizados en la asociación parasítica de algunas Lorantháceas. Turrialba, Costa Rica. Tesis MSci, IICA-CATIE,
- GARCIA-MATEO & R. PEREZ LEAL, 2005 Fitoalexinas "Mecanismos de defensa de las plantas" revista chapingo serie, vol,9, Universidad Autónoma de chapingo, Mexico, pp,5-10
- http://www.virtual.unal.edu.com/cursos/ciencias/200002424/lecciones/cap_01/01_01_12ht Universidad Nacional de Colombia. 18-09-2009.
- LOCK. O. (1988). "Investigación Fitoquímica "métodos en el estudio de productos naturales. Lima: Fondo editorial. Pontificia Universidad Católica del Perú. 1988.
- NOE R. 2004-2007 Identificación y Estudio de la Biología de la planta parasita en los cultivos de camu camu y naranjo, Pucallpa, Perú
- PETERS, C.M & VASQUEZ, A. 1985. Estudios ecológicos de camu-camu (*Myrciaria dubia*). I. Producción de frutos en poblaciones naturales. In:(Peters,C,M.) Estudios Ecológicos de los frutales nativos de la amazonía Peruana Convenio IIAP-IEP/NYBG. Informe Final, Iquitos.

- RASTREPO H.C. 1987. Aspecto ecológico de la diseminación de cinco especies de muerdagos por aves.
- REVISTA CHAPINGO, serie Ciencia forestales y del ambiente Universidad Autónoma de Chapingo 11 (1): 5-9-2005, México.
- R. CORDER, JA DOUTHWAITE, DM Lees. 2001. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature*. 414: 863-864.
- SALVADOR, F.P. 1997. Manual para el extensionista. Cultivos de frutales Nativos Amazónicos, IIAP.Tca. Lima- Perú.
- SARGENT, S. 1995. Seed fate in a tropical mistletoe: the importance of host twig size. *Functional Ecology* 9:197-204.
- SHARAPIN, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Santa Fe. Colombia: 2000.
- TAIZ, L., ZEIGER, E, 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings. Redwood City, California, U.S.A.
- VÁSQUEZ MATUTE A. (2000) «El Camu camu, Cultivo, Manejo e Investigaciones». Universidad Nacional de la Amazonía Peruana- Facultad de Agronomía- Iquitos-Perú.
- VASQUEZ, M.R. 1989. Plantas útiles de la amazonía Peruana I. Mimeografiado.
- VENTOSA I. & R. OVIEDO. 2002. Plantas parásitas en los humedales urbanos. Moscosoa. Pp,250-260
- VILLACHICA, H. 1996. FRUTALES Y HORTALIZAS PROMISORIAS DE LA Amazonía. SPT_TCA N°44. Lima, Perú.
- WEIER, e., ETAL. 1994. Bogota. 5ta. Edición. Editorial Limusa S.A. Noriega Editores. México D.F. Pp 325-327
- WETMORE, A. 1984 the development of the stomach in the Euphonias. *Auk*.

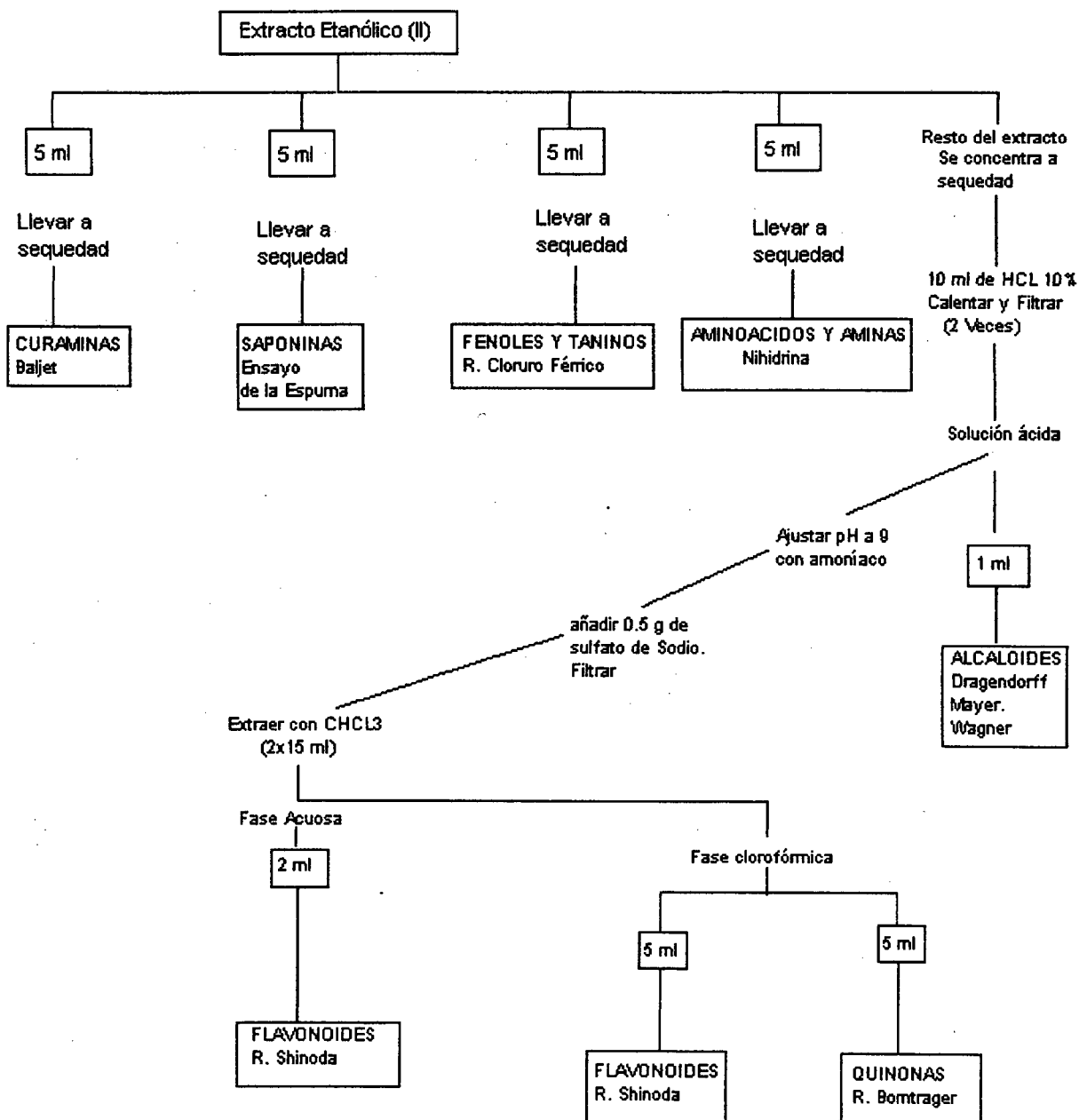
ANEXOS

Esquema 01. Obtención e identificación de los metabolitos secundarios de los extractos



Esquema 02. Obtención de metabolitos secundarios a partir de extracto etéreo

Esquema 03. Obtención de metabolitos secundarios a partir de extracto etanólico.



Esquema 04. Obtención de metabolitos secundarios a partir de extracto acuoso.

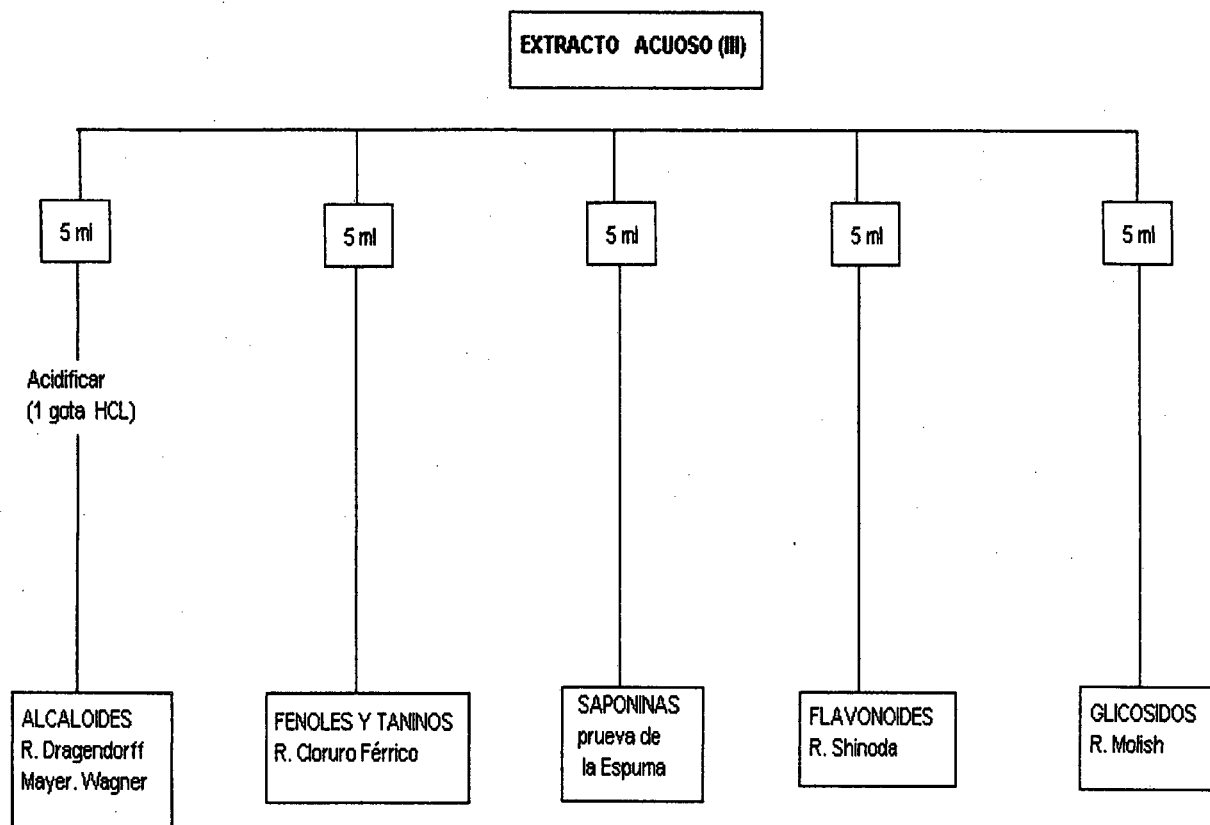


Foto 01. Parcela experimental donde se desarrollo la primera etapa del trabajo de tesis, U.N.U. Pucallpa 2009.



Foto 02. Pesado de muestras IIAP- Iquitos 2009.

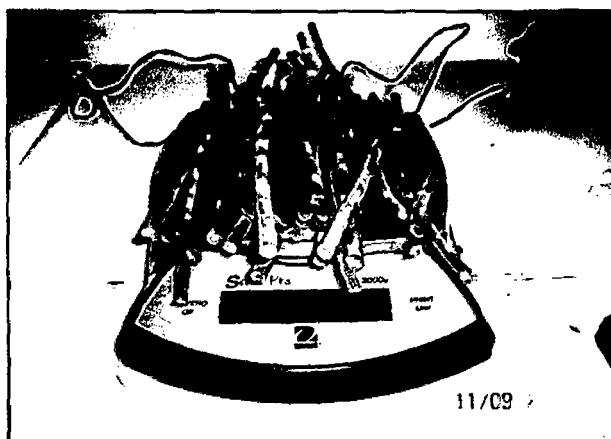


Foto 03. Corte de ramas de camu camu IIAP- Iquitos 2009.



Foto 04. Molido de ramas de camu camu IIAP- Iquitos 2009.



Foto 05. Colocación de muestras al aparato soxhlet para su desengrasado para análisis de proteínas IIAP – Iquitos 2009.

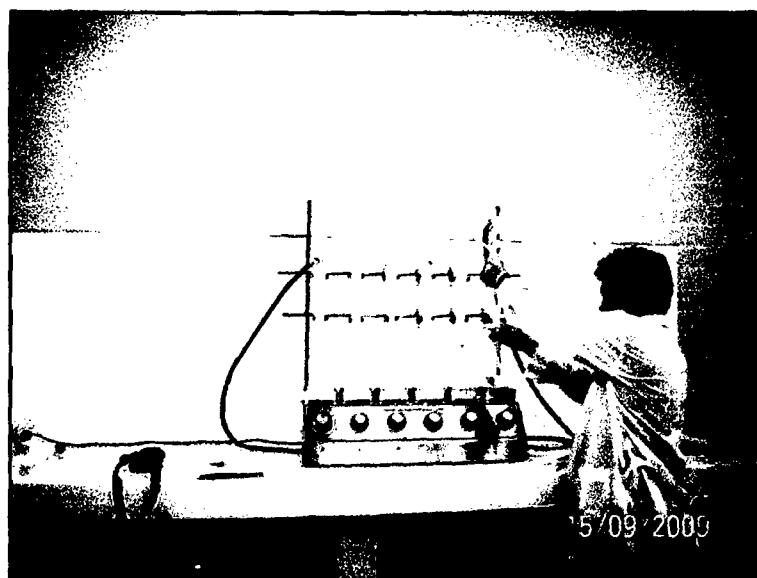


Foto 06. Extracción de muestras desengrasada IIAP- Iquitos 2009



Foto 07. Digestión de muestras para análisis de proteína IIAP- Iquitos 2009.

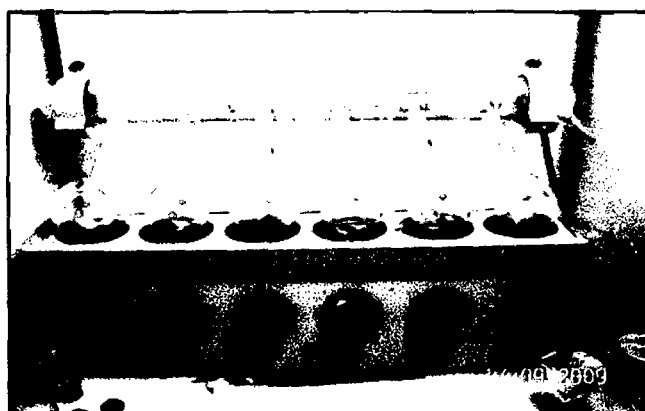


Foto 08. Ensayo de la espuma en extracto etanólico IIAP- Iquitos 2009.

