

COMPOSICIÓN NEMATICIDA A BASE DE EXTRACTO DE LÚPULO CON ALTA CONCENTRACIÓN DE BETA ÁCIDOS PARA EL CONTROL FITOPARÁSITOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición nematicida caracterizada porque comprende entre 10% a 80% de un extracto de lúpulo que contiene entre 30% a 60% de beta ácidos; 5% y 20% de un emulsificante y un 5% a 40% de otros excipientes agronómicamente aceptables, la cual ha sido desarrollada para el control de nematodos, específicamente, de nematodos que afectan las raíces de las plantas. En una alternativa de la invención, la composición nematicida comprende adicionalmente extracto de *Bulnesia sp.*, también conocida con el nombre de "Palo santo".

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

Los nematodos son parásitos de la raíz de las plantas. La gran mayoría de los productos existentes actualmente en el mercado son de origen químico, la mayoría de ellos desarrollados entre las décadas de 1960 a 1980, con una tecnología altamente contaminante y residual en los ecosistemas, los suelos y las aguas.

Los conocimientos existentes en el estado de la técnica limitaban los productos nematicidas al uso de compuestos químicos, asociados a la generación de resistencias indeseables, contaminación ambiental, daños en el follaje y el fruto de la planta tratada y deterioro del suelo por eliminación de fauna benéfica. Sumado a

lo anterior, están los riesgos asociados a intoxicaciones de trabajadores rurales, sus familias o los consumidores finales de frutas, hortalizas y ornamentales.

Los inconvenientes reportados para los productos químicos, llevaron a la búsqueda de nuevos nematocidas y entre ellos se desarrollaron productos de control biológico basados en hongos y bacterias, los cuales presentaron problemas al no adaptarse al suelo donde se desea reducir o eliminar la presencia de nematodos.

Específicamente, los productos alternativos elaborados con microorganismos (como: los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Trichoderma harzianum* y *Arthrobotrys oligospora*, y las bacterias *Pasteuria penetrans*, *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. laterosporus* y recientemente *Tsukamurella paurometabola*) son eficaces para el control de la plaga y no presentan los problemas de contaminación ambiental que presentan los productos químicos, sin embargo, su persistencia en el suelo es muy baja y de no encontrar nematodos para atacar en las primeras horas después de su aplicación en campo, los microorganismos mueren si tener la oportunidad de ejercer su acción, por lo que la vida útil de los mismos es muy reducida.

Previo al estudio realizado por el solicitante, los resultados de emplear extractos vegetales o animales contra nematodos no habían sido prometedores y los pocos extractos que habían mostrado actividad nematocida tenían una solubilidad muy limitada y presentan inconvenientes para llegar y permanecer en los sitios que requieren protección (en la raíz).

Entre los extractos prometedores en el campo de control biológico se encuentra el extracto de lúpulo, el cual ha sido utilizado de forma independiente y junto con

otros extractos, como son los extractos de *Lamiaceae* y con compuestos con actividad biocida, como xantohumol, como biocida para proteger los cultivos contra bacterias y hongos, principalmente y como acaricida o contra otro tipo de insectos.

Entre los documentos que hacen alusión a este extracto se encuentra el documento EP2601841, que es el único que hace alusión a las propiedades de los extractos de lúpulo contra nematodos, pero ella hace alusión a extractos que comprenden alfa y beta ácidos. Sin embargo, la eficacia de estos extractos no es la ideal y en ella se guarda silencio sobre los problemas de estabilidad que pueden existir cuando de aumenta la concentración de beta-ácidos.

Por su parte, los documentos US2005043404, US2002051804 y US2005220914 se refieren a composiciones con una mayor concentración de beta-ácidos para tratar ácaros y hongos, ninguno hace mención a tratar nematodos, y aunque reconocen su problema de estabilidad de estos compuestos, su solución no permite llegar a altos niveles de este compuesto.

Es así como la solicitud US2005043404 trata sobre un pesticida orgánico o fungicida, específicamente sobre un método para controlar ácaros, a partir de componentes de extracto de lúpulo mediante la preparación de emulsiones acuosas estables de ácidos de lúpulo y otros componentes extracto de lúpulo. Según este documento, los ácidos de lúpulo, específicamente los beta-ácidos y otros componentes extracto de lúpulo se suspenden como preparaciones estables, coloidal en agua, que se pueden esparcir sobre las plantas para el control de plagas. La solución propuesta es la aplicación de una solución que comprende al menos 1,0% de concentración de beta-ácidos, como una emulsión que incluye jabón o detergente en una cantidad suficiente para reducir la película en la solución de tratamiento. Adicionalmente, la descripción establece que para

producir las emulsiones de beta-ácidos se empleó 0,4% de Ninol emulsificante, el cual es un surfactante basado en amidas.

El documento US2002051804 se relaciona con tratamientos pesticidas basados en los componentes de extracto de lúpulo mediante la preparación de emulsiones acuosas estables de ácidos de lúpulo y otros componentes del extracto de lúpulo. Los ácidos de lúpulo y otros componentes extracto de lúpulo se suspenden como composiciones estables, coloidales en agua, que se pueden rociar directamente sobre las plantas para el control de plagas. La descripción establece que para producir las emulsiones de ácidos se tuvo en cuenta una apropiada concentración y un adecuado pH. Incluso, la solicitud plantea la adición de un jabón líquido en una baja concentración aproximadamente 0,5%.

Así mismo, la solicitud US2005220914 reporta pesticidas orgánicos elaborados a partir de los componentes de extracto de lúpulo mediante la preparación de emulsiones acuosas estables de ácidos de lúpulo y otros componentes del extracto de lúpulo. Los ácidos de lúpulo y otros componentes extracto de lúpulo se suspenden como composiciones estables, coloidales en agua, que se pueden rociar directamente sobre las plantas para el control de plagas. La descripción establece que para producir las emulsiones de betaácidos se empleó 0,4% de surfactante basado en amidas.

Adicional a las solicitudes ya mencionadas, la patente US8142820 (B2) proporciona métodos y composiciones para controlar una infestación de hongos o insectos. Para ello propone una composición que comprende extracto de lúpulo que máximo comprende 15% de beta ácidos y hace alusión en las reivindicaciones a alfa-ácidos, isoalfaácidos y betaácidos de manera indiscriminada.

Partiendo de la información anterior, el solicitante planteó un estudio encaminado a desarrollar una formulación de origen natural, que fuera eficiente en el tratamiento de nematodos, que solubilizara fácilmente, aun cuando la concentración de beta ácidos supere el 30% en la composición y que se mantuviera estable, al tiempo que asegura que la misma llegue a la raíz, exhibiendo actividad nematicida.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La solución desarrollada por el solicitante consiste en una composición nematicida se caracterizada porque comprende entre 10% a 80% de un extracto de *Humulus* sp, conocido como extracto de lúpulo, que contiene entre 30% a 60% de beta ácidos, el solicitante ha establecido que los beta-ácidos en alta concentración tiene mayor actividad sobre nematodos que otras fracciones de la misma planta, junto con una cantidad entre 5% y 20% de un emulsificante y entre 5% a 40% de otros excipientes agronómicamente aceptables.

En una modalidad preferida de la invención, el emulsificante es polioxietileno sorbitan trioleato (Tween), seleccionado del grupo que consiste de Tween 20, Tween 80 y Tween 85, o surfactantes catiónicos, aniónicos y no iónicos o combinaciones de ellos.

En una alternativa de la invención, la composición nematicida también comprende un extracto de *Bulnesia* sp., el cual está presente en una rata de extracto o aceite esencial de *Bulnesia* sp y extracto de *Humulus* sp de 20:1 a 1:20. Preferiblemente, dicho extracto comprende guaiol, bulnesol, hanamol, o combinaciones de los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Muestra la estructura química de alfa ácidos (A), beta ácidos (B) y hexahidro-iso-alpha ácidos (c), los cuales son compuestos que están presentes en los extractos de *Humulus sp.*, tal como *Humulus lupulus*.

Figura 2. Porcentaje de afección de huevos por ECO010, hidrolato de ajeno, ocho días post aplicación

Figura 3. Porcentaje de afección de huevos por el extracto de ECO064, rico en betaácidos, ocho días post aplicación

Figura 4. Porcentaje de afección de huevos por ECO065, con preponderancia de alfa ácidos, ocho días post aplicación

Figura 5. Porcentaje de mortalidad de individuos J2 por ECO010, hidrolato de ajeno, ocho días post aplicación

Figura 6. Porcentaje de mortalidad de individuos J2 por ECO064, rico en betaácidos, ocho días post aplicación

Figura 7. Porcentaje de mortalidad de individuos J2 por ECO065, con preponderancia de alfa ácidos, ocho días post aplicación

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una composición nematocida caracterizada porque comprende entre 10% a 80% de un extracto de lúpulo que contiene entre 30% a 60% de beta ácidos; 5% y 20% de un emulsificante y un 5% a 40% de otros excipientes agronómicamente aceptables.

En una modalidad preferida de la invención, el emulsificante se polioxietileno sorbitan trioleato (Tween), seleccionado del grupo que comprende consiste de Tween 20, Tween 80 y Tween 85, o surfactantes catiónicos, aniónicos y no iónicos o combinaciones de ellos. Preferiblemente, el surfactante es Tween 20, Tween 80 y Tween 85, para mantener la estabilidad y la fácil solubilidad de los beta ácidos al tiempo que permite cumplir con parámetros de uso para agricultura orgánica.

La composición aquí divulgada puede comprender excipientes agronómicamente aceptables y ya conocidos en el estado de la técnica y puede ser formulado como polvo o como solución. Los excipientes que hace parte de la presente invención incluyen: goma de acacia, goma de acacia modificada con anhídrido succínico de ocetenil, monoglicéridos acetilados, ésteres de mono y di-glicéridos de ácido tartárico acetilado, agar, alginato de amonio, carragenano de amonio, furcellaran de amonio, sal de amonio de glicérido fosforilado, arabino-galactano, glicano de levadura de panadero, alginato de calcio, carbonato de calcio, carragenano de calcio, citrato de calcio, furcellaran de calcio, gluconato de calcio, glicerofosfato de calcio, calcio hipofosfito, lignosulfonato de calcio, fosfato de calcio, sulfato de calcio, tartrato de calcio, carboximetilcelulosa, goma de algarroba, carragenano, goma de celulosa, ésteres de ácido cítrico de mono- y di-glicéridos, furcellaran, gelatina, goma de gelano, goma de guar, goma arábiga, lecitina hidroxilada, hidroxipropilcelulosa, gelosa de musgo irlandés, goma de karaya, mono- y di-glicéridos lactilados, ésteres de ácidos grasos lactílicos, lecitina, goma de algarrobo, cloruro de magnesio, metilcelulosa, metil etilcelulosa, monoglicéridos,

Mono- y di-glicéridos, sales monosódicas de mono- y diglicéridos fosforilados, goma de avena, pectina, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos de ricino interesterificados, polioxietileno, monooleato de sorbitán, polioxietileno, monoestearato de sorbitán, polioxietileno, alginato potásico, carragenano potásico, cloruro de potasio, citrato de potasio, furcellaran de potasio, fosfato de potasio (dibásico), propilenglicerol alginato, propilenglicol éter de metilcelulosa, propilenglicol mono ésteres de ácidos grasos, pirofosfato de ácido sódico, alginato sódico, fosfato sódico de aluminio, carboximetilcelulosa sódica, carragenano sódico, glicolato de celulosa, cloruro de sodio, citrato de sodio, furcellaran de sodio, gluconato de sodio, hexametáfosfato de sodio, fosfato sódico (dibásico), fosfato sódico (monobásico), fosfato sódico (tribásico), tartrato sódico potásico, pirofosfato sódico (tetraabásico), estearoil-2-lactilato sódico, estearato sódico, tartrato sódico, tripolifosfato sódico, monoestearato de sorbitán, sorbitán trioleato, triestearato de sorbitán, citrato de estearil monogliceridilo, ésteres de sacarosa de ácidos grasos, goma de tragacanto, goma de xantano, silicato de calcio, ortosilicato de calcio de belita, entre otros.

Preferiblemente, entre los excipientes agronómicamente aceptables, la composición comprende un vehículo oleoso, tal como aceite de canola, aceite de castor, aceite de soya, aceite de girasol, aceite mineral, ésteres de ácidos grasos de cadena larga, aceite de ajonjolí y combinaciones de ellos, un solvente seleccionado del grupo que consiste de etanol, isopropanol, butanol, glicerol, metanol, lactato de etilo o sus combinaciones, y un adherente tal como carboximetil celulosa, gomas, almidones, glicerina o sus combinaciones.

En algunos aspectos, las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en forma de un sólido. En algunos aspectos, la forma sólida comprende, por ejemplo, formulaciones en polvo, pellet o gránulo. En algunos

aspectos, las formulaciones de polvo, gránulos o gránulos son dispersables. En algunos aspectos, las formulaciones dispersables en polvo, pellet o gránulos son dispersables en agua. En algunos aspectos, la formulación en forma sólida es, por ejemplo, un gránulo, un pellet, un polvo, un gránulo seco, un polvo, una formulación nanoencapsulada, una formulación microencapsulada o una combinación de los mismos.

En algunos aspectos, las composiciones descritas en el presente documento pueden formularse en un líquido formar. En algunos aspectos, la forma líquida es, por ejemplo, una formulación de concentrado líquido, un concentrado emulsionable, una emulsión, una suspensión, un líquido fluido, un gel, una formulación concentrada listo para usar, una dispersión en aceite, una formulación en aerosol, o combinaciones de los mismos. En algunos aspectos de la presente invención el concentrado líquido es una formulación de concentrado de muy bajo volumen. En algunos aspectos, las formulaciones líquidas descritas en la presente memoria son concentrados emulsionables (EC), emulsiones en agua (EW), o dispersiones de aceite (OD).

Los términos "*Bulnesia sp.*" y "*Humulus sp.*" se refieren a cualquier planta que pertenezca al género *Bulnesia* (ejemplo, *Bulnesia sarmientoi*) o al género *Humulus* (ejemplo, *Humulus lupulus*), respectivamente.

La frase "*extracto de planta de Humulus sp.*" o "*extracto de Humulus sp.*" es usado para referirse a un extracto de planta que comprende sustancias biológicamente activas (nematicidas o con otras actividades biológicas) obtenidas a partir de plantas que pertenecen al género *Humulus sp.*, usando cualquier método de extracción conocidos en el estado de la técnica.

La frase “*extracto de planta de Bulnesia sp*” es usado para referirse a un extracto de planta que comprende sustancias biológicamente activas (nematicidas o con otras actividades biológicas) obtenidas a partir de plantas que pertenecen al género *Bulnesia sp*, usando cualquier método de extracción conocidos en el estado de la técnica.

El término “extracto” o “extracto de planta” es usado para referirse a un extracto o concentrado obtenido de cualquier parte de la planta, por ejemplo: semillas, hojas, frutos, tallos, corteza, raíces o partes de los mismos (por ejemplo, cáscaras de semillas, cáscaras de frutas, etc.), o combinaciones de los mismos, y contiene una cantidad apreciable en peso de una sustancia biológicamente activa (por ejemplo, una sustancia con actividad nematicida u otra actividad biológica).

El término “alfa ácidos” como se usa en la presente solicitud, se refiere a una clase de compuestos químicos encontrados principalmente en las glándulas de resina de las flores o brotes (conos de lúpulo) de la planta de lúpulo (*Humulus sp.*). Los ácidos alfa son la fuente de la amargura del lúpulo. Los ácidos alfa comunes incluyen humulona, adhumulona, cohumulona, posthumulona, y prehumulona. La fórmula de estos compuestos puede ser vista en la Figura 1.

El término “*iso alfa-ácidos*” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una clase de compuestos químicos derivados de los ácidos alfa que se encuentran principalmente en las glándulas de resina de las flores o brotes (conos de lúpulo) de la planta de lúpulo (*Humulus sp.*). Los isoalfa-ácidos se generan por la isomerización de ácidos alfa presentes en el lúpulo, como resultado de la aplicación de calor en solución. El grado de isomerización depende en gran medida de la duración del tiempo que el lúpulo está sometido a altas temperaturas. Más los tiempos de ebullición resultarán en la isomerización de más

de los alfa-ácidos disponibles. Los más comunes iso-alfa-ácidos son cis- y trans-isohumulona. La fórmula de estos compuestos puede ser vista en la Figura 1.

Finalmente, los beta ácidos pueden ser colupulona, lupulona, o adlupulona, sus respectivos iso beta ácidos o combinaciones de ellos. La fórmula de estos compuestos puede ser vista en la Figura 1.

En una alternativa de la invención, la composición nematicida también comprende un extracto de *Bulnesia sp.*, donde el extracto de la planta *Bulnesia sp* actúa sinérgicamente como nematicida. Dicho extracto de la planta *Bulnesia sp* está presente en una relación de extracto o aceite esencial de *Bulnesia sp* y extracto de *Humulus sp* de 20:1 a 1:20.

Preferiblemente, dicho extracto comprende guaiol, bulnesol, hanamol, o combinaciones de los mismos. Incluso, el extracto de la planta *Bulnesia sp.* comprende además α -guaieno, β -cariofileno, β -guaieno, guaioxido, α -bulneseno, elemol, germacreno-B, eudesm-5-en-11-ol, B-eudesmol, 10-epi- γ -eudesmol, γ -eudesmol, α -eudesmol, 7-epi- α -eudesmol, o combinaciones de los mismos.

Así mismo, es parte de la invención un método para controlar nematodos que comprende, establecer las condiciones en las cuales se realizará el tratamiento teniendo en cuenta el cultivo, el estado de desarrollo, la extensión del área y la humedad del suelo, preparar la mezcla de tratamiento, disolviendo de 0,1 g a 20 g de una composición nematicida que comprende entre 10% a 80% de un extracto de lúpulo que contiene entre 30% a 60% de beta ácidos; 5% y 20% de un emulsificante y un 5% a 40% de otros excipientes agronómicamente aceptables por litro de agua, verter la solución en el equipo mediante el cual se realizará el tratamiento y distribuir uniformemente el volumen preparado para el tratamiento en

el suelo, alrededor de las plantas a tratar, garantizando que se humedezca el suelo hasta una profundidad de 10 cm a 50 cm.

Igualmente, es parte de la invención un método para controlar nematodos definido anteriormente, donde la composición aplicada comprende además extracto *Bulnesia sp.*, en una relación de extracto o aceite esencial de *Bulnesia sp* y extracto de *Humulus sp* de 20:1 a 1:20.

En otra alternativa, el método para controlar nematodos definido anteriormente, que comprende además la aplicación independiente de 0,1 g y 20 g de un extracto *Bulnesia sp.* por litro de agua.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos y no limitativos, de los productos y métodos descritos en este documento. Las modificaciones adecuadas y adaptaciones de la variedad de condiciones, formulaciones y otros parámetros que se encuentran normalmente en el campo y que son evidentes para los expertos en la técnica a la vista de esta descripción están dentro del espíritu y alcance de la invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. EFECTO DE TRES EXTRACTOS VEGETALES SOBRE NEMATODOS

(Meloidogyne sp.)

OBJETIVO: Evaluar *in vitro* el efecto de tres extractos vegetales sobre nematodos del género *Meloidogyne sp*

METODOLOGÍA:

- **Obtención de huevos de *Meloidogyne sp* de raíces infectadas:**

Las raíces con signos visibles de infección por nematodos (nodulaciones) se lavaron con abundante agua para retirar el exceso de suelo y son cortadas finamente con tijera, posteriormente, se depositaron en el interior de un recipiente de vidrio con tapa el cual contenía NaOCl al 1%. Esta mezcla fue agitada vigorosamente por 5 minutos, después de transcurrido este tiempo las raíces fueron coladas y la muestra se recogió en un recipiente limpio para después hacerlo pasar por un tamiz de 500 mesh, el cual fue lavado sucesivamente con agua con el fin de recoger la muestra de huevos que quedaron adheridos al tamiz.

- **Inoculación de Extractos sobre huevos de *Meloidogyne sp*.**

Extractos vegetales:

ECO 010: Hidrolato de ajeno.

ECO 064: Fracción de extracto de lúpulo con alta concentración de beta ácidos,
Beta-acids: $45 \pm 1.5\%$ (w/w) por HPLC

ECO 065: Fracción de extracto de lúpulo con alta concentración de alfa ácidos,
Iso-alpha-acids: $> 86\%$, Alpha-acids: $< 1.0 \%$ y Beta-acids: $< 0.4\%$.

Dosis evaluadas: 0,625g/L- 1,25g/L- 2,5g/L- 5g/L- 10g/L

- En cajas de Petri se deposita 1 ml de solución de huevos con una cantidad conocida de individuos, posteriormente se le adiciona 4 ml de solución de

extracto vegetal o producto preparado previamente según las dosis recomendadas.

- El volumen final de trabajo es de 5ml, en el cual se conserva la dosis establecida por los fabricantes.

- **Obtención de J2 de *Meloidogyne* sp:**

Los J2 de *Meloidogyne* sp. son obtenidas a partir de la incubación en agua de huevos extraídas de raíces infectadas, por un periodo de 7 días. Posterior a ello, se determinó la cantidad de individuos/mL visualizando una muestra en microscopio invertido.

- **Inoculación de Extractos sobre J2 de *Meloidogyne* sp.**

Extractos vegetales ECO 010, ECO 064, ECO 065

Dosis evaluadas: 1,25g/L- 2,5g/L- 5g/L- 10g/L.

- En cajas de Petri se deposita 1 ml de solución de J2 con una cantidad conocida de individuos, posteriormente se le adiciona 4 ml de solución de extracto vegetal o producto preparado previamente según las dosis recomendadas.
- El volumen final de trabajo es de 5ml, en el cual se conserva la dosis establecida por los fabricantes.

- **Análisis estadístico**

Se empleó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado de efecto fijo balanceado. El número de repeticiones por tratamiento fue de cuatro y la unidad experimental fue la caja de Petri. La variable respuesta para el efecto en huevos fue cantidad de huevos afectados (defectuosos o con daño en su morfología) y la variable respuesta para el efecto en J2, fue mortalidad en un total de 50 individuos, 8 días después de aplicados los tratamientos.

Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando ANOVAS y la prueba estadística de Tukey, con un nivel de confianza del 95% ($P= 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico R 3.0.3. Nota: Dado la naturaleza de los experimentos, los análisis estadísticos (comparaciones múltiples) se realizaron a cada dosis de cada uno de los extractos con su respectivo control.

RESULTADOS

- **Efecto de Extractos sobre huevos de *Meloidogyne sp.***

El extracto ECO010 sólo presentó diferencias significativas con el control a una dosis de 10cc/l con un porcentaje de control de 34.5%, las demás dosis evaluadas no presentaron efecto sobre huevos. (Figura 2).

Las dosis de 1,25g/L 2,5g/L 5g/L y 10g/L de ECO064 afectaron el desarrollo de huevos, dadas las diferencias estadísticamente significativas con su respectivo control. El porcentaje de afección más alto se presentó en la dosis de 10g/L con un 89%, seguido por un 83% en la dosis de 5g/l. Las dosis de 1,25g/L y 2,5g/L presentaron un porcentaje de afección de 41,5% y 33% respectivamente. A pesar

de tener una afección de 34,2%, la dosis de 0,625 no presentó diferencias estadísticamente significativas con su respectivo control. (Figura 3).

Tabla 1. Medias de cantidad de huevos afectados por ECO 064 ocho días post aplicación. Letras diferentes muestran diferencias significativas (p<0,05) en los tratamientos según la prueba de Tukey.

Extracto	Tratamiento/Dosis	Cantidad de huevos afectados
ECO064	Control	9,00 ± 1,15 a
	0,625g/L	10,25 ± 2,06 a
	Control	9,0 ± 1,15 b
	1,25g/L	12,5 ± 2,38 a
	Control	7,0 ± 2,38 b
	2,5g/L	17,12 ± 4,15 a
	Control	3,5 ± 0,28 b
	5g/L	41,5± 1,70 a
	Control	3,75 ± 0,85 a
	10g/L	44,5 ± 1,19 b

El extracto ECO065, tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre huevos en las dosis de 2,5g/L, 5g/L y 10g/L, cuando se compararon con su respectico control. Sin embargo, los porcentajes de control no fueron lo suficientemente altos y estuvieron entre 46,5%, 41,5% y 32% respectivamente. (Figura 4).

Tabla 2. Medias de cantidad de huevos afectados por ECO 065 ocho días post aplicación. Letras diferentes muestran diferencias significativas (p<0,05) en los tratamientos según la prueba de Tukey.

Extracto	Tratamiento/Dosis	Cantidad de huevos afectados
ECO065	Control	9,0 ± 0,57 a
	0,625g/L	12,0 ± 2,04 a
	Control	9,75 ± 0,62 a
	1,25g/L	12,0 ± 0,70 a
	Control	7,0 ± 1,19 b
	2,5g/L	15,1 ± 0,51 a
	Control	3,5 ± 0,28 b
	5g/L	22,2 ± 0,85 a
	Control	3,75 ± 0,85 b
	10g/L	46,75 ± 0,94 a

Efecto de Extractos sobre J2 de *Meloidogyne sp.*

Según los análisis, las dosis de 1,25cc/L, 2,5cc/L y 5cc/L de ECO010 afectaron los individuos J2 de nematodos al ser comparados con su respectivo control. El porcentaje de mortalidad más alto, se presentó en la dosis de 2,5cc/L con un 42%, no muy distante de la dosis de 5cc/L que ocasionó mortalidad en un 38% (Figura 5). Es importante mencionar, que, aunque en la dosis de 10cc/L se observó mortalidad del 40% esta no fue estadísticamente significativa al compararse con su respectivo control, comportamiento al cual no se le encontró respuesta biológica.

Al comparar estadísticamente ECO064 en las diferentes dosis evaluadas con su respectivo control, se observa un porcentaje de mortalidad de 100% en todas las dosis, demostrando alta efectividad del producto para el control de J2, por las diferencias estadísticamente significativas evidenciadas en los análisis. (Figura 6).

Tabla 5. Medias de cantidad de J2 afectados por ECO 064 ocho días post aplicación. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p<0,05$) en los tratamientos según la prueba de Tukey.

Extracto	Tratamiento/Dosis	Cantidad de individuos muertos
ECO064	Control	3,25 ± 1,25 b
	1,25g/L	49,75 ± 0,50 a
	Control	16,75± 0,75 b
	2,5g/L	49,5 ± 0,28 a
	Control	16,75 ± 0,75 b
	5g/L	49,75 ±0,25 a
	Control	9,25 ± 0,47 b
	10g/L	19, 00 ±1,8 a

Ahora bien, todas las dosis evaluadas para el extracto ECO065 presentaron diferencias estadísticamente significativas con el control. Los mejores porcentajes de control se presentaron en las dosis de 10g/L 5g/L y 2,5g/L con un 100%, 93% y 100% respectivamente (Gráfica 7).

Tabla 6. Medias de cantidad de huevos afectados por ECO 065 ocho días post aplicación. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($p<0,05$) en los tratamientos según la prueba de Tukey.

Extracto	Tratamiento/Dosis	Cantidad de individuos muertos
ECO065	Control	3,25 ±0,62 b
	1,25g/L	29,25 ± 1,93 a
	Control	1,25 ± 0,62 b
	2,5g/L	9,25 ± 1,1 a
	Control	7,0 ± 2,04 b
	5g/L	46,5 ± 0,64 a
	Control	9,25 ± 0,47 b
	10g/L	25,75 ± 1,6 a

CONCLUSIÓN.

Después de evaluar *in vitro* el efecto de extractos vegetales sobre huevos y Juveniles 2 (J2) de nematodos, con las metodologías propuestas en este trabajo, se concluye que el extracto ECO064, con alta concentración de beta-ácidos, alcanzó un porcentaje de control en huevos mayor al 80% en las dosis de 10cc/L y 5cc/L y un control de J2 de 100% en todas las dosis evaluadas, **lo que lo perfila como el mejor extracto para control de nematodos.**

ECO065 presento porcentajes de afección de huevos en las dosis de 10cc/L y 5cc/L menores al 50% (46,5 y 41,5% respectivamente) y un control de mayor al 90% en las dosis de 10cc/L, 5cc/L y 2,5/L.

ECO010 aunque en algunos tratamientos presentó diferencias estadísticamente significativas con el control no alcanzó a tener porcentajes de efectividad mayores al 50% en huevos y J2.