

Guatemala, 03 de Julio de 2015

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán
Director General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Estimado M.Sc. Arroyo

Por este medio le informo sobre el proyecto de investigación, con número de partida 4.8.24.2.41 denominado "Evaluación y caracterización extractos botánicos supercríticos de orégano (*Lippia graveolens*) para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*) en las zonas productoras del municipio de la Unión, departamento de Zacapa" y realizado por el equipo de investigación conformado por el Lic. Abner Mardoqueo Rodas Arzét Coordinador del proyecto, Ing. Agr. Ramiro José García Alvarez investigador asociado, Ing. Agr. Geovanny Salomón Miranda Villela Investigador Asociado y Br. Jessica Sylvana Nufio Barillas Auxiliar de Investigación, llevado a cabo durante los meses de febrero a diciembre del año 2014.

El presente documento fue revisado por esta autoridad en donde se determinó que cumple con los objetivos planteados en el proyecto. Así mismo con las instrucciones de elaboración del informe final y artículo científico establecidos por DIGI. Por tanto se ordena el pago correspondiente para los investigadores. Atentamente

Msc. Nery Waldemar Galdámez Cabrera
Director CUNORI

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación
En Recursos Naturales y Ambiente –PUIRNA-

INFORME FINAL

“Evaluación y caracterización extractos botánicos supercríticos de orégano (*Lippia graveolens*) para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*) en las zonas productoras del municipio de la Unión, departamento de Zacapa”

Equipo de investigación

Lic. Abner Mardoqueo Rodas Arzét
Ing. Agr. Ramiro José García Alvares
Ing. Agr. Geovanny Salomón Miranda
Br. Jessica Sylvana Nufio Barillas

Coordinador
Investigador
Investigador
Auxiliar de Investigación I

GUATEMALA 10 DE ENERO DE 2015

Partida Presupuestaria
4.8.24.2.41
Año de ejecución: 2014

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN AVALADORA
FACULTAD AVALADORA

Instituciones participantes

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Nombre Coordinador de Programa de Investigación
Coordinador Programa Universitario de Investigación...

Lic. Abner Mardoqueo Rodas Arzét
Coordinador del proyecto.

Ing. Agr. Ramiro José García Alvares
Investigador

Ing. Agr. Geovanny Salomón Miranda
Investigador

Br. Jessica Sylvana Nufio Barillas
Auxiliar de Investigación I

INDICE GENERAL

Contenido	Pág.
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
TÍTULO DEL PROYECTO	5
RESUMEN	5
PALABRAS CLAVES	6
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	6
1.1 Descripción del problema	7
1.2 Definición del problema	7
1.3 Delimitación temporal y geográfica	7
2. JUSTIFICACIÓN	8
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	10
3.1 El orégano (<i>Lippia graveolens</i>).....	10
3.2 Estudios de Aceites Esenciales	11
3.3 Tamizaje fitoquímico y actividad citotóxica	11
3.4 Extracción con Fluidos Súper Críticos- FSC-.....	11
3.5 Roya del café	12
3.6 Estado del arte.....	13
4. OBJETIVOS	15
4.1. General.....	15
4.2. Específicos	15
5. HIPÓTESIS	15
6. MATERIALES Y MÉTODOS	16
6.1 Descripción de la ubicación geográfica.....	16
6.2 Período de la investigación	17

6.3 Descripción del método, técnicas	18
6.4 Variables respuestas a nivel de campo	22
6.5 Análisis de la información	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1 Matriz de resultados.....	24
7.2 Resultados del análisis de tamizaje fitoquímico de extracto de orégano (<i>Lippia graveolens</i>).....	25
7.3 Resultados del índice de infección y control de roya (<i>Hemileia vastatrix</i>), utilizando el extracto botánico supercrítico de orégano (<i>Lippia graveolens</i>).....	27
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	32
9. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN.....	33
10. CONCLUSIONES.....	39
11. RECOMENDACIONES	40
12. BIBLIOGRAFÍA.....	41
13. ANEXOS	44
14. ORDEN DE PAGO	73

TÍTULO DEL PROYECTO

Evaluación y caracterización extractos botánicos supercríticos de orégano (*Lippia graveolens*) para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*) en las zonas productoras del municipio de la Unión, departamento de Zacapa.

RESUMEN

El cultivo de café que se desarrolla en el municipio de la Unión en el departamento de Zacapa, se ha visto afectado por el ataque de la Roya (*Hemileia vastatrix*), lo cual ha generado diferentes impactos ambientales, así como económicos; ya que los productores deben de controlar dicho hongo por medio de productos fungicidas comerciales. En base a esta necesidad se planteó la presente investigación, para poder brindar una alternativa menos contaminante, para el problema de la roya (*Hemileia vastatrix*), en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*).

Para el desarrollo del proyecto se plantearon tres etapas, siendo la primera, la caracterización del extracto botánicos supercríticos de orégano (*Lippia graveolens*); la segunda etapa planteada fue determinar la dosis efectiva que controle el hongo de la roya (*Hemileia vastatrix*), a nivel in-vitro; la cual no fue posible alcanzar por medio de la metodología puesta. La tercera etapa realizada consistió en la evaluación de 12 tratamientos a nivel de campo más un testigo, en dos localidades, con cuatro repeticiones cada uno, en un diseño completamente al azar.

Las conclusiones a las que se llegaron después de analizar los datos obtenidos en la etapa de laboratorio para el extracto botánico de orégano fue “La composición fitoquímica del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), presenta variaciones metabólicas en relación al extracto etanólico de orégano (*Lippia graveolens*)”; en cuanto a los tratamientos evaluados se concluyó: El extracto de orégano presenta propiedad fungicida de contacto y no presenta diferencia significativa en cuanto al control de la roya en 12 tratamientos más el testigo, así como la altura a la que se encuentra el café; y a medida que se re incrementa el número de aplicaciones

aumenta el control de la roya (*Hemileia vastatrix*). Recomendado la evaluación de concentraciones menores de timol, evaluar el extracto de orégano como preventivo, potenciador con otros fungicidas y formularlo con adherentes foliares.

PALABRAS CLAVES

Roya, Orégano, Extracto supercrítico, Fungicida.

ABSTRACT

Coffee plantations are usually affected by rust (*Hemileia vastatrix*). A disease that affects coffee farms in the municipality of 'La Union', in Zacapa. The main way to control the outbreaks is by applying fungicides to coffee plants, which may become threats to the environment and affect the economy of the farmers. We see the need to look for alternatives to the use commercial fungicides in the production of coffee (*Coffea arabica* L.)

We evaluate the use of oregano as botanical extract to control rust in coffee plantations. On a first stage a 'supercritical' botanical extract of oregano (*Lippia graveolens*) was characterized. A second stage focused on determining a right dosage to control rust on coffee, in an in-vitro scale. The last stage evaluated 12 treatments on the field and one tester, in two locations. This experiment followed a completely randomized design and four repetitions.

We found that phyto-chemical composition of supercritical botanical extract of oregano showed metabolic variations, when compared with an ethanolic extract. In the field experiments, oregano extract worked as a contact fungicide; its effect did not showed a significant difference among the 12 treatments or with the tester. Locations did not exhibit a significant difference either. Though, we observed that a higher number of applications reduced the level of infection by rust on coffee pants.

Future research directions include: evaluation of lower concentrations of thymol, the use of organo extract as an alternative to prevent rust infestations, and the use of oregano

extract as enhancer when used in combination with other fungicides and foliage adherents.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción del problema

El problema identificado a resolver con el desarrollo de la presente investigación, es el desconocimiento del potencial fungicida de los extractos de orégano (*Lippia Graveolens*) obtenidos por medio de tecnología de fluidos supercríticos y evaluar su eficiencia en el control de la Roya (*Hemileia Vastatriz*) en el cultivo del café (*Coffea arabica* L.). Lo cual ha generado grandes pérdidas económicas en el cultivo de café, ya que la planta de café al estar infectada disminuye considerablemente la producción de la cereza de café; además de los gastos en agroquímicos que incurren los productores para el control del mismo.

1.2 Definición del problema

La pregunta generada para la presente investigación es: Si, los extractos obtenidos por medio de fluidos supercríticos, son eficientes en el control de la Roya en el cultivo de café.

1.3 Delimitación temporal y geográfica

Elaboración de extracto botánico supercrítico y caracterización fitoquímica se realizara en el laboratorio Ambiental del Centro Universitario de Oriente; en el periodo de Enero-Abril. El sector productivo que se ha identificado para la implementación del extracto supercrítico de orégano, es el municipio de la Unión en el Departamento de Zacapa. Para el desarrollo de la implementación, se ha contemplado en el periodo de Agosto- Octubre.

2. JUSTIFICACIÓN

- **¿El tema planteado genera nuevo conocimiento?** Sí; Se generara conocimiento con el desarrollo de la presente investigación, ya que hasta la fecha no se han realizado tamizajes fitoquímico de extractos de orégano (*Lippia graveolens*) obtenidos por medio de tecnología de fluidos supercríticos. Además, los extractos

de orégano obtenidos por medio de fluidos supercrítico, no han sido evaluados su potencial fungicida.

- **¿Los conocimientos que se generar tienen aplicación práctica?** Sí; la presente investigación contempla la implementación de los extractos obtenidos por medio de tecnología de fluidos supercríticos, en el cultivo de café en el municipio de la Unión en el departamento de Zacapa.
- **¿La investigación plantea una nueva forma de aplicación de los conocimientos generados o adquiridos de investigaciones anteriores?** Sí; la presente investigación contempla el desarrollo de un producto de alta concentración obtenido por medio de tecnología amigable con el medio ambiente, teniendo de base los principios de la química verde.
- **¿Se pueden materializar los resultados en un aporte metodológico, teórico, plano o propuesta de ley?** Sí; ya que dentro de los resultados esperados se menciona la caracterización fitoquímica del extracto supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), y la metodología para el control de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*), por medio de extractos de Orégano.
- **Diseño de nuevos sistemas de prestación de servicios:** Sí, ya que el extracto supercrítico de Orégano, es un producto con aplicación comercial en el sector cafetalero del país, además es un producto amigable con el medio ambiente.
- **Mejora considerable de algo ya existente:** Sí; con el desarrollo de la presente investigación se implementara el uso de tecnología de fluidos supercríticos en la metodología para la elaboración de extractos de vegetales en general, siendo el caso específico el Orégano; ya que las metodologías existentes para la elaboración de extractos vegetales son a base de solventes tóxicos que contaminan el medio ambiente y con efectos cancerígenos. Además de estos métodos están los que son por medio de arrastre con vapor de agua. Pero en términos generales, los métodos

convencionales existentes para la elaboración de extractos vegetales son: Contaminantes al medio ambiente, tóxicos para el ser humano, de alto costo y de bajas concentraciones siendo metodologías ineficientes.

En México, se han desarrollado más de 5 investigaciones en donde se han evaluado los extractos etanolicos de orégano (*Lippia Graveolens*), en donde han presentado resultados favorables, pero dicha metodología no es rentable para los mercados mencionados, ya que son poco eficientes por lo que es factible pero no es rentable para el sector interesado.

- **Diseño o desarrollo de sistemas sociales:** No; la presente investigación no contempla el desarrollo de sistemas sociales, pero si contempla la vinculación con los pequeños productores de café en el municipio de la Unión en Zacapa.
- **Fabricación de nuevos materiales, productos, dispositivos, procesos, sistemas de producción, puede aplicar en uno o varios puntos:** Sí, con el desarrollo de la investigación se obtendrá un producto de aplicación agrícola y no solo para el cultivo del café sino en otros cultivos; ya que es un productos de origen vegetal, no presenta los inconvenientes que si presentan los productos agroquímicos; Este producto es amigable con el medio ambiente y al alcance de los pequeños productores en general
- **¿Los conocimientos se pueden comercializar o es de interés económico:** Sí; los productos obtenidos con la presente investigación presentan un alto valor comercial, ya que incluye los mercados productivos de Café y Orégano. Pudiéndose expandir para otros sectores agrícolas y pecuarios.
- **¿Se pueden patentar los resultados? (si aplica):** la metodología desarrollada y el producto desarrollado tienen potencial para ser patentados, en base a sus características: innovadoras, eficientes y ecológicas.

3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 El orégano (*Lippia graveolens*)

- **Descripción botánica**

El nombre “orégano” proviene del griego: oros (montaña) y ganos (ornamento) (Infoagro, sf). Más de 40 plantas, en cuatro familias botánicas se conocen con ese nombre (Vásquez sf). El *Lippia graveolens*, es un arbusto delgado hasta de 2 metros de alto, es nativa del sur de Texas abarcando hasta Nicaragua, se encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes y planicies hasta 350 msnm. En Guatemala, se ha descrito en El Progreso, Zacapa y Petén (Cáceres, 1996).

- **Agricultura**

El orégano (*Lippia graveolens*), en sus lugares de crecimiento silvestre, se propaga por semilla o estacas de madera suave. Las hojas se colectan en plena floración y se secan a la sombra (Cáceres 1996). En Guatemala, se encuentra en la zona semiárida del oriente del país, se distribuye en las riberas norte y sur del río Motagua, específicamente en algunos lugares de los departamentos de El Progreso y Zacapa. Así también se ha encontrado en el departamento de Chiquimula (Martínez y Cordón, 2002).

- **Estudio agronómico en zonas semiáridas de Guatemala**

Se estima que por cada kilo de hojas frescas, se obtienen aproximadamente 200 g de hojas secas y una planta puede producir de 300 a 500 g de hojas frescas al año. Su precio de venta oscila entre Q 2.50 y Q 4.00 por libra de hojas secas (Martínez y Cordón 2002).

- **Principales componentes**

Estudios *in vitro*, han demostrado que de los 34 ingredientes activos del aceite de orégano, la mayoría son fenoles y contiene también ácidos fenólicos, cafeico, clorogénico, rosmarínico, flavonoides, sustancias tánicas y elementos minerales (Infoagro sf). Además, Cáceres (1999), dice que el tamizaje fitoquímico de hojas de

Lippia graveolens contiene un 1.8 % de aceite esencial. Los componentes activos: Aceites esenciales (timol y carvacrol), ácidos polifenólicos (ácido rosmarínico), taninos y flavonoides (Cabrera, 2004) (Anexo 1).

3.2 Estudios de Aceites Esenciales

La cromatografía en fase gaseosa acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) para la separación y la identificación de la composición química de aceites esenciales, ha tenido un avance considerable, al punto de ser utilizada como rutina en varios laboratorios (Sharapin, N.).

3.3 Tamizaje fitoquímico y actividad citotóxica

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 o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. Los métodos tradicionales de extracción requieren altos tiempos de residencia y grandes cantidades de solvente. De un tiempo a esta parte se han desarrollado varias técnicas nuevas para la extracción de solutos de matrices sólidas, entre ellas se tiene: la extracción asistida con ultrasonido (Vinatoru 2001), la extracción asistida con microondas (Kaufmann et al., 2002), la extracción con solvente acelerado (Kaufmann et al., 2002) y la extracción con fluidos supercríticos (Brunner 2005; Rozzi y Singh 2002), con el objeto de acortar el tiempo de extracción, disminuir el consumo de solvente, aumentar el rendimiento de extracción y mejorar la calidad del extracto.

3.4 Extracción con Fluidos Súper Críticos- FSC-

Un fluido supercrítico es cualquier sustancia a una temperatura y presión por encima de su punto crítico termodinámico. Tiene la propiedad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de disolver los materiales como un líquido. Adicionalmente, puede cambiar rápidamente la densidad con pequeños cambios en la temperatura o presión. Estas propiedades lo hacen conveniente como un sustituto de los solventes orgánicos en los procesos de extracción. Los fluidos supercríticos (FSC) tienen la capacidad de extraer ciertos compuestos químicos con el uso de determinados solventes específicos bajo la combinación de temperatura y presión (Brunner et al.,

2005). Las propiedades críticas de algunos compuestos comúnmente usados como fluidos supercríticos (Brunner et al., 2005).

- **Comparación Soxhlet y CO₂ SC**

El método Soxhlet es una técnica anticuada y consumidora de tiempo y de solvente. En la extracción de aceites de rosa silvestre (*Rosa canina L*), utilizando n-hexano con soxhlet se consumieron 180 minutos para extraer 48.5 g/kg, mientras que con CO₂SC a 35°C y 250 bar, se consumieron 35 minutos para extraer 57.2 g/kg, cuando se le agrego propano (cosolvente) al CO₂SC a 28°C y 100 bar se consumieron 35 minutos para obtener 66.8 g/kg (Szentmihalyi et al., 2002).

La extracción con FSC, específicamente con CO₂, resulta una alternativa interesante para la extracción y fraccionamiento de aceites vegetales, porque no posee los inconvenientes de los disolventes orgánicos tradicionales, sobre algunas ventajas que ofrece el uso del CO₂ supercrítico al ser no tóxico, ni dejar residuo en sus productos, así como su capacidad selectiva para extraer ciertas sustancias al realizar pequeños cambios de presión y temperatura.

Sin embargo la ventaja principal de utilizar CO₂ supercrítico está en la calidad del aceite obtenido por este medio en comparación con los aceites extraídos con solventes orgánicos tradicionales (Mangold, 1983). Otras ventajas comparativas son: (1) aceites prácticamente libres de fosfolípidos y glicolípidos. Los aceites convencionales contienen de 1 a 3% de lípidos polares. (2) Menor contenido de hierro. (3) Aceites claros y desodorizados. (4) Menores pérdidas por refinación y menor consumo de soda cáustica (Hurtado, 2002). La desventaja está en la menor estabilidad oxidativa del aceite obtenido con CO₂ debido a la ausencia de fosfátidos que en algunos casos protegen al aceite de la auto-oxidación (List et al., 1985).

3.5 Roya del café

- **Descripción botánica**

La Roya, es un hongo fitoparásito obligado del cafeto. Pertenece a la subdivisión de los Basidiomicetos, del orden Uredinales, familia Pucciniaceae. Existen 32 razas de Roya (*Hemileia vastatrix*) que atacan a especies del genero Coffea especialmente, a las

plantas de la especie Arábica y también a otras del mismo género, pero con diferentes grados de virulencia.

Las condiciones ideales para su reproducción se facilitan en ambientes sombríos y niveles de humedad relativa más bien bajos, aunque la presencia de gotas de agua sobre las hojas es imprescindible para que las esporas germinen. Los límites de temperatura óptimos para su desarrollo se enmarcan entre los 21 y 25° C. Dentro de estos parámetros, la germinación de las esporas tiene lugar entre las 3 y 4 horas posteriores de su liberación. Por debajo de 16° C y por encima de los 27° C las esporas no germinan.

- **Ataque e infección**

El ataque de la Roya al café se inicia con la liberación de sus uredosporas -esporas-, la estructura reproductiva más importante de este hongo, que puede persistir año tras año en este estado. Entre 3 y 12 horas después, estas germinan. Para ello se sirven de una especie de tubo de germinación que va avanzando sobre la gota de agua hasta encontrar una estoma abierta en el envés de la hoja. Entre 10 y 15 días después del inicio del ataque, ya se puede apreciar en las hojas manchas amarillentas que se van tornando de color café, a medida que se va necrosando el tejido. La aparición de nuevas uredosporas puede tener lugar a los 15 días, más o menos.

En el envés de estas manchas, aparece un polvo anaranjado, al tacto parecido a óxido, constituido por varios cientos de miles de uredosporas, que se van distribuyendo por las hojas del mismo café, de los cafetos vecinos y de los cafetales cercanos. Al quedar entre un 10 y un 30% de su tejido necrosado, dejan de ser funcionales y, como además, el hongo produce etileno, las hojas envejecen y caen prematuramente. Si el ataque es severo, la planta reduce su crecimiento, los frutos no se desarrollan y se generan grandes pérdidas económicas (Burgos, 2003).

3.6 Estado del arte

En la investigación “Efecto anti-fúngico de aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia berlandieri* shauer) sobre hongos contaminantes en productos de panadería”, realizado en Facultad de C. Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, México 2008. Se

concluyó que los extractos etanolicos de orégano (*Lippia berlandieri Shauer*), en concentraciones de 100-200ppm; si hay efecto inhibitorio en el crecimiento fúngico (Portillo et al., 2008).

En la investigación “Evaluación de la actividad anti fúngica del extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis Cinerea*, *Fusarium Oxisporum*, *Sclerotinia Sclerotiorum*. Realizado en Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia 2007. Se realizaron pruebas in vitro de extracto etanolicos de tomillo (*Thymus vulgaris*), en concentraciones de 150,250 y 500 g/lit; obtuvieron el tratamiento de 500gr/lit presento mayor resultado inhibitorio para el crecimiento radial para *Botrytis Cinerea*, *Fusarium Oxisporum*, *Sclerotinia Sclerotiorum*. En la prueba de invernadero, se evaluó la actividad del Tomillo (*Thymus vulgaris*) en forma curativa y preventiva, de lo cual se concluyó que el extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*), disminuye el crecimiento de tres hongos; y al adicionarlo sobre la planta inoculada, la expresión de los síntomas de las enfermedades se reduce (Lizcano G. & Maria C., 2007).

En la investigación “Actividad anti fúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* Aislado de papaya (*Carica papaya*)”, realizada en el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Tlaxcala, México 2008. Se evaluaron los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum* y *Telexys ambrosioides*, exhibieron una inhibición del crecimiento micelial directamente proporcional a la dosis al incrementar de 100 a 300 µg/ml. Mientras que los aceites de *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia*, *Ruta chalepensis*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globulus* no tuvieron actividad anti fúngica en las diferentes concentraciones probadas. Todos los compuestos con excepción del cineol tuvieron un efecto fungicida o fungistático (Barrera et al., 2008).

En la investigación “Actividad antimicrobiana de extractos de orégano (*Lippia graveolens*) contra microorganismos fitopatógenos”, desarrollada en Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería, México 2008. Se evaluó e nivel in vitro el aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) al 50% y determino la dosis efectiva para la inhibición de *Aspergillus niger* y *Cladosporium cladosporoide*. De lo cual se

concluyó que el aceite esencial de orégano puede ser utilizado como agente fungicida en dosis al 75% (Ku U. José 2008).

En la Investigación realizada por Jose Valero Galvan, se evaluaron aceites esenciales en concentraciones de 150 a 500ppm timol de lo cual concluyo, que el tratamiento con 64% de timol; es el que presenta mayor inhibición del hongo *Phymatotricosis* (Valero et al., 2008).

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar y caracterizar extractos botánicos supercríticos de orégano (*Lippia graveolens*) para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en la zonas productora del municipio de la Unión, departamento de Zacapa.

4.2. Específicos

- Caracterización fitoquímica del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*) para la identificación de metabolitos secundarios.
- Determinar la dosis efectiva del extracto de orégano que actúa como fungicida para el control eficiente de la Roya (*Hemileia vastatrix*) del cultivo de café (*Coffea arabica* L.) in vitro.
- Evaluar la eficiencia del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*) como fungicida para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) a nivel de campo.
- Divulgar los resultados de la investigación ante productores, asociaciones, cooperativas, centros de enseñanzas e instituciones vinculadas a la producción de café en la región nororiental.

5. HIPÓTESIS

El extracto botánico de orégano elaborado por medio de tecnología de fluidos supercríticos tiene potencial como fungicida, permitiendo el control eficiente de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Descripción de la ubicación geográfica

- **Ubicación del área de estudio**

El área de estudio, está representada por el municipio de La Unión, departamento de Zacapa, la cual posee una extensión territorial de 215.24 Km².

El área se encuentra localizada dentro del cuadrante definido por las coordenadas: 240000 y 270000 en "X"; y, 1640800 y 1652000 en "Y" (Sistema Coordinado GTM, Zona 15.5, Datum WGS84).

- **Descripción del área**

Debido a sus condiciones climatológicas similares del área de estudio, amerita una explicación y descripción preliminar a fin de dar a entender claramente la dimensión geográfica de la misma. El territorio para el estudio comprende toda la extensión territorial del municipio de La Unión del departamento de Zacapa. El Municipio se sitúa a una altitud de 880 msnm, con una extensión de 215.24 Km², equivalentes al 13% del territorio Departamental de Zacapa (Anexo 2).

Características del área en estudio

- **Zonas de vida**

El área de estudio comprende dos zonas de vida, según el mapa de Zonas de Vida elaborado por el MAGA; La zona de vida según Holdridge se enmarca que el Municipio le corresponde 99.93% de bh-S(t) bosque húmedo subtropical (templado) y un 0.07% de bs-S, bosque seco subtropical. Entre las especies vegetales indicadoras de esta zona de vida (Anexo 1).

- **Clima**

El municipio se caracteriza por tener precipitaciones anuales entre 1,500 a 1,050 milímetros (mm) y con temperaturas promedio que varían entre los 16 y 20 °C. El rango altitudinal del municipio va de los 800 hasta los 1100 msnm esto da como resultado que

las condiciones climáticas a nivel local no varíen mucho entre las partes bajas, media y alta del municipio que componen el área de estudio.

De acuerdo con los modelos climáticos generados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación de Guatemala; la precipitación en el área de estudio varía entre 1,500 y los 1,050 mm anuales, aunque estas estimaciones no consideran ciertas situaciones micro-climáticas que causan que los valores mencionados en este apartado parezcan demasiado conservadores.

- **Suelos**

El suelo es uno de los recursos más importantes para el ser humano. La tabla siguiente muestra la distribución de los suelos del Municipio de acuerdo a la clasificación agrológica utilizada por el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación –MAGA-2006.

- **Aspectos sociales**

El área de estudio comprende una zona urbana –el pueblo de La Unión– y varias zonas rurales. Está integrada por 48 centros poblados (según la información cartográfica generada por el INE en 2005), excluyendo a la el pueblo de la Unión. Con respecto el municipio de La Unión, cuenta con aproximadamente 30,860 habitantes, según el censo de 2002 con proyección 2013, a esto debe sumarse una gran cantidad de personas que visitan o que se establecen temporalmente en el pueblo.

La interacción humano-naturaleza puede crear un desbalance entre las partes, en primer lugar en forma negativa hacia a los recursos naturales involucrados, y por último hacia la propia sociedad humana.

6.2 Período de la investigación

La investigación se realizó en un período de 11 meses, los cuales se encuentran distribuidos en tres fases: la primera fase contemplo validación de la metodología para la elaboración del extracto de orégano por medio de tecnología de fluidos supercríticos, para la cual se contempló el período de enero-abril. Para el desarrollo de la segunda

fase se contempló el período de mayo-julio, las pruebas IN-vitro ya no se realizaron, debido a que no se pudo reproducir el hongo en el laboratorio. Para el desarrollo de la fase de campo, se implementó el extracto supercrítico de orégano en el cultivo de café; se desarrolló en el período comprendido de junio-noviembre.

6.3 Descripción del método, técnicas

➤ Metodología de extracción con fluidos supercríticos

1. Diseño, Ajuste y calibración del equipo de fluidos supercrítico
2. Colocar 40g de material vegetal molido en la celda de extracción
3. Adicionar 50 ml de cosolvente etanol grado analítico
4. Sellar herméticamente el sistema con teflón y llaves de tubo
5. Calentar la celda de acero inoxidable a 35 °C
6. Abrir la llave de paso del CO₂ del cilindro a presión estática
7. Dejar reposar durante 30 minutos a 1300 Psi y 35 °C
8. Despresurizar y abrir la llave de salida del CO₂, de la celda de extracción
9. Colectar el extracto etanólico en recipiente de color ámbar de 125 ml.

Materiales

Equipo de extracción supercrítico (Anexo 3), balanza semianalitica, Probeta de 500ml.

➤ Metodología para Cuantificación de Timol y Carvacrol en extractos supercríticos de *Lippia graveolens*

Preparación estándar interno

1. Antes de utilizar los estándares (anetol y acetato de linalilo), dejar reposar en el ambiente por 20 min.
2. Medir 0.500 g de anetol y disolver en 50 ml de cloroformo.
3. Medir 0.500 g de acetato de linalilo y disolver en 50 ml de cloroformo.
4. Añadir ambas disoluciones a balón aforado de 250 ml y aforar con cloroformo.
5. Esta solución se conoce de ahora en adelante como Disolvente A (DA) y tiene una concentración de 2000 ppm de ambos estándares internos.

Preparación estándares externos

1. Antes de utilizar los estándares (timol, carvacrol), dejar reposar por 20 min.
2. Medir 1.0101 g de timol (99%) y disolver en 10 ml de cloroformo.
3. Medir 1.0204 g de carvacrol (98%) y disolver en 10 ml de cloroformo.
4. Añadir ambas disoluciones a un balón aforado de 25 ml y aforar con cloroformo.
5. Esta solución se conoce de ahora en adelante como Solución Madre (SM).

Preparación curva de calibración

1. Preparar 5 balones aforados de 10 ml.
2. En un balón adicionar 125 uL de SM y 1875 uL de cloroformo, aforar con DA. (Estándar externo 500 ppm; estándar interno 1600 ppm)
3. En otro balón adicionar 250 uL de SM y 1750 uL de cloroformo, aforar con DA. (Estándar externo 1000 ppm; estándar interno 1600ppm)
4. En otro balón adicionar 500 uL de SM y 1500 uL de cloroformo, aforar con DA. (Estándar 2000 ppm; estándar interno 1600ppm).
5. En otro balón adicionar 1000 uL de SM y 1000 uL de cloroformo, aforar con DA. (Estándar 4000 ppm; estándar interno 1600ppm).
6. En otro balón adicionar 1500 uL de SM y 500 uL de cloroformo, aforar con DA. (Estándar 6000 ppm; estándar interno 1600ppm).

Inyecciones en GC-FID

1. Las condiciones del equipo son las siguientes: Split 1:10, inyector a 250 °C, detector a 300 °C, gas acarreador a 1.5 ml en flujo constante, horno a 90 °C (hold de 12 min), rampa 40 °C/min hasta 280 °C (no hold, t=16.75 min).
2. Se inyecta aproximadamente 2 uL de cada estándar por cuadruplicado.
3. Se analizan los datos para determinar por lo menos tres de las cuatro repeticiones que sean útiles para hacer la curva.

Preparación muestra

1. Aforar la muestra original a un volumen adecuado de 500 ml, utilizando etanol.

2. Tomar 5 ml de esta muestra y añadir 15 ml de cloroformo. Observar la formación de precipitado (compuestos polares que no son de interés).
3. Filtrar por gravedad en erlenmeyers de 50 ml.
4. Lavar dos veces con porciones muy pequeñas de cloroformo (2 ml).
5. Aforar a 25 ml y descartar el precipitado.
6. Añadir 2 ml de la muestra a un balón de 10 ml y aforar con DA.
7. Inyectar la muestra de la misma manera que los estándares de la curva de calibración.

➤ **Metodología para Tamizaje Fitoquímico del extracto supercrítico**

Para el desarrollo del tamizaje Fitoquímico, se utilizó la metodología del Manual de Laboratorio de Fitoquímica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala (Medinilla, 2009).

➤ **Metodología para análisis IN-Vitro para evaluación la acción fungicida del extracto**

Obtención de cepas de hongos puros, preparación del agar, se suspenden 38g del polvo en un litro de agua purificada, se mezcla perfectamente y se calienta agitando frecuentemente hasta la disolución. Se esteriliza a 121°C durante 15 min. Se adiciona el agar a las cajas de Petri y posteriormente se incuban a 37°C por 24 horas para prueba de esterilidad.

Preparación del inóculo

Con el micro-pipeta se inocula los discos colocando 2µl del extracto por sensidisco. Se elige un control positivo y un control negativo.

Difusión en agar

Una vez realizada la prueba de esterilidad se siembran el hongo por estrías utilizando un asa de siembra. Posteriormente se incuban las cajas a 37°C por 24 horas y se procede a leer los halos de inhibición. Se evaluara concentraciones de extracto botánico supercrítico de orégano, en 0ppm, 50ppm, 75ppm, 100ppm, 150ppm, 200ppm

y 300ppm de timol. La evaluación a nivel laboratorio de realizar en un diseño al azar con 7 tratamientos y cuatro repeticiones, donde se evaluara la inhibición del hongo a parte de las concentraciones de extracto botánico supercrítico de orégano.

➤ **Metodología para evaluar la eficiencia del extracto de orégano para el control de la roya del café a nivel de campo**

Selección del área experimental

La selección del área experimental se realizó considerando la incidencia de la roya del café en zonas productoras del municipio de la Unión, se seleccionó dos localidades productoras representativas en la finca “Cañón grande 2”, una en la parte alta (1100msnm) y la otra en la parte media (900msnm), en las cuales se llevo a cabo la evaluación de campo del extracto supercrítico de orégano para el control de la roya en el cultivo de café.

Descripción de los tratamientos

Para llevar cabo la evaluación a nivel de campo se tomó como referencia la dosis efectiva recomendada por Valero (2008), la cual es 320ppm de timol; para el extracto supercrítico de orégano a evaluar a nivel de campo bajo el siguiente criterio: desde 600ppm hasta 50ppm de timol, con un distanciamiento de 50 unidades y el testigo relativo. Lo cual constituye los 12 tratamientos evaluados a nivel de campo.

Evaluación de los tratamientos

Para la evaluación de los cuatro tratamientos (dosis) a nivel de campo, se establecieron parcelas de 441 m² conteniendo 220 plantas de café por parcela en las dos localidades.

Inicialmente se determinó el índice de infección de la enfermedad, previo a realizar las aplicaciones del extracto supercrítico de orégano en las dosis correspondientes, para tener datos de base que permita determinar la eficiencia del extracto. Posteriormente se realizaron tres aplicaciones en intervalos de 30 días entre aplicación (90 días en

total) y previo a cada aplicación se realizó el muestreo para determinar el porcentaje del índice de infección de la enfermedad.

Diseño experimental

Se utilizó el diseño experimental de bloques completamente al azar, con arreglo bifactorial, con 13 tratamientos y 4 repeticiones en cada localidad. El modelo estadístico que se utilizó es el siguiente:

$$Y_{ij} = U + T_i + B_j + E_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta de la $ijkl$ -ésima unidad.

U = Efecto de la medio general

B_j = Efecto de los bloques

T_i = Efecto de los tratamientos

P_k = Efecto de los dosis de extracto supercrítico de orégano.

L_l = Efecto de las localidades

PL_{kl} = Efecto de la interacción entre podas y localidades

E_{ijkl} = Error experimental asociado a la $ijkl$ -ésima unidad experimental.

i = 1, 2, 3, 4, 5, tratamientos

j = 1, 2, 3, 4 repeticiones

Unidad experimental

Se establecieron dos replicas una por localidad (2 fincas productoras de café) una en parte alta y otra en la parte media de la zonas de producción del municipio de la Unión, del departamento de Zacapa. Cada unidad experimental se conformó por parcela de 441 m² con 220 plantas a un distanciamiento de 2 metros entre surcos y 1 metro entre planta.

6.4 Variables respuestas a nivel de campo

La variable estudiada a nivel de campo es el Porcentaje de Índice de Infección de la enfermedad.

- **Porcentaje de índice de infección de la enfermedad (% IF)**

Para determinar el índice de infección, se muestrearon 14 plantas de café al azar, colectando 10 hojas por planta de forma también al azar de la parte baja, media y alta de la planta y de los cuatro puntos cardinales. Posteriormente se separaron las hojas infectadas y las hojas sanas.

El porcentaje de infección de la enfermedad se determinó, dividiendo el número de hojas infectadas entre el total de hojas de la muestra (140), multiplicado por cien; de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ IF} \quad \% \text{ IR} = \frac{\text{Hojas infectadas por sitio}}{\text{Total hojas de la muestra}} \times 100$$

Con el propósito de facilitar la labor de muestreo, se utilizaron bolsas de plástico para coleccionar las hojas de las plantas en cada parcela y se anotó la información en una boleta de muestreo correspondiente.

6.5 Análisis de la información

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para cada localidad, y así determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos, realizando una comparación de medias utilizando la prueba de TUKEY para conocer los tratamientos estadísticamente iguales.

Técnicas a utilizar para la recolección, análisis e interpretación de datos

a. Trabajo de Campo

Para recolectar la información proveniente de las mediciones realizadas de las diferentes variables a nivel de campo, se apuntó en tablas para su posterior análisis, en donde se anotó el día observado, tomando en cuenta la importancia de anotarlos bien a manera de evitar el error, se clasificó la información por localidad.

b. Trabajo de Gabinete

Posterior al trabajo de campo se efectuó el trabajo de gabinete, en donde se analizaron los diferentes datos por localidad. Además para interpretar los diferentes procedimientos, se utilizaron los programas de cómputo Microsoft Word 2007 y Excel 2007; el cual será una herramienta útil, donde se efectuaron tablas, gráficas y cuadros, con el objeto de interpretar de manera ordenada y técnica los datos.

Para la interpretación de los resultados estadísticos se utilizó el programa SAS además se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey para conocer los tratamientos estadísticamente iguales.

7. RESULTADOS

7.1 Matriz de resultados

Objetivo Específico	Resultado Esperado	Resultado Obtenido
Caracterización fitoquímica del extracto botánico supercrítico de orégano (<i>Lippia graveolens</i>) para la identificación de metabolitos secundarios.	Metabolitos secundarios presentes en el extracto botánico supercrítico de orégano.	28,500ppm de timol. Se determinó la presencia de saponinas, flavonoides, alcaloides y aceites esenciales.
Determinar la dosis efectiva del extracto de orégano que actúa como fungicida para el control eficiente de la Roya (<i>Hemileia vastatrix</i>) del cultivo de café (<i>Coffea arabica</i> L.) in vitro.	Concentración efectiva de extracto como fungicida.	No se logró determinar la dosis efectiva a nivel in-vitro.
Evaluar la eficiencia del extracto botánico supercrítico de orégano (<i>Lippia graveolens</i>) como fungicida para el control de la Roya (<i>Hemileia vastatrix</i>) en el cultivo de café (<i>Coffea arabica</i> L.) a nivel de campo.	Tratamiento que controla incidencia de infección de roya en 10%.	Se están evaluando 12 tratamientos más un testigo en con 4 repeticiones en dos localidades, para un total de 104 parcelas. No existe diferencia significativa en cuanto al control de la roya en los 12 tratamientos evaluados.

Divulgar los resultados de la investigación ante productores, asociaciones, cooperativas, centros de enseñanzas e instituciones vinculadas a la producción de café en la región nororiental.	Dar a conocer los resultados obtenidos de la investigación ante las instituciones relacionadas con el tema del café.	Reuniones con los gerentes de ANACAFE Y ASORECH
--	--	---

Fuente: DIGI, 2014.

7.2 Resultados del análisis de tamizaje fitoquímico de extracto de orégano (*Lippia graveolens*).

Tabla 1

Resultado de cromatografía en capa fina elaborado por LIPRONAT, para la determinación de saponinas en muestras de extracto de orégano.

Fase móvil: Cloroformo: Metanol: Agua (64:50:10)			
Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Morado	0.56
	2	Naranja	0.69
	3	Naranja	0.74
	4	Verde	0.81
Estándar Saponinas 0.2%	1	Naranja	0.8

Tabla 2

Resultado de cromatografía en capa fina por LIPRONAT para la determinación de flavonoides en muestras de extracto de orégano (*Lippia graveolens*) (continuación).

Fase móvil: Acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético-agua (100: 11:11:27)			
Revelador: NP/PEG			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Naranja	0.43
	2	Morado	0.54
	3	Naranja	0.66
	4	Rojo	0.74
	5	Morado	0.79
Estándar de rutina	1	Naranja	0.41
Estándar de ácido clorogénico	1	Celeste	0.51
Estándar de quercetina	1	Naranja	0.82

Tabla 3

Cromatografía en capa fina para la determinación de alcaloides en muestras de extracto de orégano (Lippia graveolens) (continuación).

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo- dietanolamina (70:20:10)			
Revelador: Dragendorff			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Naranja	0.24
Estándar atropina	1	Naranja	0.37
Estándar papaverina	1	Naranja	0.71

Tabla 4

Cromatografía en capa fina para la determinación de aceites esenciales en muestras de extracto de orégano (Lippia graveolens) (continuación).

Fase móvil: Tolueno-acetato de etilo (93:7)			
Revelador: Anisaldehído-ácido sulfúrico			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Morado	0.3
	2	Violeta	0.45
	3	Rosado	0.71
	4	Rosado	0.94
	5	Rosado	0.94
Estándar eugenol	1	Violeta	0.56
Estándar citroneral	1	Rosado	0.79
Estándar nerol	1	Morado	0.35
Estándar timol	1	Rosado	0.65
Estándar menta	1	Fusia	0.67

7.3 Resultados del índice de infección y control de roya (*Hemileia vastatrix*), utilizando el extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*).

Tabla 5

Promedio de infección de Roya en las plantaciones de café en los dos bloques de muestreo, en el municipio de la Unión, Zacapa, 2014.

Promedio infección roya		
Tratamiento	Bloque 1 (%)	Bloque 2 (%)
0	36.66	40.16
1	36.98	49.09
2	35.19	59.12
3	29.87	49.86
4	34.27	48.51
5	27.11	49.55
6	40.39	44.79
7	28.81	51.95
8	42.47	42.58
9	36.19	40.41
10	42.91	48.48
11	46.19	36.95
12	46.28	56.65
Promedio total	37.18	47.55

Tabla 6

*Análisis de varianza para la variable: sección alta de la planta en la primera aplicación de extracto de orégano (*Lippia graveolens*) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa.*

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.49759615	0.04146635	0.41	0.0983	NS
Localidad	0.24038462	0.24038462	2.38	0.1269	NS
Tratamientos /localidad	0.41586538	0.03465545	0.34	0.9781	NS
Coefficiente de Variación	73.4327				
NS= No existe diferencia significativa					

Tabla 7

Análisis de varianza para la variable: sección media de la planta en la primera aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.28125	0.0234375	0.28	0.9903	NS
Localidad	0.11778846	0.11778846	1.43	0.2358	NS
Tratamientos /localidad	0.53846154	0.04487179	0.54	0.8793	NS
Coefficiente de Variación	76.60905				
NS= No existe diferencia significativa					

Tabla 8

Análisis de varianza para la variable: sección baja de la planta en la primera aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.38821115	0.03235176	0.37	0.9696	NS
Localidad	0.77884615	77884615	8.96	0.0037	**
Tratamientos /localidad	58052885	0.0483774	0.56	0.87	NS
Coefficiente de Variación	92.938				
NS= No existe diferencia significativa					
**= Diferencia estadísticamente significativa					

Tabla 9

Análisis de varianza para la variable: sección alta de la planta en la segunda aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.43028846	0.03585737	0.74	0.7057	NS
Localidad	0.82271635	0.82271635	17.04	<0.00001	**
Tratamientos /localidad	0.65384615	0.05448718	1.13	0.3499	NS
Coeficiente de Variación	83.85676				
NS= No existe diferencia significativa					
**= Diferencia estadísticamente significativa					

Tabla 10

Análisis de varianza para la variable: sección media de la planta en la segunda aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.274038446	0.02283654	0.75	0.7034	NS
Localidad	0.37560096	0.37560096	12.25	0.0008	**
Tratamientos /localidad	0.31971154	0.02664263	0.87	0.5807	NS
Coeficiente de Variación	99.76516				
NS= No existe diferencia significativa					
**= Diferencia estadísticamente significativa					

Tabla 11

Análisis de varianza para la variable: sección baja de la planta en la segunda aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.23677885	0.01973157	0.68	0.7662	NS
Localidad	0.37560096	0.37560096	12.93	0.0006	**
Tratamientos /localidad	0.24158654	0.02013221	0.69	0.7533	NS
Coeficiente de Variación	144.6918				
NS= No existe diferencia significativa					
**= Diferencia estadísticamente significativa					

Tabla 12

Análisis de varianza para la variable: sección alta de la planta en la tercera aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.43990385	0.03665865	1.29	0.2422	NS
Localidad	0.11778846	0.11778846	4.14	0.0453	**
Tratamientos /localidad	0.56971154	0.04747596	1.67	0.0902	NS
Coeficiente de Variación	103.179				
NS= No existe diferencia significativa					
**= Diferencia estadísticamente significativa					

Tabla 13

Análisis de varianza para la variable: sección media de la planta en la tercera aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	1.22475962	0.1020633	2.43	0.0099	**
Localidad	0.08653846	0.08653846	2.06	0.1555	NS
Tratamientos /localidad	0.49158654	0.0409654	0.97	0.4809	NS
Coeficiente de Variación	104.0523				
NS= No existe diferencia significativa					
**= Diferencia estadísticamente significativa					

Tabla 14

Análisis de varianza para la variable: sección baja de la planta en la tercera aplicación de extracto de orégano (Lippia graveolens) en 12 tratamientos en las localidades de 900msnm y 1100 msnm en el municipio de la unión del departamento de Zacapa (continuación)

Análisis de Varianza					
	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F. calculado	Pr ≥ F	SIG
Tratamientos	0.33413462	0.02784455	1.38	0.1953	**
Localidad	0.37560096	0.37560096	18.56	<0.0001	**
Tratamientos /localidad	0.41346154	0.03445513	1.7	0.02821	NS
Coeficiente de Variación	137.6095				
NS= No existe diferencia significativa					
**= Diferencia estadísticamente significativa					

Tabla 15

Tratamientos evaluados en campo, correspondientes a las concentraciones de Timol presentes en el extracto Botánico supercrítico de orégano (Lippia graveolens) para el control de la Roya (Hemileia vastatrix) en el cultivo de café (Coffea arabica L.).

Tratamientos evaluados en campo		
Tratamiento	Color	Dosis (ppm de timol)
0	Rojo y amarillo	Testigo
1	Rojo	50
2	Morado	100
3	Celeste	150
4	Azul	200
5	Rosado	250
6	Morado y verde	300
7	Blanco	350
8	Rosado y celeste	400
9	Verde	450
10	Amarillo	500
11	Naranja	550
12	Negro	600

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Previo a la discusión de los resultados obtenidos en la investigación, se hace manifiesto que los resultados obtenidos fueron a nivel de campo, interviniendo los factores edafológicos, topográficos y climáticos; utilizando una plantación de café de la variedad catuai-caturra, factores que influyeron en el coeficiente de variación.

Reganult-Roger et al.,(1993) evaluó la eficiencia de los aceites esenciales de 22 plantas, como bactericida sobre la bacteria *Acanthoscelides obtectus*; obteniendo resultados positivos con el tomillo (*Thymus vulgaris*) (rico en fenoles como el timol y carbacrol) y *origanum majorama* (rico en terpinen-4-ol), los cuales fueron los agentes más tóxicos.

Tuni & Sahinkaya., (1998) evaluó la eficiencia como agentes pesticidas en plantas, de los aceites esenciales de las plantas comino (*Cuminum cyminum*), anís (*Pimpinella*

ansium), orégano (*Origanum syriacum* var *benavii*) y eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*), siendo eficientes en el control del afido del algodón (*Aphis gossypii*) y la araña carmi (*Teracnychus cinnabarinus*); evaluados bajo condiciones de invernadero.

De acuerdo los resultados obtenidos en la tabla No. 1, se presentan los resultados del análisis de saponinas para la muestra de extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*) presentó cuatro bandas y el colores de las cuatro coinciden con el color presentado por el revelador, lo cual indica la presencia de saponinas; los Rf de las bandas no coinciden con el estándar de saponinas al 0.2%, lo que indica que hay saponinas diferentes al estándar utilizado, ver anexo 4. De acuerdo con lo reportado por Morataya en 2006 y Teleguario en 2008, el orégano presenta saponinas entre sus metabolitos secundarios.

En la tabla No.2 se presentan los resultados del análisis de flavonoides, realizado a la muestra de extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), presentando cinco bandas y colores característicos de flavonoides, lo cual indica la presencia de los mismos. La banda 1 presenta un Rf muy similar al estándar de Rutina, asimismo coinciden en el color naranja; las bandas 2, 3, 4 y 5 no coinciden con los estándares utilizados, lo que indica que contiene flavonoides diferentes a los estándares, ver anexo 4. La identificación de flavonoides coincide con lo reportado por Morataya en 2006 y Teleguario en 2008, ya que dicha especie es rica en flavonoides de diferente tipo.

En la tabla No.3 se presentan los resultados del análisis alcaloides, realizado a la muestra de extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), presentando una banda de color naranja al igual que los estándares, lo cual indica la presencia de alcaloides pero su Rf no coincide con los estándares utilizados, ver anexo 4; Ortiz en 2006 reporta la presencia de alcaloides en el orégano.

En la tabla No.4 se presentan los resultados obtenidos del análisis de aceites esenciales, realizado a la muestra de extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), presentando cinco distintas bandas con los colores característicos de aceites esenciales, lo que indica la presencia de los mismos. Los Rf de las muestras no coinciden con los estándares utilizados lo que indica que los aceites esenciales

presentes en la muestra de orégano son diferentes a los estándares utilizados, ver anexo 4. La identificación de aceites esenciales en el orégano coincide con lo reportado por Solano et. al en 2004 y Morataya en 2006, ya que dicha especie es rica en aceites esenciales de diferente tipo.

Para llevar a cabo el análisis estadísticos de los resultados alcanzados en el campo, los datos obtenidos fueron sometidos a dos análisis estadísticos, siendo el primero el análisis de Andeba con el cual se determinó si existe diferencia significativa entre tratamientos, localidades y parte alta, media y baja de la planta; el segundo análisis realizado fue el análisis pareado, en donde se determinó si existe o no diferencia significativa entre aplicaciones.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico se presentan en las tablas No. 6, 7 y 8; en donde se observa que para la primera aplicación de extracto botánico supercrítico de orégano para el control de la roya en el cultivo de café, en la sección alta de la planta, no existe diferencia significativa para el control de la roya entre localidades (parte alta 1,100msnm y baja 900msnm), situación similar para el control de la roya en los 12 tratamientos evaluados más el testigo, no existe diferencia significativa; como se puede observar en las tablas No.6, 7 y 8; el coeficiente de variación se encuentra dentro del rango desde 73.43 hasta 92.94, esta variabilidad en los datos se debe a la irregularidad de la plantación de café.

Los resultados del análisis estadístico para la segunda aplicación, reportados en las tablas No. 9, 10 y 11, se observa para el control de la roya, si existe diferencia entre las localidades mas no así para los tratamientos; situación similar para la parte media y baja de la planta de café; presentando un coeficiente de variación 83.85 hasta 144.69, debido a la irregularidad de la plantación del café.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico para la tercera aplicación de extracto botánico supercrítico de orégano para el control de la roya en el cultivo de café, tomando en cuenta la variable localidad, tratamiento y parte alta, media y baja de la planta de café; se reporta en las tablas No. 12, 13 y 14, los resultados obtenidos, en donde se reporta que no existe diferencia significativa entre tratamientos evaluados,

localidad, parte alta y media de la planta. Se reporta diferencia significativa para la parte baja de la planta entre localidades y tratamientos. Siendo los tratamientos 5, 7 y 8, los que se obtienen un mejor control de la roya; cabe mencionar que estos tratamientos son valederos bajo las condiciones en que se realizó la tercera aplicación; como se explicara en el análisis e prueba de medias.

Otro de los análisis estadísticos realizados a los resultados obtenidos en la fase de campo, fue el “Análisis pareado o prueba de medias” en el cual se compararon las tres aplicaciones entre ellas, para lo cual se utilizaron 25 grados de libertad para las 26 aplicaciones, correspondientes a los 12 tratamientos más un testigo en dos localidades, correspondiendo una T_t tabular ($T_t=2.38$).

Los resultados del análisis de prueba de medias reportados, para la sección alta de la planta, al comparar la primera aplicación versus la segunda aplicación se obtiene un T_c (T_e calculada) con un valor de 4.60, por lo tanto si existe diferencia significativa entre la primera aplicación respecto a la segunda; al comparar la primera aplicación versus la tercera aplicación, se obtuvo una T_c con un valor de 9.46, existiendo una mayor diferencia entre la primera aplicación y la tercera; esto se debe a que a medida que se van realizando las aplicaciones el control de la roya va aumentando; al comparar la segunda aplicación versus la tercera aplicación, se obtuvo un T_c de 3.47, lo que indica que la diferencia entre la segunda respecto a la tercera aplicación es menor en cuanto al control de la roya.

Los resultados del análisis pareado de los resultados para la parte media de la planta en cada uno de los tratamientos en las dos localidades fueron para la primera aplicación versus la segunda aplicación, se obtuvo una T_c de 6.07, para la primera aplicación y la tercera aplicación se obtuvo una T_c de 5.48 y para la segunda aplicación versus la tercera aplicación se obtuvo una T_c de 0.75; con los resultados obtenidos, se observa que entre la primera y segunda aplicación, primera y tercera aplicación existe diferencia significativa en cuanto al control de la roya; mientras que para la segunda aplicación y la tercera aplicación no existe diferencia significativa en cuanto al control de la roya en el cultivo de café.

Los resultados reportados, para los valores de Tc obtenidos para la sección baja de la planta, para determinar si existe o no diferencia significativa, para la primera aplicación versus la segunda aplicación fue de 7.26, para la primera aplicación versus la tercera aplicación fue de 8.55 y para la segunda aplicación versus la tercera aplicación fue de 0.62, por lo tanto no existe diferencia significativa entre la segunda aplicación y la tercera aplicación; caso contrario para la primera aplicación y la segunda aplicación aumentando la diferencia entre la primera y la tercera aplicación, lo cual indica que al realizar la tercera aplicación se obtiene una mejor control de la roya.

Shaaya & Kostjukovsky,. (1998) recomienda la formulación y comercialización de los aceites esenciales para el uso de pesticidas, ya que presentan una alta toxicidad, sin afectar el ambiente.

En Brasil se estima que se pierde el 30% de la producción anual por efecto de la roya (*Hemeleia vastatrix* Berker. & Br.) (POZZA, 2008). Medice et al. (2007) evaluó los aceites esenciales de eucalipto (*Corimbia citriodora* Hill & Johnson), tomillo (*Thymus vulgaris* L.), neem (*Azadriachta indicsa* A. Juss) y citronela (*Cymbopogon nardus* L.) como inhibidor de en la germinación de las uredinosporas de *Phakospora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. Y reducir la severidad, bajo condiciones de invernadero.

Pereira et al. (2012) evaluó la toxicidad en la germinación de *H. vastatrix*, de los aceites esenciales de árbol de Té (*Malaleuca alternifolia* Cheel), canela (*C. zeylanicum*), limoncillo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), citronela (*C. nardus* (L.) Rendle), clavo (*A. indica*) y tomillo (*T. vulgaris*) evaluados en las concentraciones 2, 250, 500, 1000, 1500 y 2000 μ L L⁻¹ en leche en polvo destilada y esterilizada, 10gr L⁻¹ se agregaron en agua destilada y esterilizada, agregándole un emulsificante natural; con el objetivo de evaluar la eficiencia de los aceites esenciales en el control de la roya, se trabajó sobre tres plantas de café susceptibles a *H. vastatrix*, las plantas seleccionadas fueron: Mundo Novo 379/19, Catuaí AIC 62 y Cacaí 2SL. Las plantas las mantuvieron bajo condiciones de invernadero, con el plan de fertilización de acuerdo con las recomendaciones (RIBEIRO et al., 1999).

De igual manera Pereira et al. (2008) observo reducción en la germinación del conidial en el *Coffea coffeicola*, cuando incremento las concentraciones del aceite esencial de tomillo. Este efecto es debido a que presenta probablemente componentes de timol y carvacrol, que tienen propiedades fungicidas y bactericidas (Zambonelli et al., 2004).

El aceite esencial de *Cymbopogon sp.*, *Thymus sp.* y *Cynamomun sp.* Posee muchos monoterpenos (dlimonene, cineol, b-myrcene, anetol, p-anisaldehydo, carvacrol, carvone, limoneno, felandreno, pinen, etc), que son los responsables de la inhibición y germinación del patógeno (WILSON et al., 1997).

Los aceites de limoncillo, canela, tomillo, árbol de té, citronela y acibenzolar-S-metil, reducen la incidencia en dosis respectivas de 15.5%, 15.0%, 13.2%, 12.1%, 12.0% y 7.9%. Los aceites esenciales de clavo y limoncillo presentan reducciones de 67.9% a 67.7% respectivamente, seguidamente el árbol de té, con reducciones de 55.4%. El aceite de canela reduce en 45.3%, seguido por tomillo y citronela, con un control de 37.5% y 32.7% respectivamente. El acibenzolar-S-methyl presentó una severa reducción del 12.1%, los aceites de eucalipto y neem no presentaron control. Pereira et al.(2012)

Para las plantas de café Catucaí 2SL, el fungicida tebuconazol, redujo el AUIPC y el AUSPC en 77.6% y 93.9%, respectivamente, diferencia en comparación con otros tratamientos en relación al control. Acibenzolar-S-methyl y los aceites de tomillo y clavo redujeron la incidencia de roya en 56.6%, 55.5% y 54.3%. Pereira et al. (2012)

Para para el cultivo de café Mundo Novo 379/19. Los aceites de citronela y canela redujeron la incidencia de la roya en 34.0% y 29.6%, respectivamente, seguido por los aceites de eucalipto, árbol de té, tomillo y clavo con reducciones de 11.3%, 10.2%, 5.7% and 4.8%, respectivamente. Pereira et al. (2012). Con base a los resultados obtenidos en el microscopio y el examen de germinación, se comprobó, que los aceites esencial actúan directamente en las urediniosporas *H. vastatrix*, reduciendo la infección por el patógeno. El uso de aceites esenciales es una alternativa para la reducción del

uso de pesticidas, que causan daños irreversibles en la salud humana y en el medio ambiente. Pereira et al. (2012).

9. ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN

- **Docencia**

Dentro de las actividades de docencias desarrolladas dentro del periodo de ejecución del proyecto, se menciona la incorporación de grupos de estudiantes de las carreras de Agronomía del primer y tercer semestre; además de los estudiantes de la carrera de Ingeniería en Gestión Ambiental del Centro Universitario de Oriente, con quienes se desarrollaron prácticas de laboratorio, giras de campo al área experimental en la Finca Cañón Grande 2, en el municipio de la Unión, departamento de Zacapa.

- **Divulgación**

Dentro de las actividades de divulgación desarrolladas por el equipo de investigación, se menciona la participación en el congreso regional de ciencia y tecnología, reuniones con el propietario de la finca en la Unión, reuniones con Edgar Lemus gerente de ASORECH, así mismo como a los docentes de las carreras de Agronomía e Ingeniería en Gestión Ambiental del Centro Universitario de Oriente

- **Gestión y vinculación**

Actividades de Gestión: dentro de las actividades de gestión se menciona la obtención de una bodega para el almacenamiento de las materias primas (alcohol, dióxido de carbono y Orégano), donación de un cilindro de gas, donación de 2 quintales de orégano por parte de APRONOR.

Actividades de Vinculación: dentro de las actividades de vinculación se menciona, el establecimiento de relación con la Asociación de Productores de Orégano de Oriente – APRONOR-. El equipo de investigación ha participado en prácticas de laboratorio y actividades de campo con estudiantes de las carreras de Ingeniería en Gestión Ambiental y Agronomía del CUNORI; coordinación y participación en el primer congreso regional de Ciencia y Tecnología.

10. CONCLUSIONES

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto botánico supercrítico, pertenecen a los grupos Saponinas, flavonoides, aceites esenciales y alcaloides; los cuales no concuerdan en su totalidad con los estándares reportados por Solano et. al en 2004 y Morataya en 2006; por lo tanto se concluye que la composición fitoquímica del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), presenta variaciones metabólicas en relación al extracto etanólico de orégano (*Lippia graveolens*).
2. No es posible aislar el hongo de la Roya (*Hemileia vastatrix*), por medio de la metodología planteada para la presente investigación ya que este es un hongo que necesita de un organismo vivo para poder desarrollarse.
3. El extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), presenta propiedades fungidas ya que, permite el control eficiente de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*), en las zonas productoras del municipio de la Unión, departamento de Zacapa.
4. De acuerdo con el análisis de andeba realizados a los resultados obtenidos en campo, para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*) no existe diferencia significativa entre los 12 tratamientos evaluados y el testigo utilizado.
5. De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de andeba, se concluye que la altura del cultivo de café (900msnm y 1100msnm), variable evaluada, no presenta diferencia significativa para el control de la Roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica L.*), por medio del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*).

6. De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis de prueba de medias, comparando las tres aplicaciones entre sí; se concluye que si existe diferencia significativa entre la primera y la segunda, aumentando la diferencia entre la primera aplicación y la tercera, siendo la tercera aplicación en donde se obtiene el mayor control de roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), por medio del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*).

11. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar el análisis fitoquímico al extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), que permita la identificación específica de cada uno de los metabolitos secundario presentes en el extracto obtenido por tecnología de fluidos supercríticos.
2. Con la finalidad de aumentar la eficiencia del control de la roya (*Hemileia vastatrix*) en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), se recomienda evaluar el extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), de manera preventiva, para disminuir el índice de infección.
3. Se recomienda realizar la evaluación del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), como potenciador, incorporándolo a las soluciones de otros fungicidas comerciales, disminuyendo la dosis del fungicida sintético en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.).
4. De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de andeba, se recomienda realizar la evaluación del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), en dosis de 5ppm de timol, 10ppm de timol, 20ppm de timol y 40ppm de timol; esto para determinar la dosis mínima efectiva.

5. Tomando como base la propiedad fungicida de contacto del extracto botánico supercrítico de orégano (*Lippia graveolens*), se recomienda realizar la evaluación para el control de la roya (*Hemileia vastatrix*), formulado con adherente foliar; para lograr un mayor contacto con la hoja de café.

12. BIBLIOGRAFÍA

Azurdia C. (1995). Caracterización de algunos cultivos nativos de Guatemala. Instituto de Investigaciones Agronómicas. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Agronomía, 172 p.

Barrera N. Laura L. García B. Laura J. (2008=). *Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de Fusarium sp. aislado de papaya (Carica papaya)*. Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada. Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac Tepetitla Km 1.5 Tepetitla, Tlaxcala, México.

Burgos Ramos, EDA. 2003. *Determinación de los tipos de café (Coffea arabica) que se producen en la región del Trifinio – Guatemala y descripción de sus sistemas productivos*. Universidad San Carlos de Guatemala, GT.

Cañigüeral, S.; Stashenko, E. E. 2000. Análisis de calidad de aceites esenciales. En: Arnaldo Bandoni (Ed.) Los recursos vegetales aromáticos. Capítulo XI. 197-232. P. La Plata: CYTED-EUNLP

Cordón D, J. (2014). *Evaluación del impacto provocado por la roya del café Hemileiavastatrix, en el municipio de la Unión, Departamento de Zacapa, Guatemala* (Tesis de ingeniero agrónomo inédita). Universidad San Carlos de Guatemala, Chiquimula, GT.

Ciccío, J. 2006. Constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Piper terrabanum* (Piperaceae). Centro de Investigaciones en Productos

Naturales (CIPRONA) y Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 26 P.

Edgar, L.S. (1994). *Extracción Supercrítica CO2* (Tesis de ciencia químicas inédita). Universidad San Carlos de Guatemala. Facultad de ciencias químicas y farmacia, escuela de química.

Erdogan K., JOAN F. B. (1993) *Supercritical Fluid Engineering Science*. American Chemical Society, Washinton, DC. 410 p.

Ku, J. (2008). *Ingeniera de invernaderos: Actividad microbiana de extractos de orégano (Lippia graveolens) contra microorganismos fitopatógenos* (Tesis maestría Universidad autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería). Recuperada de <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/2285/1/RI001787.pdf>

Lizcano G. Maria C. 2007. "Evaluación de la actividad anti fúngica del extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra Botrytis Cinerea, Fusarium Oxisporum, Sclerotinia Sclerotiorum. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

Manual de Operaciones. Procedimiento Estándar de Operación. Laboratorio de Investigación de Productos Naturales 2005.

Portillo R Martha C, Viramontes R, Sabina (2008). *Efecto antifúngico de aceite esencial de orégano mexicano (lippia berlandieri shauer) sobre hongos contaminantes en productos de panadería*. Facultad de C. Químicas. Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, México.

Rodas A. (2014). Determinación y evaluación de la calidad del agua en zonas de recarga hídrica del municipio de Chiquimula, Guatemala. Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT). Proyecto FODECYT No. 60-2012.

Santa Cruz, L. Manual: Selección Fitoquímica, Guía Práctica para los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fitoquímica. USAC. Guatemala. p. 92

Valero G José, Muñoz-C. Laila N. (2008). *Aislamiento y control de cepas de hongos asociados a la pudrición texana por medio de aceites esenciales de orégano Mexicano*. Centro de Investigación para los Recursos Naturales. Salaces, Chihuahua, Chihuahua, México.

Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8-10), 603–608. doi:10.1016/S0261-2194(00)00079-X

Pereira, R. B., Lucas, G. C., Perina, F. J., & Alves, E. (2012). Essential oils for rust control on coffee plants. *Óleos Essenciais No Controle Da Ferrugem Em Cafeeiro*, 36(1), 16–24.

Pereira, R. B., Lucas, G. C., Perina, F. J., Resende, M. L. V. De, & Alves, E. (2011). Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência E Agrotecnologia*, 35(1), 115–123. doi:10.1590/S1413-70542011000100014

Regnault-Roger, C., Hamraoui, A., Holeman, M., Theron, E., & Pinel, R. (1993). Insecticidal effect of essential oils from mediterranean plants upon *Acanthoscelides Obtectus* Say (Coleoptera, Bruchidae), a pest of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 19(6), 1233–44. doi:10.1007/BF00987383

Shaaya, E., & Kostjukovsky, M. (2011). Efficacy of Phyto-Oils as Contact Insecticides and Fumigants for the Control of Stored-Product Insects. In I. Ishaaya & D. Degheele (Eds.), *Insecticides with Novel Modes of Action* (pp. 171–187). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Doi:10.1007/978-3-662-03565-8

Tunc, I., & Sahinkaya, S. (1998). Sensitivity of two greenhouse pests to vapours of essential oils. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 86(2), 183–187. doi:10.1046/j.1570-7458.1998.00279.x

13. ANEXOS

Anexo 1. Puntos de muestreo, componentes principales del orégano, especies indicadoras de las zonas de vida y distribución de la tierra en el municipio de la Unión, Zacapa.

Puntos de localización y muestreo de la especie orégano (*Lippia graveolens* HBK) en Guatemala.

No.	Localidad	Altitud msnm	Tipo cultivo
1	Agua Caliente, San José, Teculután	248	Silvestre
2	Atrás escuela San José, Teculután	237	Silvestre
3	Cementerio, San José, Teculután	222	Silvestre
4	Agua Caliente, Zacapa	200	Silvestre
5	El Oréganal, Teculután, Zacapa	300	Silvestre
6	Pasabién, Río Hondo, Zacapa	270	Silvestre
7	Casas de Pinto, Río Hondo	180	Silvestre

Fuente: Martínez Y Córdón (2002).

Componentes principales del orégano (*Lippia graveolens*).

A-Pinene	p-Cimene	γ -Alemene
Camphene	α -Tepinolence	β -Bisatolene
B-Pinene	l-Octen-3-ol	γ -Cadinene
Sabinene	Trans-sabinene hydrate	Trans-Carvacrol
Myrcene	Cis-Sabine-hydrate	Calemene
A-phelandrene	Linalool	ρ -Cimene-8-ol
A-Terpinene	β -Caryophillene	Carvacrol acetate
Limonene	Methyl carvacrol	Sparcholerol
1,8 - Cyneole	Trans-Dihydrocarvone	Thymol
R-Terpinene	Isobomeol	Carvacrol
B-Ocimene	α -Terpineol	

Continuación de anexo 1.

Especies indicadoras de las zonas de vida del municipio de La Unión.

Zona de Vida	Flora
Bosque húmedo subtropical (templado)	Pinus oocarpa, Curatella americana, Quercus spp., Byrsonima crassifolia
Bosque seco subtropical	Cochlospermum vitifolium, Swietenia humilis, Alvaradoa amorphoides, Sabal mexicana, Phyllocarpus septentrionalis, Ceiba aesculifolia, Albizia caribaea, Rhizophora mangle, Avicennia nitida, Leucaena guatemalensis

Fuente: MAGA, 2013.

Distribución de las tierras del municipio de La Unión.

Clase	Vocación	Área en Ha.
III	Tierras cultivables, tienen medianas limitaciones para producción agrícola aptas para cultivos en riego.	26
IV	Tierras cultivables con severas limitaciones permanentes, con relieve ondulado, apta para pastos y cultivos perennes, requiere prácticas intensivas de manejo.	94
VI	Tierras no cultivables, aptas para cultivos perennes, principalmente para producción forestal.	366
VII	Tierras no cultivables, aptas solamente para fines de producción forestal, relieve quebrado con pendientes muy inclinadas.	37

Fuente: MAGA, 2006.

Anexo 2. Mapa de ubicación del área de estudio

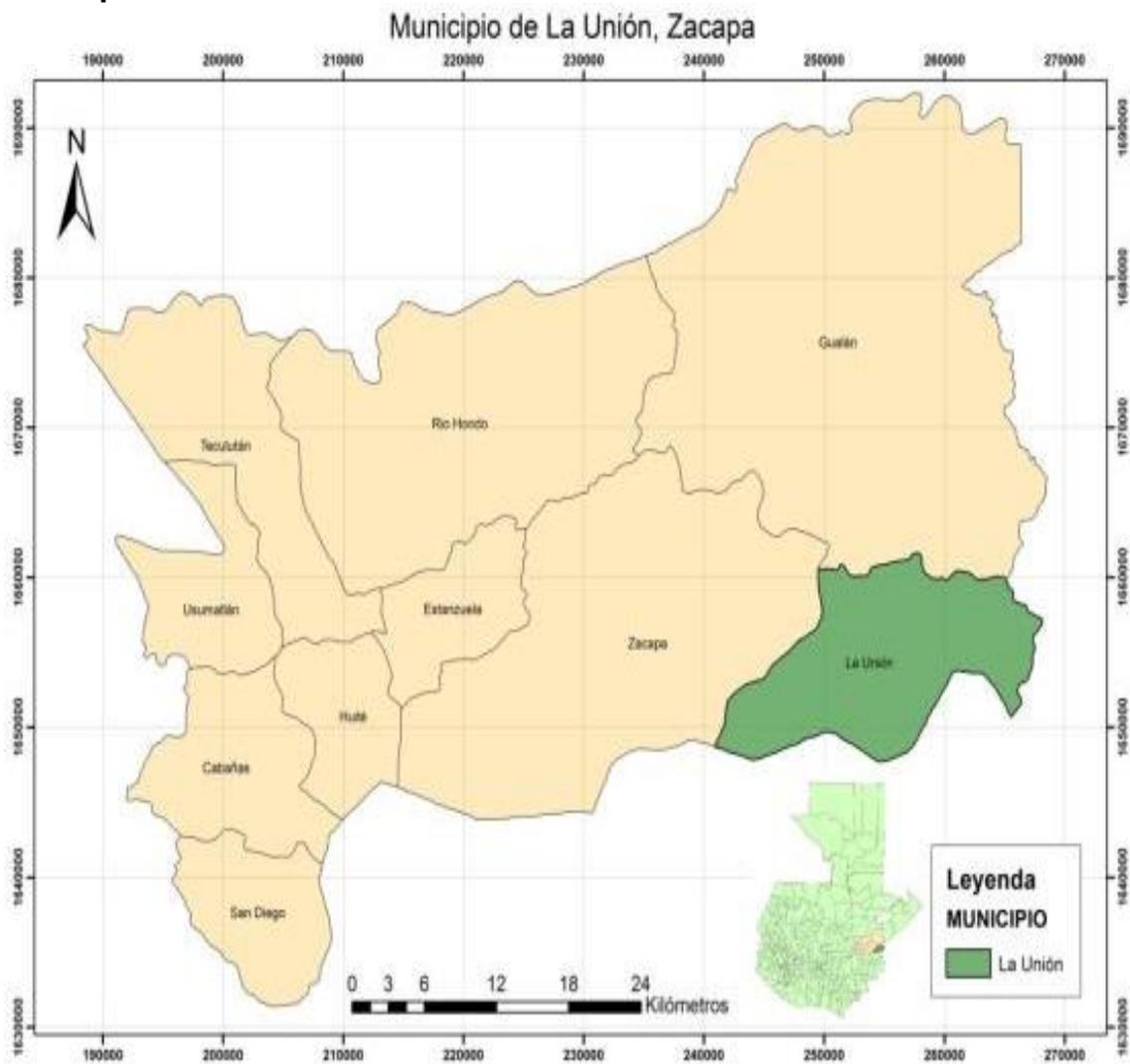


Figura 1. Ubicación en el municipio de la Unión, Zacapa.

Anexo 3. Figuras del equipo supercrítico

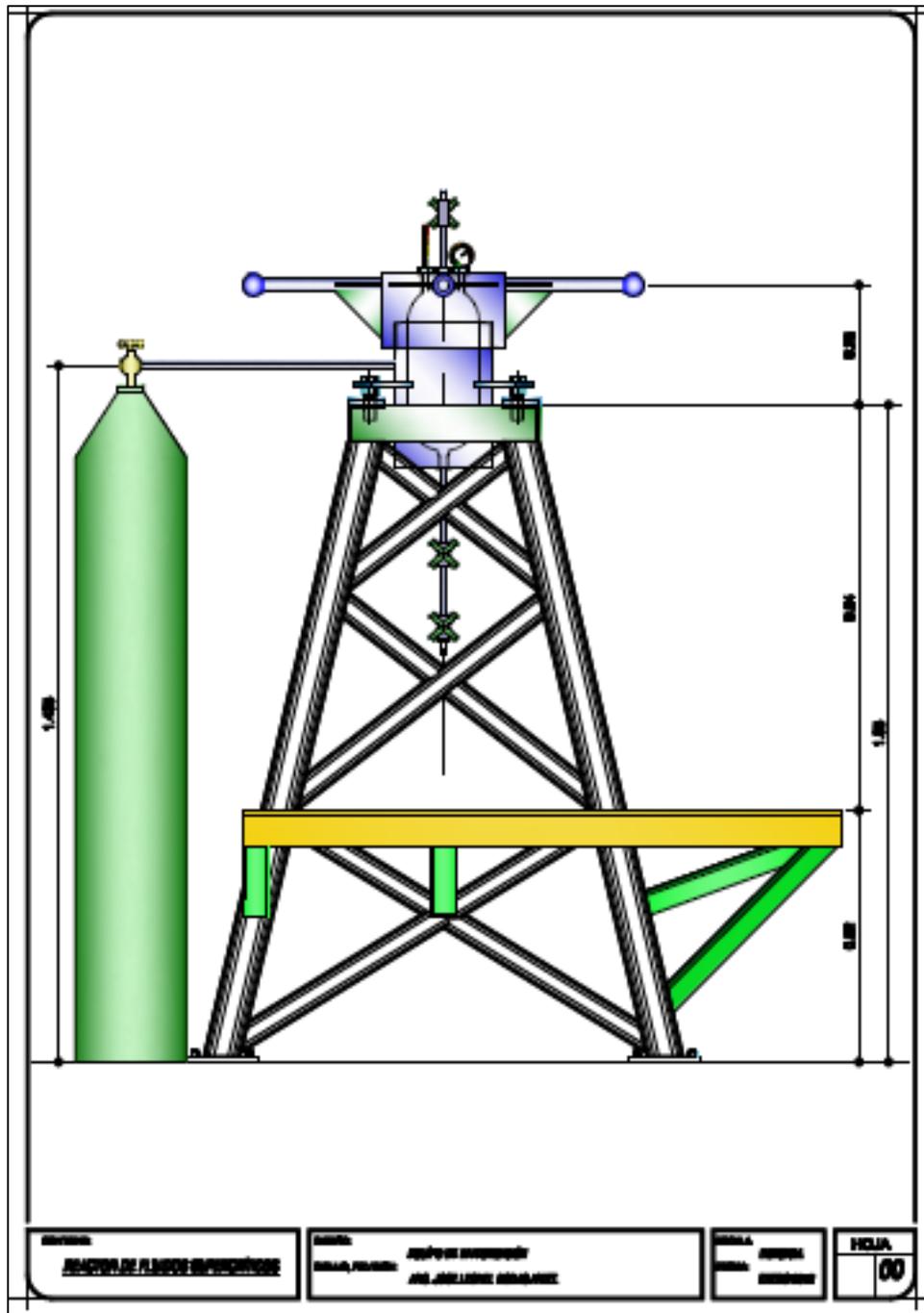


Figura 2. Esquema de equipo de extracción con fluidos supercríticos.

Continuación anexo 3.



Figura 3. Equipo para elaborar extractos botánicos por medio de Fluidos Supercrítico.

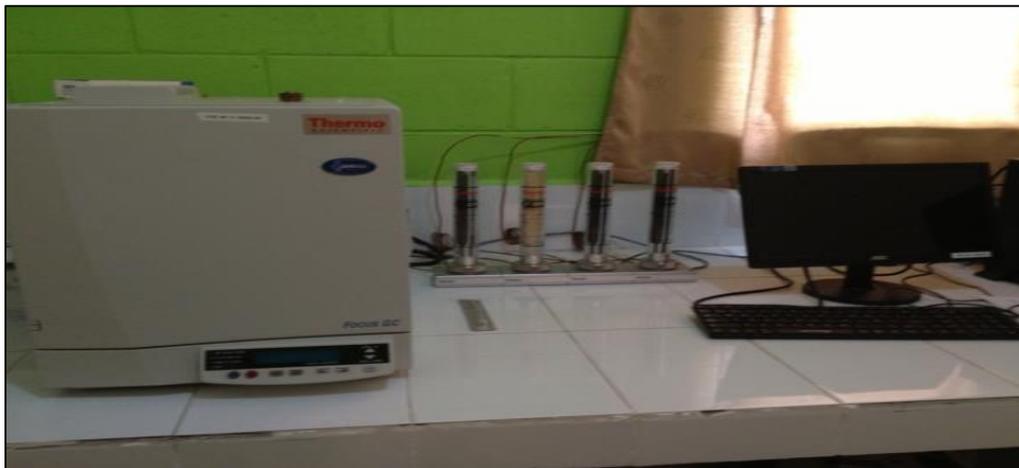


Figura 4. Cromatógrafo de gases para análisis de Timol y Carvacrol.

Anexo 4. Análisis tamizaje fitoquímico de extracto de orégano



Laboratorio de Investigación de
Productos Naturales (LIPRONAT)

Análisis: Tamizaje Fitoquímico de extracto de orégano

Solicitante: Abner Rodas

Fecha: 24 de abril de 2014

No. L 20140302

1. Técnica:

Cromatografía en capa fina para la identificación de cada uno de los diferentes metabolitos secundarios.

2. Resultados:

2.1 Cromatografía en capa fina para la determinación de saponinas en muestras de extracto de orégano.

Fase Móvil: Cloroformo: Metanol: Agua (64:50:10)			
Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Morado	0.56
	2	Naranja	0.69
	3	Naranja	0.74
	4	Verde	0.81
Estándar Saponinas 0.2%	1	Naranja	0.80

Fuente: Datos Experimentales.

La muestra presentó cuatro bandas y los colores que todas presentaron con el revelador, indica la presencia de saponinas; los Rf de las bandas no coinciden con el estándar de saponinas al 0.2%, lo que indica que hay saponinas diferentes al estándar utilizado. Según lo reportado por Morataya en 2006 y Teleguario en 2008, el orégano presenta saponinas entre sus metabolitos secundarios.

Continuación anexo 4.

2.2 Cromatografía en capa fina para la determinación de flavonoides en muestras de extracto de orégano

Fase Móvil: Acetato de Etilo – ácido fórmico – ácido acético – agua (100:11:11:27)			
Revelador: NP/PEG			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Naranja	0.43
	2	Morado	0.54
	3	Naranja	0.66
	4	Rojo	0.74
	5	Morado	0.79
Estándar de Rutina	1	Naranja	0.41
Estándar de Ácido Clorogénico	1	Celeste	0.51
Estándar de Quercetina	1	Naranja	0.82

Fuente: Datos Experimentales.

Las muestras presentaron cinco bandas y colores características de flavonoides, lo que indica la presencia de los mismos. La banda 1 presenta un Rf muy similar al estándar de Rutina, asimismo coinciden en el color naranja; las bandas 2, 3, 4 y 5 no coinciden con los estándares utilizados, lo que indica que contiene flavonoides diferentes a los estándares. La identificación de flavonoides coincide con lo reportado por Morataya en 2006 y Teleguario en 2008, ya que dicha especie es rica en flavonoides de diferente tipo.

2.3 Cromatografía en capa fina para la determinación de alcaloides en muestras de extracto de orégano.

Fase Móvil: Tolueno – acetato de etilo – dietanolamina (70:20:10)			
Revelador: Dragendorff			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Naranja	0.24
Estándar atropina	1	Naranja	0.37
Estándar Papaverina	1	Naranja	0.71

Fuente: Datos Experimentales

La muestra de orégano presentó una banda de color naranja al igual que los estándares, lo cual indica la presencia de alcaloides pero su Rf no coincide con los estándares utilizados; Ortiz en 2006 reporta la presencia de alcaloides en el orégano.

Continuación anexo 4.

2.4 Cromatografía en capa fina para la determinación de aceites esenciales en muestras de extracto de orégano.

Fase Móvil: Tolueno – acetato de etilo (93:7)			
Revelador: Anisaldehído – ácido sulfúrico			
Muestra	Banda	Color	Rf
Extracto de orégano	1	Morado	0.30
	2	Violeta	0.45
	3	Rosado	0.71
	4	Rosado	0.94
	5	Rosado	0.94
Estándar Eugenol	1	Violeta	0.56
Estándar citroneral	1	Rosado	0.79
Estándar nerol	1	Morado	0.35
Estándar timol	1	Rosado	0.65
Estándar menta	1	Fusia	0.67

Fuente: Datos Experimentales.

La muestra del orégano presentó cinco distintas bandas con los colores característicos de aceites esenciales, lo que indica la presencia de los mismos. Los Rf de las muestras no coinciden con los estándares utilizados lo que indica que los aceites esenciales presentes en la muestra de orégano son diferentes a los estándares utilizados. La identificación de aceites esenciales en el orégano coincide con lo reportado por Solano *et. al* en 2004 y Morataya en 2006, ya que dicha especie es rica en aceites esenciales de diferente tipo

3. Referencias Bibliográficas

1. LIPRONAT (2013). *PROCESO ESTANDAR DE OPERACIÓN Manual de tamizaje fitoquímico*. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala.
2. Morataya, M. (2006). Caracterización Farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala: Albahaca de monte (*Ocimum micranthum*), Orégano (*Lippia graveolens*), Salvia sija (*Lippia alba*), Salviyá (*Lippia chiapasensis*). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 37-38

Continuación anexo 4.

3. Teleguario, C. (2008). Caracterización y cuantificación de flavonoides, sapogeninas esteoidales en extractos de tres plantas mesoamericanas: *Lippia graveolens* (Orégano), *Passiflora edulis* (Maracuyá) y *Similax Domingensis* (Zarzaparrilla). Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 40-44
4. Ortiz, G. (2006). Actividad antifúngica de los extractos etanólicos de la flor de *Bourreria huanita* y la hoja de *Lippia graveolens* y sus particiones hexánicas, clorofórmica, acetato de etilo y acuosa contra los hongos *Sporothrix schenckii* y *Fonsecaea pedrosoi*. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Pp. 55-59
5. Solano, A., Hernández, A. & Valladares, M. (2004). Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *Lippia graveolens* (Orégano), *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) en *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*. Salvador: Universidad de el Salvador. Pp. 23

Licda. Nereida
Marroquín

Auxiliar de
Laboratorio

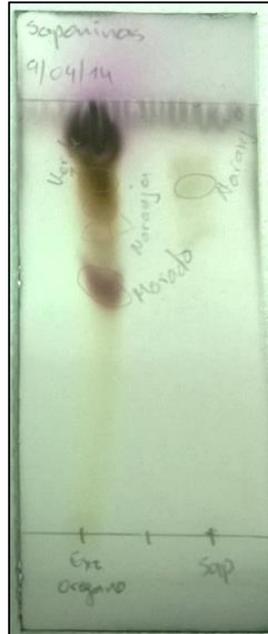
Dra. Sully
Cruz

Coordinadora de
LIPRONAT

Continuación anexo 4.

Anexos

Cromatografía en capa fina de identificación de saponinas

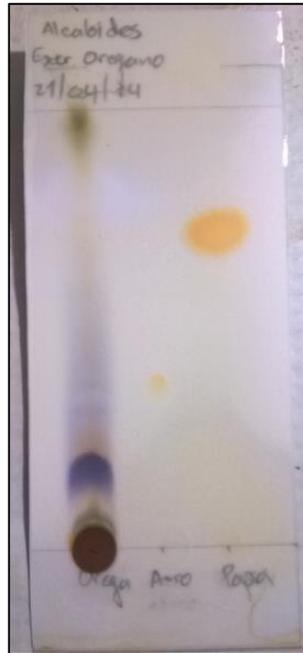


Cromatografía en capa fina de identificación de flavonoides

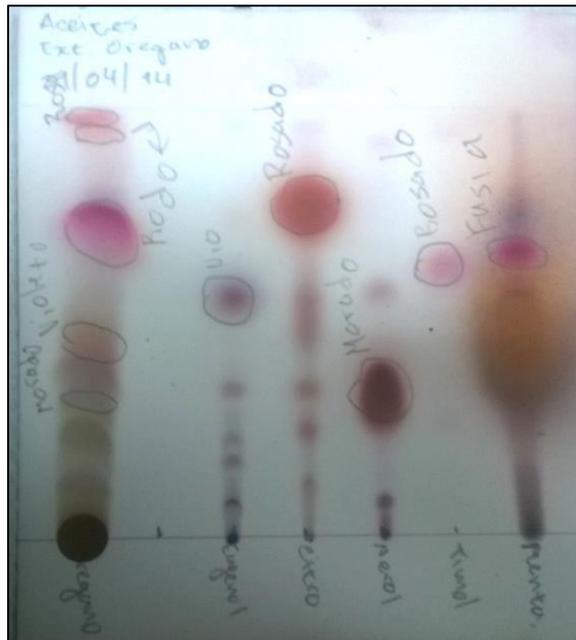


Continuación anexo 4.

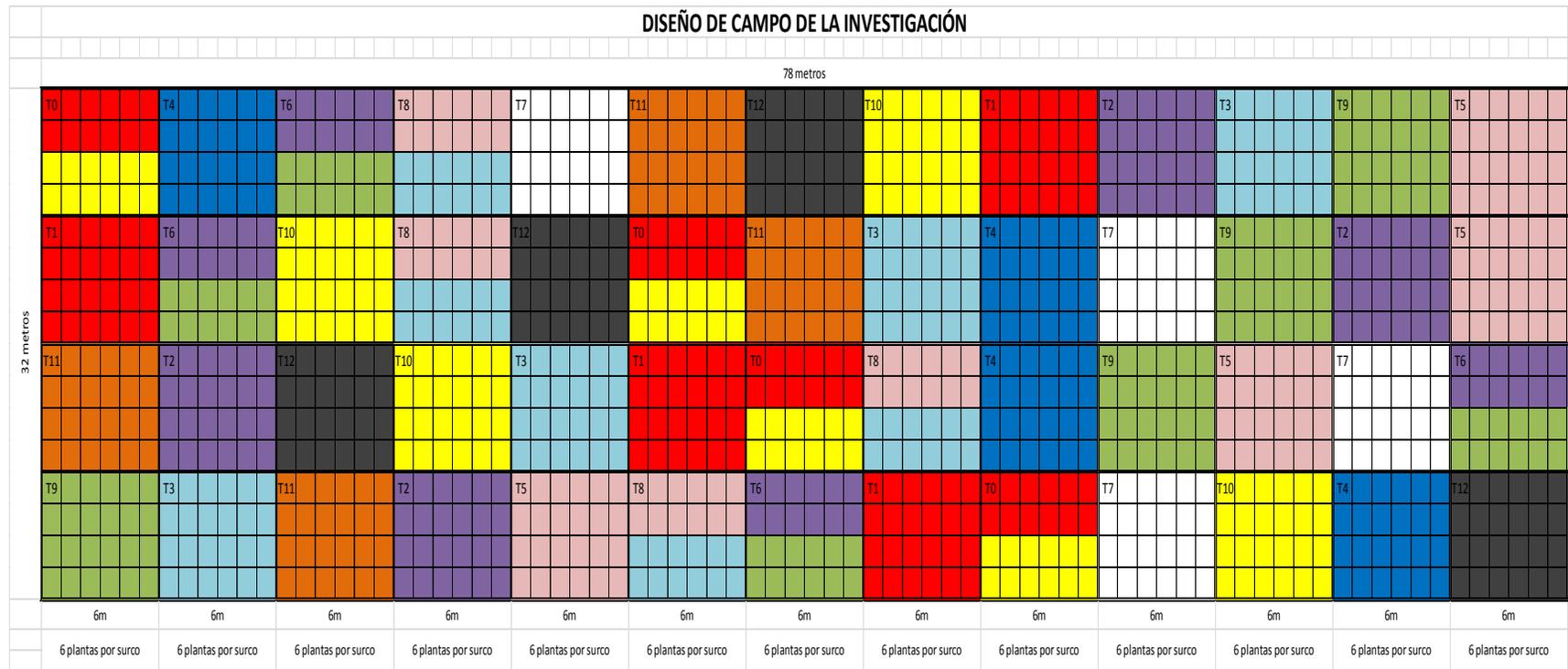
Cromatografía en capa fina de identificación de alcaloides



Cromatografía de capa fina de identificación de aceites esenciales



Anexo 5. Diseño experimental de campo



Fuente: DIGI, 2014.

Anexo 6. Análisis estadístico

ABNER RODAS

1

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	13	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
BLOQUE	4	1 2 3 4

Number of observations 104
ABNER RODAS

2

The GLM Procedure

Dependent Variable: ALTA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	1.15384615	0.04615385	0.46	0.9851
Error	78	7.87500000	0.10096154		
Corrected Total	103	9.02884615			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALTA Mean
0.127796	73.43427	0.317744	0.432692

Continuación anexo 6.

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.49759615	0.04146635	0.41	0.9553
LOCALIDA	1	0.24038462	0.24038462	2.38	0.1269
LOCALIDA*TRAT	12	0.41586538	0.03465545	0.34	0.9781

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.40961538	0.03413462	0.34	0.9795
LOCALIDA	1	0.24038462	0.24038462	2.38	0.1269
LOCALIDA*TRAT	12	0.41586538	0.03465545	0.34	0.9781
ABNER RODAS					

3

The GLM Procedure

Dependent Variable: MEDIA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	0.93750000	0.03750000	0.45	0.9857
Error	78	6.43750000	0.08253205		
Corrected Total	103	7.37500000			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MEDIA Mean
0.127119	76.60905	0.287284	0.375000

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-----------	-------------	---------	--------

Continuación anexo 6.

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.28125000	0.02343750	0.28	0.9903
LOCALIDA	1	0.11778846	0.11778846	1.43	0.2358
LOCALIDA*TRAT	12	0.53846154	0.04487179	0.54	0.8793
TRAT	12	0.57836538	0.04819712	0.58	0.8488
LOCALIDA	1	0.11778846	0.11778846	1.43	0.2358
LOCALIDA*TRAT	12	0.53846154	0.04487179	0.54	0.8793

4

The GLM Procedure

Dependent Variable: BAJA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	1.74759615	0.06990385	0.80	0.7253
Error	78	6.78125000	0.08693910		
Corrected Total	103	8.52884615			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BAJA Mean
0.204904	92.92380	0.294854	0.317308

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
--------	----	-----------	-------------	---------	--------

Continuación anexo 6.

TRAT	12	0.38822115	0.03235176	0.37	0.9696
LOCALIDA	1	0.77884615	0.77884615	8.96	0.0037
LOCALIDA*TRAT	12	0.58052885	0.04837740	0.56	0.8700
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.75096154	0.06258013	0.72	0.7279
LOCALIDA	1	0.77884615	0.77884615	8.96	0.0037
LOCALIDA*TRAT	12	0.580			

ABNER RODAS 2

8

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	13	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
BLOQUE	4	1 2 3 4

Number of observations 104
ABNER RODAS 2

9

The GLM Procedure

Dependent Variable: ALTA

Continuación anexo 6.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	1.90685096	0.07627404	1.58	0.0659
Error	78	3.76562500	0.04827724		
Corrected Total	103	5.67247596			

R-Square Coeff Var Root MSE ALTA Mean
 0.336158 83.85676 0.219721 0.262019

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.43028846	0.03585737	0.74	0.7057
LOCALIDA	1	0.82271635	0.82271635	17.04	<.0001
LOCALIDA*TRAT	12	0.65384615	0.05448718	1.13	0.3499

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.46634615	0.03886218	0.80	0.6443
LOCALIDA	1	0.82271635	0.82271635	17.04	<.0001
LOCALIDA*TRAT	12	0.65384615	0.05448718	1.13	0.3499

ABNER RODAS 2

10

The GLM Procedure

Dependent Variable: MEDIA

Continuación anexo 6.

Source	DF	Squares	Mean Square	Sum of F Value	Pr > F
Model	25	0.96935096	0.03877404	1.27	0.2149
Error	78	2.39062500	0.03064904		
Corrected Total	103	3.35997596			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MEDIA Mean
0.288499	99.76516	0.175069	0.175481

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.27403846	0.02283654	0.75	0.7034
LOCALIDA	1	0.37560096	0.37560096	12.25	0.0008
LOCALIDA*TRAT	12	0.31971154	0.02664263	0.87	0.5807

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.40240385	0.03353365	1.09	0.3770
LOCALIDA	1	0.37560096			

0.37560096	12.25	0.0008					
	LOCALIDA*TRAT		12	0.31971154	0.02664263	0.87	0.5807
				ABNER RODAS 2			

11

The GLM Procedure

Dependent Variable: BAJA

Sum of

Continuación anexo 6.

Source	DF	Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	0.85396635	0.03415865	1.18	0.2882
Error	78	2.26562500	0.02904647		
Corrected Total	103	3.11959135			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BAJA Mean
0.273743	144.6918	0.170430	0.117788

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.23677885	0.01973157	0.68	0.7662
LOCALIDA	1	0.37560096	0.37560096	12.93	0.0006
LOCALIDA*TRAT	12	0.24158654	0.02013221	0.69	0.7533

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.31971154	0.02664263	0.92	0.5341
LOCALIDA	1	0.37560096	0.37560096	12.93	0.0006
LOCALIDA*TRAT	12	0.241			

Continuación anexo 6.

1

ABNER RODAS 3

The GLM Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
TRAT	13	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
BLOQUE	4	1 2 3 4

Number of observations 104
ABNER RODAS 3

2

The GLM Procedure

Dependent Variable: ALTA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	1.12740385	0.04509615	1.59	0.0645
Error	78	2.21875000	0.02844551		
Corrected Total	103	3.34615385			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	ALTA Mean
0.336925	103.1790	0.168658	0.163462

Continuación anexo 6.

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.43990385	0.03665865	1.29	0.2422
LOCALIDA	1	0.11778846	0.11778846	4.14	0.0453
LOCALIDA*TRAT	12	0.56971154	0.04747596	1.67	0.0902

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.60721154	0.05060096	1.78	0.0664
LOCALIDA	1	0.11778846	0.11778846	4.14	0.0453
LOCALIDA*TRAT	12	0.56971154	0.04747596	1.67	0.0902

ABNER RODAS 3

3

The GLM Procedure

Dependent Variable: MEDIA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	1.80288462	0.07211538	1.71	0.0379
Error	78	3.28125000	0.04206731		
Corrected Total	103	5.08413462			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	MEDIA Mean
0.354610	104.0523	0.205103	0.197115

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	1.22475962	0.10206330	2.43	0.0099

Continuación anexo 6.

LOCALIDA	1	0.08653846	0.08653846	2.06	0.1555
LOCALIDA*TRAT	12	0.49158654	0.04096554	0.97	0.4809
Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.77259615	0.06438301	1.53	0.1312
LOCALIDA	1	0.08653846	0.08653846	2.06	0.1555
LOCALIDA*TRAT	12	0.49158654	0.04096554	0.97	0.4809

4

The GLM Procedure

Dependent Variable: BAJA

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	25	1.12319712	0.04492788	2.22	0.0041
Error	78	1.57812500	0.02023237		
Corrected Total	103	2.70132212			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	BAJA Mean
0.415795	137.6095	0.142241	0.103365

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.33413462	0.02784455	1.38	0.1953
LOCALIDA	1	0.37560096	0.37560096	18.56	<.0001
LOCALIDA*TRAT	12	0.41346154	0.03445513	1.70	0.0821

Continuación anexo 6.

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
TRAT	12	0.56634615	0.04719551	2.33	0.0131
LOCALIDA	1	0.37560096	0.37560096	18.56	<.0001
LOCALIDA*TRAT	12	0.41346154	0.03445513	1.70	0.0821

ABNER RODAS 3

5

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for ALTA

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	78
Error Mean Square	0.028446
Critical Value of t	1.99085
Least Significant Difference	0.1679

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRAT
A	0.31250	8	4
A			
B A	0.25000	8	10
B A			
B A C	0.21875	8	0
B A C			

Continuación anexo 6.

B	A	C	0.18750	8	11
B	A	C			
B	A	C	0.18750	8	7
B	A	C			
B	A	C	0.15625	8	9
B	A	C			
B	A	C	0.15625	8	6
B		C			
B		C	0.12500	8	5
B		C			
B		C	0.12500	8	

12

B		C			
B		C	0.12500	8	1
B		C			
B		C	0.12500	8	3
B		C			
B		C	0.09375	8	8
		C			
		C	0.06250	8	2

ABNER RODAS 3

6

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for MEDIA

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	78
Error Mean Square	0.042067
Critical Value of t	1.99085

Continuación anexo 6.

Least Significant Difference 0.2042

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	TRAT
	A	0.4375	8	4
	A			
B	A	0.4063	8	0
B	A			
B	A C	0.2813	8	7
B	C			
B	C	0.2188	8	6
	C			
	C	0.1875	8	11
	C			
	C	0.1875	8	2
	C			
	C	0.1563	8	12
	C			
	C	0.1250	8	1
	C			
	C	0.1250	8	9
	C			
	C	0.1250	8	10
	C			
	C	0.1250	8	8
	C			
	C	0.0938	8	5
	C			
	C	0.0938	8	3
	C			
	ABNER RODAS		3	

Continuación anexo 6.

The GLM Procedure

t Tests (LSD) for BAJA

NOTE: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	78
Error Mean Square	0.020232
Critical Value of t	1.99085
Least Significant Difference	0.1416

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRAT
A	0.21875	8	0
A			
B A	0.18750	8	4
B A			
B A C	0.15625	8	10
B A C			
B A C	0.12500	8	11
B A C			
B A C	0.12500	8	2
B A C			
B A C	0.09375	8	1
B A C			
B A C	0.09375	8	9
B A C			
B A C	0.09375	8	12
B A C			
B A C	0.09375	8	6

Continuación anexo 6.

B	C			
B	C	0.06250	8	3
	C			
	C	0.03125	8	5
	C			
	C	0.03125	8	7
	C			
	C	0.03125	8	8

1 abner ttes aplicacion1 vs aplicacion2

The MEANS Procedure

Analysis Variable : DIFEREN

t Value

ffffff

-4.60

ffffff

1 abner ttes aplicacion1 vs aplicacion3

The MEANS Procedure

Analysis Variable : DIFEREN

t Value

ffffff

-9.46

ffffff

1 abner ttes aplicacion1 vs aplicacion3

Continuación anexo 6.

The MEANS Procedure

Analysis Variable : DIFEREN

t Value
ffffff
-3.47
ffffff

1

abner ttes aplicacion1 vs aplicacion2 parte media

The MEANS Procedure

Analysis Variable : DIFEREN

t Value
ffffff
-6.07
ffffff

1

abner ttes aplicacion1 vs aplicacion2 parte media

The MEANS Procedure

Analysis Variable : DIFEREN

t Value
ffffff
-5.48
ffffff

1

abner ttes aplicacion1 vs aplicacion2 parte media

Continuación anexo 6.

The MEANS Procedure
Analysis Variable : DIFEREN

t Value
ffffff
0.75
ffffff

1

abner ttes aplicacion1 vs aplicacion2 parte baja

The MEANS Procedure
Analysis Variable : DIFEREN

t Value
ffffff
-7.26
ffffff

1

abner ttes aplicacion1 vs aplicacion3 parte baja

The MEANS Procedure
Analysis Variable : DIFEREN

t Value
ffffff
-8.55
ffffff

1

abner ttes aplicacion2 vs aplicacion3 parte baja

The MEANS Procedure
Analysis Variable : DIFEREN

t Value
ffffff
-0.62
ffffff

14. ORDEN DE PAGO

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General Financiera
Departamento de Procesamiento de Datos

INFORME DE EJECUCION MENSUAL

UNIDAD: CENTRO UNIVERSITARIO DE ORIENTE							PROGRAMA: PUI EN RECURSOS NATURALES Y AMBIENTE				
MES: DICIEMBRE 2014		TRANSFERENCIAS			VARIACIONES		FECHA: 08/01/2015		HOJA No.014		
PARTIDA	NOMBRE	APERTURA	AUMENTO	DISMINUCION	AMPLIACION	REDUCCION	ACTUAL	MES	ACUMULADO	%	SALDO
SUBPROGRAMA: EVALUACION Y CARACTERIZACION EXTRACTO BOTANICO SUPERCRITICO											
4.8.24.2.41.0.22	PERSONAL POR CONTRATO	95,788.00					95,788.00		69,241.50	72.29	26,546.50
4.8.24.2.41.0.55	APORTE PARA CLASES PASIVAS	32,357.00					32,357.00				32,357.00
4.8.24.2.41.0.71	AGUINALDO	9,605.00					9,605.00				9,605.00
4.8.24.2.41.0.72	BONIFICACION ANUAL (BONO 14	9,605.00					9,605.00				9,605.00
4.8.24.2.41.0.75	OTRAS EROGACIONES (SUELDO	19,476.00					19,476.00		1,462.84	7.51	18,013.16
4.8.24.2.41.0.76	BONIFICACION MENSUAL USAC	4,812.00	2,888.00				7,700.00				7,700.00
TOTAL GRUPO SERVICIOS PERSONALES		171,643.00	2,888.00	0.00	0.00	0.00	174,531.00	0.00	70,704.34	40.51	103,826.66
4.8.24.2.41.1.63	MANT Y REP EQ MEDICO-SANIT Y DE	0.00	4,464.29				4,464.29		4,464.29	100.0	0.00
TOTAL GRUPO SERVICIOS NO PERSONALES		0.00	4,464.29	0.00	0.00	0.00	4,464.29	0.00	4,464.29	100.0	0.00
4.8.24.2.41.2.61	ELEMENTOS Y COMPUESTOS QUIMICOS	21,260.00		8,915.19			12,344.81		12,344.63	100.0	0.18
4.8.24.2.41.2.62	COMBUSTIBLES Y LUBRICANTES	2,271.00					2,271.00		2,000.00	88.07	271.00
4.8.24.2.41.2.64	INSECTICIDAS, FUMIGANTES Y	0.00	4,450.90				4,450.90		4,450.89	100.0	0.01
4.8.24.2.41.2.69	OTROS PRODUCTOS QUIMICOS Y	3,614.83					3,614.83		3,614.74	100.0	0.09
TOTAL GRUPO MATERIALES Y SUMINISTROS		27,145.83	4,450.90	8,915.19	0.00	0.00	22,681.54	0.00	22,410.26	98.80	271.28
TOTAL PROGRAMA PUI EN RECURSOS NATURALES Y		198,788.83	11,803.19	8,915.19	0.00	0.00	201,676.83	0.00	97,578.89	48.38	104,097.94
TOTAL PLAN PLAN DE INVESTIGACION		198,788.83	11,803.19	8,915.19	0.00	0.00	201,676.83	0.00	97,578.89	48.38	104,097.94
TOTAL PRESUPUESTO		21,813,206.83	3,385,892.83	1,293,854.74	1,540,775.38	0.00	25,446,020.30	73,057.50	16,923,847.62	66.51	8,522,172.68

VI. Lista de todos los integrantes del equipo de investigación

- Contratados por la contraparte y colaboradores
- Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago	
			Si	No
Abner Mardoqueo Rodas Arzét	INVESTIGADOR I	20060144	X	
José Ramiro García Álvarez	INVESTIGADOR I	20040215		X
Geovany Salomón Miranda Villela	INVESTIGADOR I	20140758	X	
Jessica Sylvana Nufio Barillas	AUXILIAR DE INVESTIGACIÓN II	20140759	X	

Nombre	Firma
Abner Mardoqueo Rodas Arzét	
José Ramiro García Álvarez	
Geovany Salomón Miranda Villela	
Jessica Sylvana Nufio Barillas	

Lic. ABNER MARDOQUEO RODAS ARZÉT
Coordinador del proyecto.

Ing. Agr. SAÚL GUERRA
Coordinador PUIRNA – DIGI

Ing. Agr Rufino Salazar
Coordinador General de Programas.