



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL EXTRACTO DE LA CÁSCARA
DE *MUSA PARADISIACA* SOBRE AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN
DE CORONA Y OTROS HONGOS POSCOSECHA EN LA PROVINCIA DEL
GUAYAS, ECUADOR.

Trabajo de Titulación en conformidad con los requisitos establecidos para optar
por el Título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía

Ing. María Raquel Meléndez Jácome M. Sc.

Autora

Vanessa Andrea Rivera Cárdenas

Año

2016

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

María Raquel Meléndez Jácome
Ingeniera Agrónoma M. Sc
CI.:1709384067

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Vanessa Andrea Rivera Cárdenas

CI.:1725841918

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Jehová de los ejércitos, por siempre pelear mis batallas. Gracias a mi papi por su esfuerzo y trabajo incondicional. Agradezco a mi mami y a mi ñaño por ser un apoyo en mi vida. A mi amor por su ayuda idónea y por empujarme a dar lo mejor de mí en cada situación.

Agradezco a la Ing. Raquel, al Ing. Javier Lazo, Gerente general de la empresa Uurú, al Doctor Jorge Heredia, a los doctores Haissam Jijakli y Olivier Parisi.

DEDICATORIA

A mi mami por siempre estar conmigo y tener una palabra de aliento en mis momentos difíciles. Te quiero mucho mamita.

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el propósito de evaluar el efecto biológico de la cáscara de *Musa paradisiaca* variedad Cavendish sobre hongos fitopatógenos poscosecha de manera *in vitro* e *in vivo*, como una alternativa de uso de los desechos de banano para transformarlos en un fungicida orgánico para su aplicación en poscosecha. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran el potencial fungicida de varios extractos obtenidos de la cáscara de banano. Estos extractos fueron obtenidos de la cáscara verde de banano, mediante la utilización de solventes polares y probados sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*. El tratamiento que mostró mayor efectividad para el control de *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum* fue el extracto acuoso-a; el cual inhibió a los hongos mencionados anteriormente en un 21,31%, 55,07% y 54,68% respectivamente. Además, se comprobó la efectividad del extracto acuoso-a sobre el avance de la severidad de la pudrición de corona en varias manos de banano. Los resultados mostraron que el extracto acuoso-a redujo en un 86,79% los síntomas de la pudrición de corona hasta los 14 días, mientras que el fungicida tradicional lo redujo en un 83,3% en el mismo lapso de tiempo. Esta inhibición de la severidad de la enfermedad se atribuyó a la presencia de taninos, cuya presencia se corroboró mediante técnicas cualitativas colorimétricas.

ABSTRACT

This work was done with the purpose of evaluating the biological effect of banana fruit extracts obtained from the banana skin over postharvest fungal pathogens *in vitro* and *in vivo* as an alternative of using the wastes of exportation bananas and transforming this raw material in organic fungicide for postharvest applications. The results obtained in this study show the antifungal effectiveness of aqueous and organic extracts. These extracts were obtained from unripened banana skin with polar chemical solvents. The most effective treatment against *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* was the aqueous extract, which inhibited the fungi mentioned above in 21.31%, 55.07% and 54.68% respectively. Furthermore, the aqueous extract was evaluated on several clusters that had the symptoms of crown rot. The results showed that the aqueous-a extract reduced the incidence of crown rot (86,79%) even 14 days after the harvest, in comparison with traditional fungicide that reduced the symptoms in 83.3%. The severity inhibition of the disease was attributed to the tannins effect over *Colletotrichum musae* dissemination and growth. The compounds presence was confirmed by qualitative colorimetric techniques.

ÍNDICE

Introducción	1
1. Marco teórico.....	4
1.1. Generalidades del cultivo de banano (<i>Musa Paradisiaca</i>) ...	4
1.1.1. Origen, distribución, características y evolución del cultivo de banano.....	4
1.1.2. Importancia del banano en Ecuador y en el mundo	5
1.1.3. Variedades de Banano comercial de importancia en el Ecuador.....	7
1.2. Químico taxonomía de la cáscara de banano.....	8
1.2.1. Características de la cáscara de banano verde.....	8
1.3. Pesticidas biológicos a base de extractos vegetales usados en diferentes microorganismos.....	10
1.3.1. Modo de acción de los pesticidas.....	10
1.3.2. Antifúngicos obtenidos de plantas de la división Magnoliophyta.....	10
1.3.3. Antifúngicos extraídos de plantas de la Clase Liliopsida y el orden Zingiberales	11
1.3.4. Compuestos antibacterianos de la Familia <i>Musaceae</i> , Género <i>Musa</i> y especie <i>Musa paradisiaca</i> , variedad Cavendish.....	12
1.4. Enfermedades y agentes causales de frutos en poscosecha.....	12
1.4.1. Morfología y estructura de hongos de importancia en poscosecha.....	12
1.4.2. Moho verde de los cítricos: <i>Penicillium digitatum</i>	14
1.4.3. Podredumbre gris: <i>Botrytis cinerea</i>	16
1.4.4. Pudrición de corona.....	17
1.4.4.1. <i>Colletotrichum musae</i> : Agente causal de la pudrición de corona.....	18

2. Objetivos.....	20
2.1. Objetivo General	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. Metodología	21
3.1. Materiales y métodos	21
3.1.1. Recolección, aislamiento y purificación de microorganismos ..	21
3.1.2. Obtención de extractos.....	22
3.1.2.1. Procesos de extracción caliente de compuestos activos de cáscara de banano verde cosechado en madurez fisiológica ...	22
3.1.2.2. Procesos de extracción fría de compuestos activos presentes en la cáscara de banano verde cosechado en madurez fisiológica.....	24
3.1.2.3. Proceso de extracción caliente de compuestos activos de la cáscara de banano maduro	25
3.1.3. Evaluación del efecto biológico de los extractos de cáscara de banano verde sobre <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	27
3.1.3.1. Determinación del crecimiento de las cepas fúngicas in vitro ...	27
3.1.3.2. Evaluación in vitro del efecto biológico de los extractos de cáscara de banano verde sobre <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	28
3.1.4. Evaluación del efecto biológico del extracto acuoso obtenido a partir de una extracción caliente sobre pudrición de corona.....	32
3.1.5. Determinación de la presencia de compuestos con principios activos en los extractos obtenidos de la cáscara de banano.....	35
4. Resultados y Discusión	37
4.1. Determinación de la presencia de metabolitos secundarios	37

4.2. Evaluación del rendimiento de los extractos obtenidos a partir de la cáscara de banano cv. Cavendish	38
4.3. Evaluación económica de los extractos obtenidos a partir de cáscara de banano verde	39
4.4. Identificación de <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	41
4.5. Evaluación del efecto del solvente sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	42
4.6. Evaluación del efecto biológico in vitro de los extractos obtenidos de cáscara de banano verde sobre <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	44
4.6.1. <i>Colletotrichum musae</i>	44
4.6.2. <i>Botrytis cinérea</i>	47
4.6.3. <i>Penicillium digitatum</i>	51
4.6.4. Porcentaje de inhibición del extracto obtenido de banano en madurez comercial sobre <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	54
4.7. Evaluación del efecto biológico in vivo del extracto acuoso-a sobre <i>Colletotrichum musae</i>	55
5. Conclusiones y Recomendaciones.....	62
5.1 CONCLUSIONES	62
5.2 Recomendaciones	64
6. REFERENCIAS	66
7. ANEXOS	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productores de banano a nivel mundial (Toneladas métricas)	5
Tabla 2. Principales destinos de la exportación bananera ecuatoriana (Toneladas métricas)	6
Tabla 3. Descripción botánica de la variedad Cavendish	7
Tabla 4. Composición bromatológica del banano verde. (Velásquez, 2004)	9
Tabla 5. Clasificación taxonómica de hongos poscosecha, agentes causales de enfermedades de cítricos, rosáceas y musáceas	14
Tabla 6. Pruebas fitoquímicas para determinación presencia de metabolitos secundarios (Castro, 2008; Velásquez, 2004)	36
Tabla 7. Determinación de la presencia de sustancias fenólicas en extractos de cáscara banano verde y maduro variedad Cavendish ..	37
Tabla 8. Rendimiento y características físicas (descriptivas) de los extractos obtenidos de la cáscara verde de banano	39
Tabla 9. Costo de producción por gramo de cada extracto	40
Tabla 10. ANOVA para análisis de varianza para <i>Colletotrichum musae</i> para el extracto acuoso-a (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3, 13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) µg/ml, el solvente, el fungicida y el natural	46
Tabla 11. ANOVA para análisis de varianza para <i>Botrytis cinerea</i> para el extracto acuoso-a (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) µg/ml, el solvente, el fungicida y el natural.	49
Tabla 12. ANOVA para análisis de varianza para <i>Penicillium digitatum</i> para el extracto acuoso-a (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) µg/ml, el solvente, el fungicida y el natural.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Moho verde de los cítricos (<i>Penicillium digitatum</i>)	15
Figura 2. Frutilla infectada por podredumbre gris.....	16
Figura 3. Síntomas de la pudrición de corona.....	18
Figura 4. Ubicación de la plantación UURÚ	21
Figura 5. Proceso de extracción caliente de compuestos de la cáscara verde de banano con etanol como solvente.	23
Figura 6. Proceso de extracción de compuestos activos en caliente de cáscara de banano verde con agua como solvente.....	24
Figura 7. Proceso de extracción fría de compuestos de la cáscara de banano verde con etanol como solvente	25
Figura 8. Proceso de extracción fría de compuestos de la cáscara de banano verde con cloroformo como solvente	25
Figura 9 Proceso de extracción caliente de compuestos de la cáscara de banano maduro con agua como solvente	26
Figura 10. Diseño del ensayo in vitro para evaluar el efecto biológico de los extractos de cáscara de banano verde sobre <i>Colletotrichum musae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium digitatum</i>	29
Figura 11. Escala de severidad visual de pudrición de corona	33
Figura 12. Taninos presentes en extractos de cáscara banano verde y maduro variedad Cavendish.....	38
Figura 13. Esporas de hongos poscosecha en el microscopio Marca: OLYMPUS, Serie: BK, observados con objetivo 40x.....	41
Figura 14. Variación en la concentración de etanol (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 10%) en cultivos <i>in vitro</i> bajo condiciones controladas (25°C) durante 8 días.....	43
Figura 15. Comparación de medias de densidad óptica por el método LSD general para <i>Colletotrichum musae</i>	45
Figura 16. Inhibición en <i>Colletotrichum musae</i> causado por el extracto acuoso-a, el fungicida y el solvente con los diferentes niveles generados por el LSD.....	47

Figura 17. Comparación de medias de Absorbancia por el método LSD general para <i>Botrytis cinerea</i>	48
Figura 18. Comparación del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> causada por el extracto acuoso-a, el fungicida y el solvente y agrupación de acuerdo a método LSD.	50
Figura 19. Comparación de medias de la densidad óptica por el método LSD general para <i>Penicillium digitatum</i>	52
Figura 20. Inhibición de <i>Penicillium digitatum</i> causada por el extracto acuoso-a, el fungicida y el solvente de acuerdo a una agrupación por niveles generados por el método LSD.	53
Figura 21. Inhibición producida por el extracto de cáscara de banano maduro en los tres <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Penicillium digitatum</i> y agrupación de las medias de acuerdo al método LSD.....	55
Figura 22. Porcentaje de reducción de pudrición de corona (RPC) causada por la acción del extracto acuoso-a sobre manos de banano en madurez fisiológica.....	56
Figura 23. Comparación de medias de nivel de pudrición de corona y 95% de Fisher LSD en el tiempo	58
Figura 24. Comparación de medias entre tratamientos (Control, Extracto acuoso-a, Fungicida) de 22-28 días	60
Figura 25. Pudrición de corona a los 21 días	61

Introducción

Los niveles de exportación de banano en Ecuador sobrepasan los 100 millones de frutos al año. Así, es uno de los principales productos de exportación a 43 mercados en todo el mundo (ProEcuador, 2013). La variedad Cavendish es aquella que se exporta en mayor cantidad (ProEcuador, 2013). En el año 2012 se reportaron exportaciones de \$. 2,078,239.38 millones de dólares y 5,196,065.09 t. de fruta. Esto sitúa al sector bananero como el primer rubro de exportación dentro del sector privado (Gonzabay, 2014). El banano representa el 45,34% del valor FOB y el 87,14% de toneladas que son exportadas.

A nivel de economía de país, la exportación de banano representa; el 2% del PIB general, 26% del PIB agrícola, 8% de las exportaciones generales, 27% de las exportaciones agropecuarias, 20% de las exportaciones no petroleras y aporta con \$. 4000 millones a la economía nacional (ProEcuador, 2013). Según datos obtenidos del MAGAP (2004), el cultivo de banano representa el 10% de la superficie agrícola total del Ecuador, con una media de crecimiento para el año 2006 del 3% (BCE, 2007). El sector bananero cuenta con varias áreas de apoyo: agroquímicos, transporte terrestre, cartoneras, plástico, entre otras. Estas áreas representan más del 60% de dependencia de la industria bananera (ProEcuador, 2013).

Las plazas de trabajo generadas por el sector bananero, directa e indirectamente, sustentan a más 2,5 millones de personas que se encuentran ubicadas en las 9 provincias que componen este sector. Más de 1 millón de familias, es decir 1 de cada 10 habitantes del Ecuador se sustentan gracias a este sector (Gonzabay, 2014). La pérdida de banano de exportación debido a la pudrición de corona se encuentra entre el 7 y 9% dependiendo de la plantación (ProEcuador, 2013). A nivel nacional el porcentaje de rechazo de banano para la exportación es del 20,89% (BCE, 2007). Este rechazo se usa para consumo interno (3,51%), consumo animal (3,05%), industria (3,88%) y desperdicio (10,45%) (BCE, 2007).

Las manos de banano para su exportación deben cumplir ciertas características: deben ser de color verde, sin madurar, firmes, completos, libres de agentes visibles, sin deformaciones en los dedos y libres de olores extraños (MAGAP, 2011). El incumplimiento de estos parámetros provoca el rechazo para exportación y se considera desecho actualmente.

La pudrición de la corona es una de las principales enfermedades en poscosecha del cultivo de banano (Pérez, 2009, pp. 11-18). Es una enfermedad provocada por varios agentes causales; sin embargo, *Colletotrichum musae* es el patógeno más frecuente identificado como el causal de esta enfermedad (Pérez, 2009, pp. 11-18). Se han incrementado las limitaciones en el uso de sustancias activas sintéticas en poscosecha y más aún en el caso de certificaciones orgánicas. El límite máximo residual de sustancias activas de plaguicidas en general para Europa es del 0,01 mg/kg para productos de origen vegetal o animal (Diario Oficial, 2005).

Los taninos en banano verde, presentes específicamente en la cáscara representan el 40,5% de su peso seco (Garcés, 2004, pp. 48-55). Estos compuestos presentan propiedades y características antimicrobianas por su toxicidad y amargor, lo que provoca igualmente un efecto antinutricional (Garcés, 2004, pp. 48-55). Estudios previos han demostrado que el extracto de la cáscara de banano verde, presenta capacidad antioxidante y antimicrobiana (Mokbel y Hashinaga, 2005). Estos resultados demuestran que se pueden desarrollar estudios sobre métodos de extracción de sustancias activas de la cáscara de banano y su efecto biológico sobre varios tipos de microorganismos de importancia en poscosecha.

Uurú es una empresa ecuatoriana que exporta banano en estado de madurez fisiológico a destinos como Alemania, Italia y el Reino Unido de Gran Bretaña (Uurú, 2013). Esta empresa posee certificaciones orgánicas como Global Gap y Fair Trade. En la actualidad, se encuentra en el proceso de obtención de la certificación Natureland y una de las problemáticas que enfrenta Uurú actualmente es la pérdida del fruto en poscosecha. En el presente trabajo se

analizará el efecto biológico de varios extractos obtenidos de la cáscara de banano procedentes de la empresa UURÚ, sobre hongos patógenos poscosecha *in vitro* e *in vivo*, para analizar su potencial como un fungicida orgánico para aplicación en poscosecha.

1. Marco teórico

1.1. Generalidades del cultivo de banano (*Musa Paradisiaca*)

1.1.1. Origen, distribución, características y evolución del cultivo de banano

El cultivo del banano se originó en la región Indomalaya donde existen varios ejemplares silvestres y que por sus condiciones primitivas, desarrollaron variantes morfológicas, sobre todo en el desarrollo del fruto (León, 2000, p. 522). En el continente americano, la distribución del banano empezó en República Dominicana y luego se dispersó a Panamá, Ecuador y otros países de Sudamérica que poseen climas tropicales (Soto, 1998, pp. 56-168).

Soto (1998), clasifica a *Musa* como una planta Magnoliophyta, de la clase Liliopsida, en el orden *Zingiberales*, perteneciente a la familia *Musaceae*, del género *Musa* y la especie *Musa paradisiaca*. Esta planta está considerada como una herbácea perenne monocotiledónea que posee un pseudotallo que sobresale del tallo subterráneo (Soto, 1998, pp. 56-168). Las raíces de las *Musaceae* presentan un color blanco (León, 2000, p. 522), el rizoma forma y desarrolla hojas en el segmento superior y raíces adventicias (Robinson y Galán, 2012). Sus hojas poseen tres segmentos: lámina, base foliar y pseudopetiolos que se encuentran distribuidos de forma espiral y el tallo verdadero es subterráneo (León, 2000, p. 522). Un racimo colgante sale de la corona de hojas, presenta un color rojo-morado con 20 brácteas alargadas y ovales, de las cuales brotan las flores (Robinson y Galán, 2012). Las brácteas desarrollan los frutos llamados “manos”, los cuales poseen de 3 a 20 frutos generalmente (León, 2000, p. 522). Los frutos de la planta son bayas oblongas que durante su desarrollo se doblan de manera geotrópica (Gonzabay, 2014, pp. 113-142).

El cultivo de banano debe sembrarse a una altitud entre 0 y 800 msnm y en una localización geográfica de 30° N y 30° S (Robinson y Galán, 2012); necesita una precipitación de 100 a 180 mm. al mes o 44 mm. por semana, una humedad relativa constante entre 65 y 95% en el aire y una temperatura para el desarrollo entre 21 y 29,5°C. Los suelos cultivados deben ser ricos en materia orgánica; francos arenosos, contar con excelente drenaje, buena fertilidad, profundidad adecuada para las raíces y un pH entre 6,5 y 7,5. La luminosidad ideal para el cultivo de banano debe ser de 1500 horas de luz al año (Robinson y Galán, 2012).

1.1.2. Importancia del banano en Ecuador y en el mundo

Ecuador fue el principal exportador de *Musa paradisiaca* entre los años 2007-2011, con un promedio de 5.416.119 tm y una tasa anual de crecimiento del 2,23% (Tabla 1). Ecuador no es actualmente el principal productor de la fruta a nivel mundial, puesto que este lugar le pertenece a los países asiáticos que producen en gran cantidad para autoconsumo y no para exportación (Gonzabay, 2014, pp. 113-142).

Tabla 1. Productores de banano a nivel mundial (Toneladas métricas)

País	Promedio de producción entre 2007-2011 (tm)
Ecuador	5.416.119
Filipinas	1.958.275
Costa Rica	1.852.474
Colombia	1.765.728
Guatemala	1.418.374

Adaptado de: (FAO 2013)

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (2013), en el periodo 2009-2012, la producción nacional total de banano registró 7 millones de tm y las provincias más importantes como productoras y exportadoras fueron Los

Ríos con 14055,48 t., seguida de El Oro con 8467,88 t. y Guayas con 6551,83 t. Las principales provincias productoras y exportadoras del Ecuador, fueron de igual manera las provincias con mayor pérdida del fruto en el año 2010, debido a las deformaciones en los frutos de banano y a la pudrición de corona. Efectivamente, la provincia de Los Ríos presenta pérdidas del 23%, seguida de la provincia de Cañar con el 15% y las provincias de Guayas y El Oro presentaron pérdidas de hasta el 13% (MAGAP, 2011).

Para el periodo 2006-2012 el Ecuador presentaba cinco destinos de exportación bananera con una tasa de crecimiento anual de 0,5%. Actualmente, Rusia es el principal importador de banano ecuatoriano, con una media de aumento del 0,4% anual; mientras que Bélgica representa un 3,4% de tasa de crecimiento en importaciones, ubicándose como el mejor de los cinco mayores importadores de la fruta (Gonzabay, 2014, pp. 113-142). En la tabla 2 se presentan los principales destinos de la exportación bananera ecuatoriana.

Tabla 2. Principales destinos de la exportación bananera ecuatoriana (Toneladas métricas)

País	Promedio de producción entre 2006-2012 (tm)
Rusia	1.216.125,18
Estados Unidos	948.026,11
Italia	870.056,58
Alemania	486.942,32
Bélgica	320.286,96
Resto del mundo	1.312.027,67

Adaptado de: (BCE, 2013)

Como se observa en la tabla 2, los principales destinos de exportación de *Musa paradisiaca* se encuentran en el continente europeo, y el mayor importador de fruta es Rusia.

1.1.3. Variedades de Banano comercial de importancia en el Ecuador

Cavendish es la variedad de mayor importancia para exportación a nivel mundial. Las variedades pertenecientes al género *Musa* que se producen en mayor cantidad se derivan de *Musa paradisiaca* (León, 2000, p. 522). En la tabla 3, se observa la descripción botánica de la variedad Cavendish.

Tabla 3. Descripción botánica de la variedad Cavendish

Órgano	Descripción
Raíces	Tiernas: Color blanco Maduras: color amarillento. Con 2 metros de largo y 10 mm de diámetro (Robinson y Galán, 2012).
Hojas	Grandes y verdes, de 2 a 4 m de largo hasta 1,5 m de ancho, poseen un peciolo con una longitud de más de 1 metro (León, 2000, p. 522).
Tallo	Tallo es un gran rizoma almidonoso (Robinson y Galán, 2012).
Flores	La inflorescencia brota de 8 a 9 meses posterior al trasplante del hijuelo (León, 2000, p. 522)
Fruto	Cada mano posee de 2 a 20 frutos, mientras que al final de su madurez fisiológica los frutos aumentan su tamaño (Agrios, 1999)

En el periodo entre 2006 y 2012 el volumen de fruta exportada representó el 3,6% de la tasa de crecimiento anual (5.109.718,53 t.) con un total de 2,15% de ingresos generados (\$ 1.712.203,03) (BCE, 2013). Gonzabay (2014) menciona que el estado de desarrollo del banano en la cosecha se denomina “grado” y en este punto la fruta debe ser de color verde y debe encontrarse en madurez fisiológica. El grado de corte depende de la distancia del destino de exportación de la fruta. En el racimo, el grado aumenta, mientras la fruta se desarrolla (Gonzabay, 2014, pp. 113-142). Es importante que se cosechen los racimos de acuerdo a la edad, para ello se utiliza un calibrador para banano de 40 a 47 mm. La clasificación del fruto se realiza al momento de colocar la funda en el racimo y cerrar con cintas de varios colores que indican la semana de cosecha. Para transportar el racimo hacia el área de poscosecha, se debe cortar el pseudotallo, las hojas y quitar inmediatamente los puntales (Gonzabay, 2014, pp. 113-142).

Los racimos llegan al área de poscosecha mediante un sistema de rieles y poleas. Al llegar al área se elimina las flores de cada dedo con cuidado para evitar heridas, luego se desmana con un cuchillo, se lavan las manos en piscinas de cemento durante 15 a 20 minutos en agua para eliminar el látex (Gonzabay, 2014, pp. 113-142). Los racimos son pesados y fumigados, finalmente se empaacan con la identificación del lugar de destino. Las cajas son armadas en pallets para ser transportadas hacia el puerto más cercano. Los racimos son transportados en entre 12° y 14°C con una duración entre 18 a 22 días (Gonzabay, 2014, pp. 113-142).

1.2. Químico taxonomía de la cáscara de banano

1.2.1. Características de la cáscara de banano verde

Los metabolitos secundarios son compuestos volátiles producidos por varias especies vegetales en diferentes concentraciones (Ávalos y Pérez, 2009). Los compuestos volátiles poseen propiedades antimicrobianas, antifúngicas y antioxidantes (Hamilton-Kemp, Archbold, y Loughrin, 2000). La cáscara representa el 40% del peso de la fruta y su composición química es influenciada por el grado de madurez del fruto (Garcés, 2004; Molsalve, Medina y Ruiz, 2006). El banano verde, específicamente la cáscara, posee un alto contenido de taninos: 40,5% en base seca como se puede observar en la tabla 4 (Velásquez, 2004, pp. 17-22).

Tabla 4. Composición bromatológica del banano verde.

Índice	Fruto (%en base seca)	Cáscara (%en base seca)
Materia seca	20	18
Extracto libre	8,2	33,5
Fibra cruda	1,3	26,7
Cenizas	4	22
Taninos	7,4	40,5
Almidón	72,3	-

Tomado de: (Velásquez, 2004)

Los taninos son el resultado de la combinación de glucosa con varias moléculas de ácido gálico o ácido elágico (dímero) y ácidos fenólicos (Garcés, 2004, pp. 48-55). Esta sustancia puede limitar la absorción de nutrientes, presentar propiedades cicatrizantes, antifúngicas, antimicrobianas y antioxidantes (Velásquez, 2004, pp. 17-22). Estos compuesto se clasifican en taninos hidrolizados (hidrosolubles) y taninos condensados (no hidrosolubles) (Vásquez, Alvarez, López, Wall, y De la Rosa, 2012). La cáscara de banano verde posee un 17% de lignina con función protectora, al ser un compuesto de difícil digestión para herbívoros (Manjarrés, Castro, y Rodríguez, 2010). Mokbel y Hashinaga (2005), aislaron compuestos activos de extractos acuosos de la cáscara verde de banano, mediante el uso de solventes como el acetato de etilo. Se pueden mencionar entre los compuestos obtenidos en este estudio: el ácido málico, β -sitosterol, ácido palmítico y ácido succínico, glucósido y ácido 12-hidroesteárico, D-málico. Según López y Gómez (2014), en la cáscara de banano se encuentran dos antioxidantes: galocatequina (160mg/100g) y la dopamina y por otro lado los compuestos fenólicos varían entre 0,9 a 3/100g de base seca.

El proceso de maduración del fruto se ve marcado en el cambio de color, textura, olor del fruto y acidez, al igual que la transformación de varios compuestos como el almidón (Hubbard, Pharr y Huber, 1990; Mokbel y Hashinaga, 2005). Estos cambios ocurren por un aumento en la respiración del

fruto causado por la producción de etileno y la rápida conversión de almidón en azúcares simples como fructosa (2,7%), sacarosa (7,8%) y glucosa (3,2%) (Lii, Chang, y Young, 1987). El porcentaje de flavonoides en la cáscara amarilla es del 0,62% de materia seca (Bushra, Farooq, Muhammad, y Shahzad, 2008). Los taninos disminuyen su concentración al 5% (Velásquez, 2004, pp. 17-22). Además, durante la maduración se origina la producción de dos esteroides: butirato de isoamilo e isolaverato de isoamilo, producidos durante el proceso de maduración, estos compuestos se presentan en la cáscara como en la pulpa (Bejarano y Vejarano, 2007)

1.3. Pesticidas biológicos a base de extractos vegetales usados en diferentes microorganismos

1.3.1. Modo de acción de los pesticidas

El rol de los pesticidas en general en las plantas, se basa en el deterioro de la membrana celular al inactivar las proteínas o enzimas que son esenciales. Estas limitaciones interfieren con procesos vitales como la respiración y la producción de energía (McGrath, 2004). Al obstruir ciertos procesos vitales, los fungicidas se pueden aplicar a la planta incluso después de que las esporas de distintos microorganismos llegan a la planta. Cuando se aplican antes del desarrollo de la enfermedad, evitan que los esporangios empiecen a germinar y penetrar en las células del hospedero, en este caso se llaman protectores; mientras que los fungicidas erradicadores se utilizan cuando la planta se encuentra con síntomas de enfermedades y la sustancia activa causa la muerte del microorganismo (McGrath, 2004).

1.3.2. Antifúngicos obtenidos de plantas de la división Magnoliophyta

Un ejemplo de antifúngicos obtenidos de plantas de la división Magnoliophyta es el caso del aceite extraído de *Piper divaricatum* (pimienta negra) se determinó que es rico en dos fenilpropenos que poseen un efecto antifúngico

sobre *Fusarium solanum* (Da Silva, et al., 2014, pp. 17926-17942). *Fusarium solanum* ataca a la pimienta negra. Es decir en esta investigación se extrajo un compuesto de *Piper divaricatum* para atacar a *Fusarium solanum* (Da Silva, et al., 2014, pp. 17926-17942).

Otros ejemplos del efecto antimicrobiano de extractos vegetales se muestran en un estudio realizado en el año 2011 por Contreras, Hernández, Sánchez, Gallegos y Jasso, quienes demuestran la actividad antifúngica a partir del extracto metanólico de alejandria (*Cowania plicata* D.Don.) y lentisco (*Pistacia lentiscus* L.) contra *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum cocodes*. La concentración de inhibición (IC50) en el extracto de la hoja de lentisco fue de 2000 ppm. y una (IC90) se logró con 16000 ppm. para el control *C.coccodes*. En el caso del extracto de alejandria una concentración de 3000 ppm logró la IC50 y con una concentración de 28000 ppm. se alcanzó la IC90 sobre *F. oxysporum*. Los compuestos que sobresalen en cada planta con actividad biocida son los compuestos fenólicos como taninos totales (39,01%), catequinas (0,96%), ácido gálico (93,20) y terpenos como mirceno(11,81%), pineno (14,01%) y germanceno (11,5%).

1.3.3. Antifúngicos extraídos de plantas de la Clase Liliopsida y el orden Zingiberales

Un estudio realizado por Ramírez, López, Guzmán, Munguía y Espinosa (2011) sobre el ataque de *Moniliophthora roreri* en cacao, demostró que un extracto de *Zingiber officinale* Roscoe inhibe el crecimiento de este hongo. Los extractos se obtuvieron mediante cuatro mecanismos de extracción: presurizado, destilación y fermentación anaeróbica y aeróbica. Para la evaluación biológica del extracto se usó el método de difusión en agar para determinar la concentración mínima inhibitoria (Ramírez, López, Guzmán, Munguía, y Espinosa, 2011).

Los resultados fueron positivos, pero el mejor de todos los extractos, fue el extracto obtenido mediante destilación. Este concentrado inhibió la producción y crecimiento de conidios (Ramírez, et al., 2011).

1.3.4. Compuestos antibacterianos de la Familia Musaceae, Género *Musa* y especie *Musa paradisiaca*, variedad Cavendish.

Las sustancias fenólicas presentes en la cáscara de banano verde muestran un efecto biológico sobre bacterias y hongos. Así, Mokbel y Hashinaga (2005) demostraron la capacidad antioxidante y antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli*, al utilizar el extracto de la cáscara de banano verde obtenido con acetona y etanol. El estudio proporcionó resultados positivos en el extracto de cáscara verde, con una concentración mínima inhibitoria entre 140 y 750ppm. (Mokbel y Hashinaga, 2005).

Bejarano y Vejarano (2007) probaron si los esteroides: butirato de isoamilo e isolaverato de isoamilo provenientes de la maduración de la cáscara de banano inhibían el crecimiento de *Fusarium oxysporum cubense*, *Tricophyton mentagrophites*, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*, obteniendo resultados negativos, ya que la inhibición no fue significativa.

1.4. Enfermedades y agentes causales de frutos en poscosecha

1.4.1. Morfología y estructura de hongos de importancia en poscosecha

Los hongos se encuentran clasificados en el Reino Fungi (Kuhar, Castiglia, y Papinutti, 2013). Son organismos eucariotas con núcleo delimitado y organelos citoplasmáticos. La morfología que presentan los hongos son de dos tipos: multicelular (filamentosa) y unicelular (levaduriforme) (Aristegui, 2002, pp. 1-4). Los hongos filamentosos se desarrollan en varias superficies de alimentos, en especial en frutas. Estos hongos producen exoenzimas que degradan al

hospedero (Aristegui, 2002, pp. 1-4). La característica principal de desarrollo es la producción de un cuerpo en forma de algodón y polvo en su exterior; que al mirar en el microscopio óptico se puede distinguir las hifas (estructura tubular) y las esporas (Aristegui, 2002, pp. 1-4). Los hongos con estructuras filamentosas son aerobios, mientras que los hongos levaduriformes son generalmente anaerobios facultativos (Aristegui, 2002). La mayoría de organismos del Reino Fungi crecen en amplios rangos de pH (2 a 9) y temperatura (10-40°C) respectivamente (Aristegui, 2002, pp. 1-4). Estos microorganismos presentan dos formas de reproducción: sexual (teleomorfo) y asexual (anamorfo); pero habitualmente se reproducen de las dos maneras a través de esporas (Aristegui, 2002, pp. 1-4).

El grupo Ascomycota es la división con mayor diversidad biológica, alcanza el 50% de los hongos conocidos y el 80% de los patógenos para las plantas. Este grupo se caracteriza por tener ascas en su estructura de reproducción, las cuales son estructuras microscópicas reproductoras que producen ascosporas (Kuhar, Castiglia, y Papinutti, 2013). El proceso de reproducción sexual de ascomycota se realiza mediante el contacto gametangial (Castellanos, et al., 2005, pp. 110-128). Este grupo de hongos poseen también conidias como estructura de propagación asexual y suelen formar esclerotes como estructura de conservación, además presentan hifas septadas como estructura vegetativa (Castellanos, et al., 2005, pp. 110-128). En este grupo se incluyen los mohos y las levaduras (Kuhar, *et al.*, 2013).

En esta investigación se analizó los siguientes hongos poscosecha por las pérdidas que causan en el Ecuador: *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*. *Colletotrichum musae* ataca a la familia de las Musaceae, pudre la corona y provoca antracnosis (Lassois, Jijakli, Chillet, y De Lapeyre de Bellaire, 2010). Este hongo provoca la pérdida del 75% de fruto cosechado. (MAGAP, 2011). *Botrytis cinerea* provoca la enfermedad llamada “podredumbre gris” en frutillas, moras y rosas (Chaves y Wang, 2004); causando una pérdida de hasta el 95% los cultivos de rosas y frutos

cosechados (FAO, 2010). El moho verde de los cítricos es producido por *Penicillium digitatum*, este patógeno provoca hasta el 90% de la cosecha (FAO., 2010). Estos tres hongos pertenecen a la división ascomycota, como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Clasificación taxonómica de hongos poscosecha, agentes causales de enfermedades de cítricos, rosáceas y musáceas

Clasificación taxonómica de hongos poscosecha			
Reino	Fungi	Fungi	Fungi
División	Ascomycota	Ascomycota	Ascomycota
Clase	Euascmycetes	Deuteromycetes	Sordariomycetes
Orden	Eurotiales	Moniliaceae	Phyllachorales
Familia	Trichomaceae	Moniliales	Glomerellaceae
Género	<i>Penicillium</i>	Botrytis	Colletotrichum
Especie	<i>P. digitatum</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>C. musae</i>

Adaptado de: (Agrios, 2005; Murray, Rosenthal, y Pfaller, 2009; Lassois, *et al.*, 2010; Santacruz, 1976; Swin, 1990)

Los enfermedades que *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum musae* provocan se caracterizan por que son específicas a cada hospedero, definiendo la especie y el biotipo (Kuhar, *et al.*, 2013).

1.4.2. Moho verde de los cítricos: *Penicillium digitatum*

Las características principales del hongo *P. digitatum* radica en la formación de conidióforos: complejos de textura lisa y bi-verticiliados, sus esporas presentan una forma circular (Macarisin, *et al.*, 2007, pp. 1491-1500).



Figura 1. Moho verde de los cítricos (*Penicillium digitatum*)

Tomado de: (López, 2011)

La importancia de los mohos que se originan en los alimentos, radica en que producen pudrición y micotoxinas. En este grupo de hongos se encuentra *Penicillium digitatum*, agente causal de “moho verde de los cítricos”, el cual causa el 90% de las pérdidas en poscosecha (Macarisin, et al., 2007, pp. 1491-1500). El sistema patológico del moho verde se caracteriza por una alta especificidad entre el patógeno *Penicillium digitatum* y los frutos cítricos, debido a la producción de enzimas específicas. En efecto, a este agente patógeno se le ha asociado únicamente con la podredumbre sobre la corteza de los cítricos (Figura 1) (Frisvad y Samson, 2004).

Esta enfermedad inicia con la producción de conidios, se trasmite en el campo, en el empaque y en el transporte en cuartos de conservación (Pineda, et al., 2009, pp. 158-165). En el empaque, el patógeno aumenta los ciclos de esporulación e infección, por ser una fuente de inóculo de la enfermedad (Visintin, Fállico, y García, 2010). Para que inicie la infección, es necesario que los frutos cítricos presenten una herida, de esta manera, el conidio penetra en el hospedero (Visintin, Fállico, y García, 2010). A temperaturas entre 20 y 25°C y una humedad en el aire mayor a 80%, el microorganismo crece rápidamente. En cambio, a temperaturas inferiores a 10°C y superiores a 30°C el desarrollo es lento. El crecimiento es completamente inhibido a temperaturas menores a 1°C (Whiteside, Garnsey, y Timmer, 1988).

1.4.3. Podredumbre gris: *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea se identifica por los cuerpos fructíferos y conidios unicelulares, hialinos y ovoides que posee. Estas estructuras se reproducen en el tejido o herida infectada (Agrios, 1999). Este hongo forma esclerocios irregulares y negros, produciendo abundante micelio gris (Mercader, Flores, González, y Sanfuentes, 2006). En la figura 2, se observan los síntomas causados por la podredumbre gris en frutos de fresa.



Figura 2. Frutilla infectada por podredumbre gris.

Tomado de: (Chaves y Wang, 2004)

Botrytis cinerea afecta a varias frutas y hortalizas de importancia económica como frutillas, moras, tomate y algunas especies de flores (Benito, Arranz, y Eslava, 2000). El microorganismo aparece como una mancha de color claro marrón y mientras transcurre el tiempo, empieza a brotar un moho gris, con apariencia de polvo sobre la fruta entera (Chaves y Wang, 2004). Este patógeno puede afectar el 95% de la fruta aún después de 48 horas de la cosecha (Sutton y Peng, 1993). Las temperaturas son determinantes para el desarrollo del patógeno: de 11 a 15°C se forman los esclerocios, entre 17 y 23°C los esclerocios germinan, entre 15 y 20°C el soma esporula y a 20°C las esporas germinan (Agrios, 2005). Este patógeno es activo a bajas temperaturas aún si se encuentra entre 0 y 10°C, causando pérdidas significativas aún bajo condiciones de refrigeración (Agrios, 2005).

1.4.4. Pudrición de corona

La pudrición de corona es la enfermedad poscosecha más importante en el cultivo de banano, variedad Cavendish, alrededor del mundo (Alvindia, 2013; Alvindia y Kobayashi, 2004; Herath y Abeywickrama, 2008; Lassois, et al., 2009; Lassois, et al., 2010; Pérez Vicente, 2009; Ranasinghe, Jayawardena, y Abeywickrama, 2002; Vidal y Pérez, 2002). La podredumbre de la corona en un inicio no se puede visualizar por dos causas: primero, los frutos están en cajas y segundo, la enfermedad genera síntomas durante y después del transporte marítimo (Lassois, Jijakli, Chillet, y De Lapeyre de Bellaire, 2010). La enfermedad inicia cuando el micelio se desarrolla en el área de la corona (sección del corte de la mano de banano cosechado), luego los síntomas avanzan hacia el interior de la mano y hacia los dedos. En ciertos casos, incluso llegan a desprenderse los dedos de la corona por la severidad de la infección (Lassois, et al., 2010). Durante la maduración del fruto, los síntomas aparecen rápidamente, debido a la producción de etileno generada por los tejidos necróticos y por el crecimiento de los micelios del actor principal de la enfermedad: *Colletotrichum musae* (Daundasekera, Joyce, Aked, y Adikaram, 2003; Peacock y Muirhead, 1974). Es recomendable que la fruta no sobrepase las 48 horas sin refrigeración para que el micelio no se desarrolle (Finlay y Brown, 1993). La enfermedad disminuye la calidad del banano por los síntomas necróticos (Pérez, 2009).

La pudrición de corona está asociada a un complejo de hongos, varias especies han sido aisladas de coronas en proceso de pudrición: *Colletotrichum musae*, *Theobromae Lasiodiplodia*, *Cladosporium sp.*, *Musicillium theobromae*, *sphaerica Nigrospora*, *Ceratocystis paradoxa*, *Aspergillus sp.*, *Acremonium sp.*, un complejo de *Fusarium sp.*, como *F. sporotrichoides*, *F. semitectum*, *F. oxysporum* y *F. verticillioides*, *F. solani* y finalmente *Penicillium sp* (Anthony, Abeywickrama, Dayananda, Shanthi, y Arambewela, 2004; Greene y Goss, 1963; Johanson y Blasquez, 1992; Lukezic, Kaiser, y Martínez, 1967; Marin, Sutton, Blankenship, y Swallow, 1996). Sin embargo, *Colletotrichum musae*,

asimismo causante de la antracnosis, es el hongo con mayor patogenicidad, ya que provoca una gran severidad de síntomas con pocas cantidades de inóculo, mientras que otras especies de hongos necesitan gran cantidad de inóculo para podrir la corona (Greene y Goss, 1963; Lassois, et al., 2009; Lukezic, et al., 1967). Cabe mencionar que no existen bacterias confirmadas en este complejo de hongos (Lukezic, et al., 1967). El complejo de hongos crecen rápidamente entre 25 y 30°C y su crecimiento es limitado entre 13,3 y 13,5°C (Finlay y Brown, 1993).

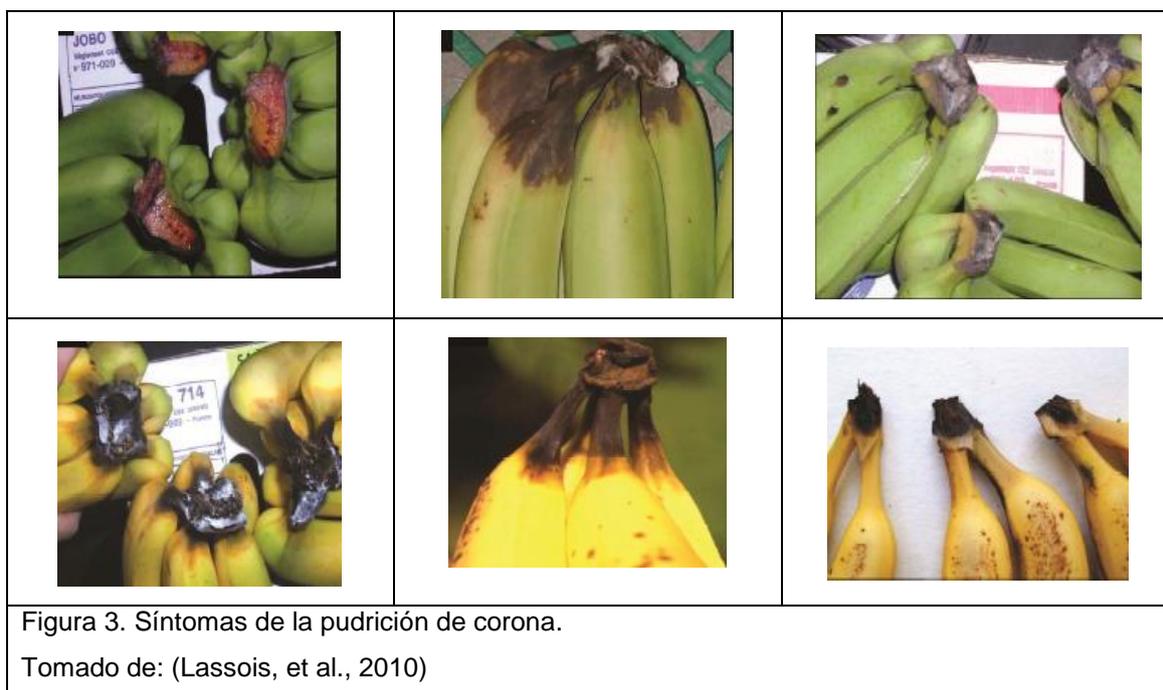


Figura 3. Síntomas de la pudrición de corona.

Tomado de: (Lassois, et al., 2010)

1.4.4.1. *Colletotrichum musae*: Agente causal de la pudrición de corona

Las esporas producidas por *Colletotrichum musae* presentan formas elípticas-cilíndricas, sin septos y unicelulares. En agar, este hongo presenta un color similar al durazno (Simmonds, 1963). La enfermedad que causa *Colletotrichum musae* en bananos es la antracnosis (aparición de manchas oscuras en la cáscara) y la pudrición de la corona (marchitamiento de la corona con crecimiento progresivo hacia los dedos) (Greene y Goss, 1963).

La contaminación de la corona radica en el uso de cuchillos sucios y del uso de agua contaminada (Lassois, et al., 2009). Para que el complejo de hongos se

desarrolle es necesario tener una humedad relativa del 86% (Lassois, *et al.*, 2010). Las esporas de estos hongos crecen en tejido putrefacto de cualquier parte de la planta, *Colletotrichum musae* y *Fusarium sp.* son los primeros en crecer en hojas y flores que se descomponen y sus esporas se producen durante los primeros 40 días (Simmonds, 1963). Las esporas de *Colletotrichum musae* se difunden en el aire pero principalmente en la lluvia; *Colletotrichum musae* infecta al racimo después de que emergen las flores (Simmonds, 1963). En el proceso de poscosecha del fruto, en el lavado de las manos, las esporas de *Colletotrichum musae* se acumulan en el agua. Estas esporas se adhieren a la superficie de la cáscara de la fruta y pueden penetrar de 5 a 7 mm en 3 minutos en el tejido coronar, siendo el lavado en la poscosecha, la fuente principal de contaminación por inóculo del hongo (Shillingford, 1977). Este patógeno puede diseminarse por las esporas a través del aire y durante el empaque, estas estructuras logran sobrevivir a bajas temperaturas y durante varios meses antes de que germinen (Meredith, 1971).

La edad de la fruta es un factor importante en cuanto a susceptibilidad para desarrollo del complejo de hongos. Mientras más viejas son las manos, mayor es la probabilidad de que se produzca la pudrición de la corona. Para la evaluación de la enfermedad se han desarrollado, escalas de medición de severidad del avance de la enfermedad (Alvindia y Kobayashi, 2004; Lassois, *et al.*, 2009). Esta escala ayuda a dar una calificación para que se acepten o rechacen las cajas de banano exportadas. Para evitar el desarrollo de esta enfermedad, varias bananeras utilizan sustancias activas preventivas, se puede mencionar, Tiabendazol, sulfato de aluminio y amonios (Alvindia y Kobayashi, 2004).

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Evaluar el efecto biológico del extracto de la cáscara de banano verde (*Musa paradisiaca*), sobre hongos fitopatógenos poscosecha.

2.2. Objetivos específicos

Determinar el efecto biológico *in vitro* que presenta el extracto de la cáscara verde de banano (*Musa paradisiaca*) sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto sobre las enfermedades poscosecha en banano de manera *in vitro* e *in vivo*.

Demostrar la presencia de metabolitos secundarios (taninos, flavonoides, saponinas y alcaloides) en el extracto por medio de métodos colorimétricos.

3. Metodología

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Recolección, aislamiento y purificación de microorganismos

El presente trabajo fue realizado en conjunto con la empresa UURÚ, esta plantación se dedica a la producción de banano orgánico como principal actividad productiva. Se encuentra ubicada en la provincia del Guayas en el cantón Playas a 4,5 kilómetros del caserío San Antonio, en la vía del Canal, en las coordenadas: longitud 9721473,00 y latitud 575430,00 (Figura 4).

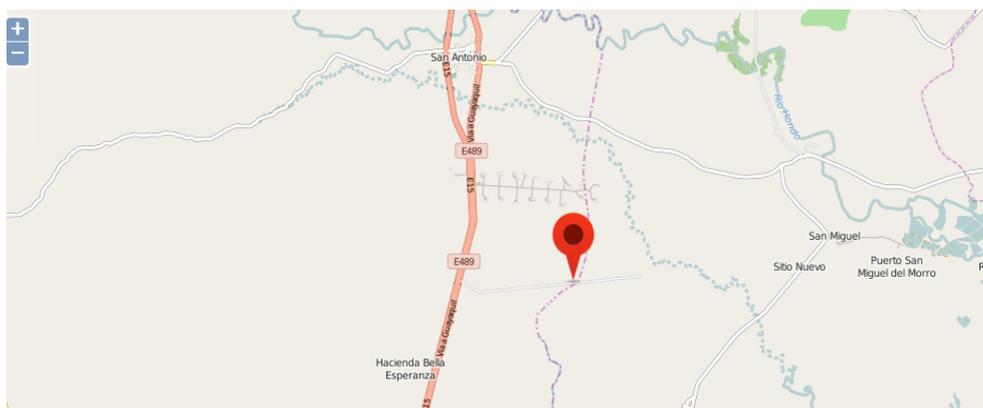


Figura 4. Ubicación de la plantación UURÚ
Tomado de: Google maps, 2015

Los extractos que se explicarán más adelante, se obtuvieron de la cáscara de banano, considerada como desecho de la plantación y de igual manera se obtuvo el hongo *Colletotrichum musae*, de los bananos con síntomas de pudrición de corona de la misma plantación.

Los microorganismos utilizados en el presente trabajo fueron aislados de frutos enfermos. El moho verde de los cítricos y la podredumbre gris fueron las enfermedades presentes en naranjas y frutillas respectivamente. *Penicillium digitatum* fue aislado de naranjas maduras (*Citrus sinensis*, variedad valencia late). El hongo *Botrytis cinerea* se aisló de frutillas (*Fragaria vesca*, variedad

diamante). En cambio, *Colletotrichum musae* fue aislado de banano (*Musa paradisiaca*, variedad Cavendish).

Para el aislamiento de los hongos patógenos, se utilizó la técnica descrita por Agrios (2005). Las cepas aisladas se mantuvieron en agar de papa dextrosa a 25°C, con repiques cada dos semanas para su utilización y su conservación posterior a 4°C. Para la identificación morfológica de los hongos utilizados como agentes causales de síntomas en los frutos poscosecha, se observaron los cuerpos fructíferos y su morfología de cada uno de estos en el microscopio Marca: OLYMPS, Serie BX.

3.1.2. Obtención de extractos

Los extractos evaluados en este proyecto, fueron obtenidos a partir de cáscara de *Musa paradisiaca* variedad Cavendish, de frutos provenientes de la hacienda UURÚ. Se realizaron dos extracciones en calor y dos extracciones en frío, siguiendo diferentes procesos, las modificaciones que se realizaron en estos procedimientos fueron consideradas en base al tipo de reactivos, es decir se utilizó reactivos que no necesiten permiso de compra otorgado por el CONSEP (Consejo Nacional de Control de Sustancias Estupefacientes y Psicotrópicas) y que puedan ser utilizados para producción industrial. Para estos ensayos, se utilizaron dos puntos de corte de la fruta: uno en madurez fisiológica y otro en madurez comercial.

3.1.2.1. Procesos de extracción caliente de compuestos activos de cáscara de banano verde cosechado en madurez fisiológica

La maquinaria utilizada para la realización de los procesos de extracción caliente fueron los siguientes: liofilizador: Marca: LABOTEC Modelo: 01JLG/LGJ-12, soxhlet: Marca: GLASSCO y un rotavapor: Marca: YAMATO Modelo: RE200. Para la primera extracción de compuestos de la cáscara de banano verde se realizó con etanol como solvente, utilizando el método soxhlet y se fraccionó con cloroformo, para la obtención de un extracto orgánico y uno

acuoso como se observa en la figura 5. El extracto se obtuvo por lo tanto mediante el método de Mokbel y Hashinaga (2005), siendo la principal modificación de este método el uso de etanol como solvente en reemplazo de acetona.

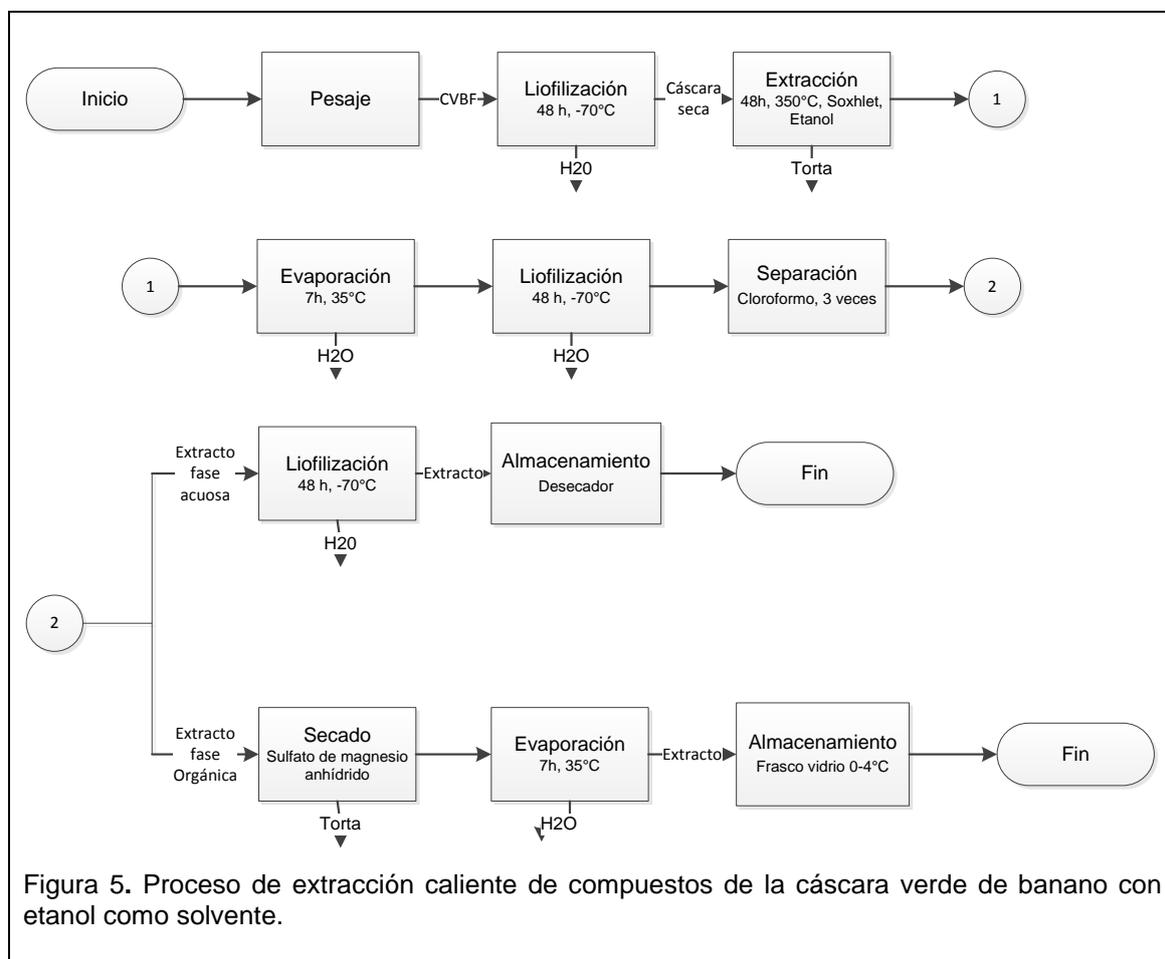
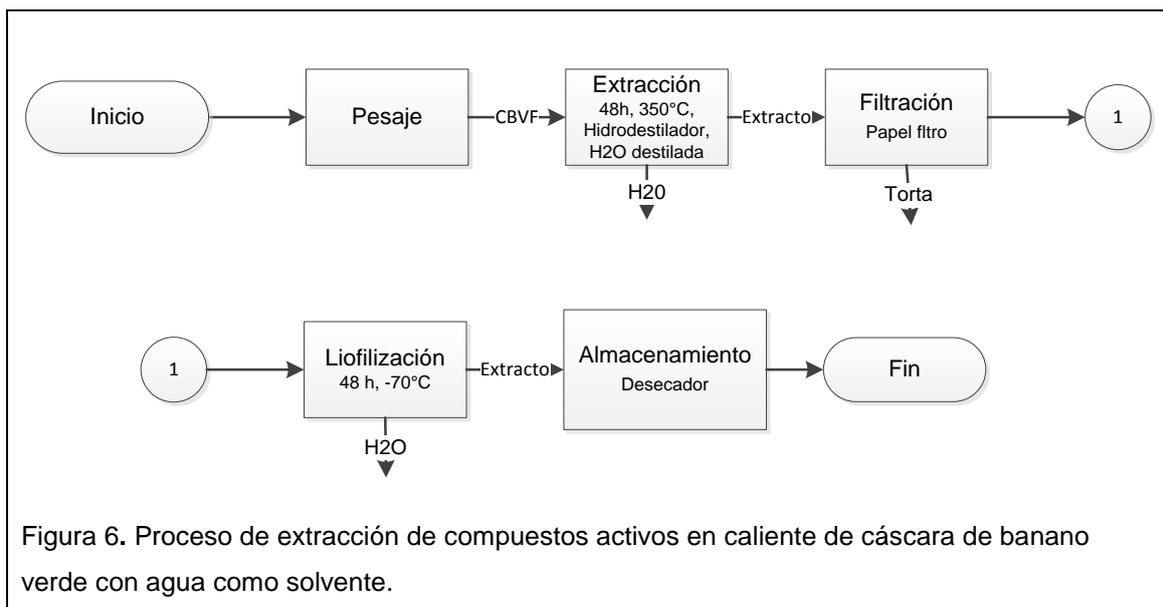


Figura 5. Proceso de extracción caliente de compuestos de la cáscara verde de banana con etanol como solvente.

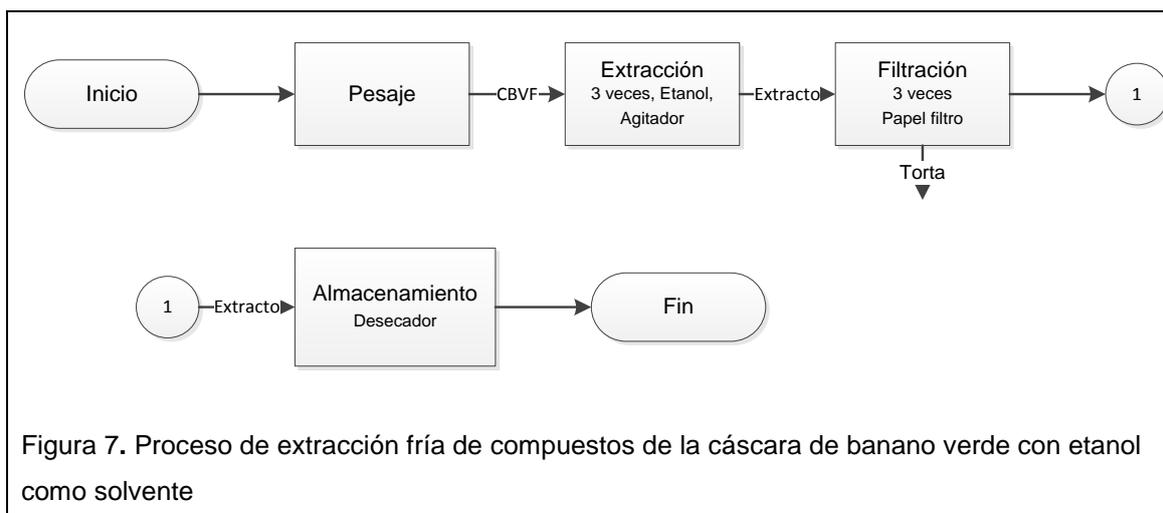
El segundo extracto, como se observa en la figura 6, a diferencia de la primera extracción en caliente, se utilizó la cáscara verde fresca y se realizó una extracción con agua sin fraccionar. El método de Cerutti y Neumayer (2004) muestra una extracción con metanol, mientras que en el presente trabajo se utilizó agua como solvente, ya que los compuestos que se desea extraer son solubles en agua.



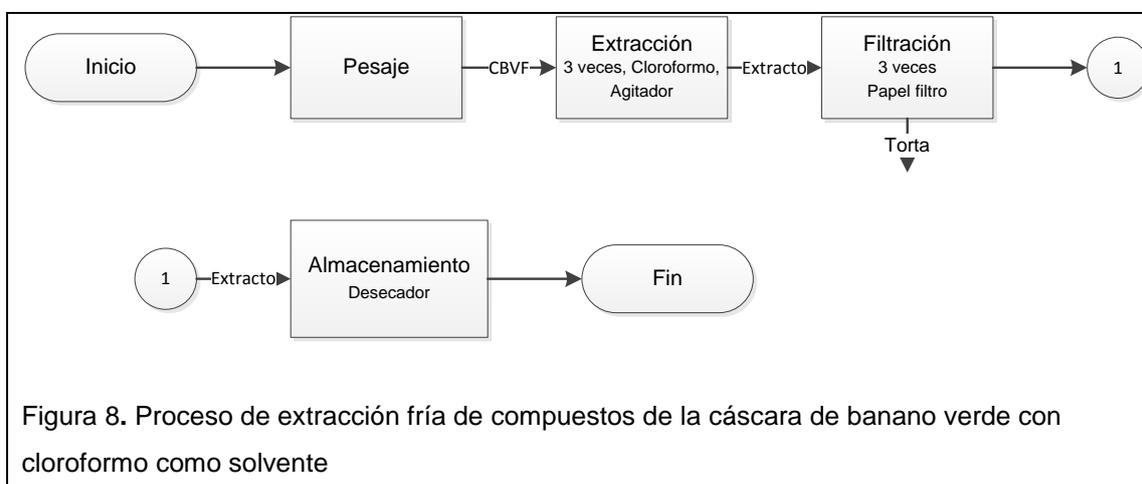
3.1.2.2. Procesos de extracción fría de compuestos activos presentes en la cáscara de banano verde cosechado en madurez fisiológica

Para la obtención de extractos en frío, no se incrementó la temperatura, así se evitó la pérdida de compuestos termolábiles, como la fibra, las vitaminas, los minerales y compuestos que se evaporen a bajas temperaturas. Al no utilizar calor, este proceso necesitó un movimiento continuo durante un tiempo prolongado, para la obtención de una extracción homogénea. Los equipos que se utilizaron en estos procesos de extracción fueron un liofilizador: Marca: LABOTEC Modelo: 01JLG/LGJ-12, un rotavapor: Marca: YAMATO Modelo: RE200 y un agitador orbital: Marca: BOECO Modelo: PSU-1Si.

El proceso de extracción en frío con etanol como solvente, se observa en la figura 7. Para la obtención de un tercer extracto, se mantuvo la muestra en agitación durante 7 días, de acuerdo a la metodología descrita por Cerón y Cardona, 2011. Una modificación importante realizada a este método en el presente proyecto, fue el no fraccionamiento del extracto.



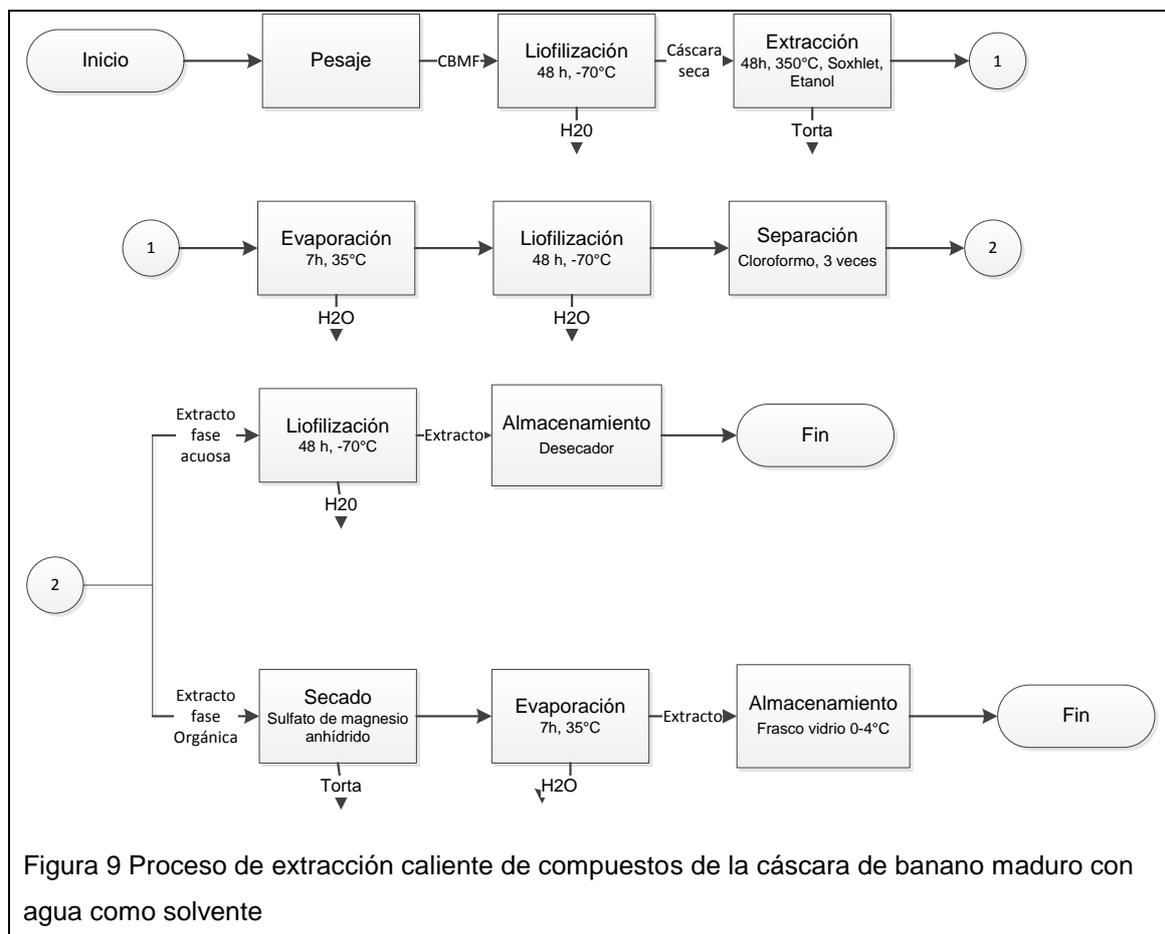
Como se observa en la figura 8, de acuerdo a la metodología descrita por Cerón y Cardona (2011), la cuarta extracción de compuestos de la cáscara de banano verde fresca se realizó con cloroformo como solvente y sin fraccionamiento. Al igual que el proceso anterior, la principal modificación fue mantener sin fraccionamiento la muestra.



3.1.2.3. Proceso de extracción caliente de compuestos activos de la cáscara de banano maduro

La figura 9 muestra el método descrito por Mokbel y Hashinaga (2005), siendo la principal modificación el uso de un solvente polar (H₂O) para la extracción de sustancias activas presentes en cáscara de banano maduro. En el presente

trabajo se realizó una extracción en caliente de cáscara de banano maduro con agua para comprobar su capacidad antifúngica. Esta extracción se realizó para comprobar la presencia de los metabolitos secundarios obtenidos de frutos en punto de madurez avanzada.



Para la determinación del porcentaje de rendimiento de los extractos se utilizó el método gravimétrico-volumétrico; de acuerdo a la siguiente expresión (Castro, 2008):

$$\%RE = P.E(g) / P_{muestra} (g) \times 100\% \quad \text{(Ecuación 1)}$$

(Castro, 2008)

Donde:

P.E: Peso del extracto obtenido en gramos.

P. muestra: Peso de la muestra a extraer en gramos

3.1.3. Evaluación del efecto biológico de los extractos de cáscara de banano verde sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

3.1.3.1. *Determinación del crecimiento de las cepas fúngicas in vitro*

El inóculo de los agentes patógenos fue preparado en condiciones asépticas (cámara de flujo laminar Marca: Thermo Scientific Modelo: 1395). Se utilizó el método descrito por Kouassi, *et al.* (2012). La modificación principal fue el uso del caldo de papa dextrosa en reemplazo de jugos de frutas. Cada hongo fue cultivado en medio PDA, a una temperatura de 25°C durante 15 días en caja Petri. Al término de este tiempo se le agregó 10ml de suero fisiológico y se añadió 0,05% de Tween 20. Para la recuperación de esporas libres de hifas, se procedió a filtrar la solución antes descrita con una gasa estéril y así se removieron los micelios de los hongos, dejando únicamente esporas en solución. Posteriormente, se contaron las conidias presentes en la solución madre en la cámara de Neubauer (Marca: Marienfeld. Profundidad 0,1mm. Líneas claras). Para el conteo de las conidias se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de células} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ Células} / \text{área contada (mm}^2\text{)} \times \text{profundidad de la cámara} \times \text{dilución}}{\text{(Ecuación 2)}} \quad (\text{Marienfeld, 2015})$$

Mediante diluciones consecutivas, se estableció la concentración de una solución de 10^4 esporas/ml y 10^6 esporas/ml. Para determinar el crecimiento de los microorganismos, se realizaron medidas de la Densidad Óptica del cultivo de los microorganismos en caldo de papa dextrosa. Para esto se utilizó un volumen de 200 μ l. en microplacas para ELISA (CITOTEST de 96 pocillos de fondo cóncavo). Se utilizó caldo de papa dextrosa como medio de cultivo para su crecimiento (Cos, Vlietinck, Berghe, y Maesa, 2006). La densidad óptica del crecimiento de los hongos se midió en unidades de absorbancia (A), mediante un espectrofotómetro (Marca: BIOTEK. Modelo: Sinergy HT) a 492 nm de longitud de onda. Las lecturas de la absorbancia se realizaron en intervalos de

24 horas durante 192 horas en total. Las microplacas ELISA se incubaron a 25°C para el crecimiento adecuado de los hongos patógenos. Previa a cada lectura, cada microplaca se sometió a una ligera agitación durante 10 segundos. Este procedimiento se realizó con tres réplicas de cada hongo y el ensayo se repitió tres veces.

Debido a que los extractos llevan como diluyente, el etanol, se determinó el efecto de este solvente sobre los hongos y se estableció una concentración sin efecto sobre el crecimiento de *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*. Para esta evaluación, se procedió a preparar una solución de inóculo de cada hongo al 10^4 esporas/ml y se depositaron en las microplacas ELISA. Se utilizaron siete concentraciones de etanol en el medio de cultivo para cada tipo de hongo: (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 10%). Cada pocillo contenía finalmente una solución con 10^4 esporas/ml, el medio de cultivo y el porcentaje de etanol se varió en 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 10%. El crecimiento del micelio se midió fotométricamente a 490 nm mediante la determinación de la absorbancia en intervalos de 24 horas, hasta completar las 192 horas. Este procedimiento se realizó con tres réplicas de cada hongo y el ensayo se repitió tres veces.

3.1.3.2. Evaluación *in vitro* del efecto biológico de los extractos de cáscara de banano verde sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*

Para la evaluación *in vitro* del efecto biológico de los extractos obtenidos, se aplicó un diseño completamente al azar con tres réplicas de cada hongo y el ensayo se repitió tres veces. Los tratamientos analizados para *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*, fue: un testigo absoluto, un control para el solvente, un control para el fungicida tradicional y las 14 concentraciones (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) µg/ml de los cinco extractos (Orgánico, acuoso-a, acuoso-b, clorofórmico y etanólico). Sin embargo, para la evaluación *in vitro* de la

cáscara de banano maduro, se utilizó un testigo absoluto, un control para el solvente, un control para el fungicida tradicional y tres concentraciones (400, 200, 100) $\mu\text{g/ml}$ del extracto de cáscara de banano maduro para *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

Los extractos evaluados, primeramente se esterilizaron con un filtro CORNING de 0,2 μm . Posteriormente, se realizaron 14 diluciones dobles, siendo 400 $\mu\text{g/ml}$ la concentración máxima y 0,05 $\mu\text{g/ml}$ la concentración mínima. Los extractos fueron diluidos en etanol al 0,25% para los ensayos posteriores.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	A												
Réplica 1	B												
Réplica 2	C												
Réplica 3	D												
Réplica 1	E												
Réplica 2	F												
Réplica 3	G												
	H												

Figura 10. Diseño del ensayo in vitro para evaluar el efecto biológico de los extractos de cáscara de banano verde sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

Las microplacas ELISA CITOTEST de 96 pocillos de fondo cóncavo utilizadas, se encuentran distribuidas como se observa en la figura 10. En las filas B, C y D de todas las columnas se colocaron los blancos de cada tratamiento. En las filas E, F y G de la columna 2 a la 11, se depositó esporas en una concentración de 10^4 esporas/ml. En la columna 4 se colocó el fungicida y en la columna 3 se incluyó solamente el etanol. En las columnas 5 al 11 se colocó etanol al 0,25% mezclado con las diferentes diluciones de cada extracto. En todos los pocillos de las placas ELISA se colocó caldo de papa dextrosa, como alimento para los hongos. En el contorno de la microplaca ELISA se colocó únicamente medio de cultivo para evitar evaporación por parte de las muestras (Figura 10)

Las microplacas se incubaron a 25°C (Incubadora Memmert, Modelo: SRU-098). El crecimiento del micelio se midió fotométricamente a 490 nm al cabo de 192 horas. Para determinar el porcentaje de inhibición del extracto sobre los hongos se utilizó la siguiente fórmula mencionada por Mukherjee *et al.* (2008).

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = (\text{Control} - \text{Tratamiento} / \text{Control}) * 100\% \quad \textbf{(Ecuación 3)}$$

(Mukherjee, et al., 2008)

Donde:

Control: Crecimiento del hongo en solvente

Tratamiento: Crecimiento del hongo bajo el efecto del extracto

Para determinar cuál de los cinco extractos es diferente con respecto al crecimiento del hongo en un cultivo de manera natural con solvente, se realizó un ANOVA simple se plantearon las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula

No existe diferencia significativa del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de cáscara verde de banano Cavendish sobre el crecimiento de los hongos *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

Hipótesis alternativa

Existe diferencia significativa del efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de cáscara verde de banano Cavendish sobre el crecimiento de los hongos *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

Para el análisis de los datos del ensayo *in vitro* se utilizó un ANOVA simple en el programa Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.15. Este análisis basa su experimentación en un orden aleatorio, de tal forma que todos los efectos del ambiente sean repartidos equitativamente entre los tratamientos, este diseño considera al error aleatorio y a los tratamientos como fuentes de variabilidad, siguiendo el siguiente parámetro:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots \tau_k = 0$$

$$H_A: \tau_i \neq 0 \text{ para alguna } i \quad \textbf{(Ecuación 4)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Donde:

τ_i : es el efecto del tratamiento i sobre la variable de respuesta.

Al tener efecto los tratamientos, las observaciones se describen:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \textbf{(Ecuación 5)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Donde;

μ : media global

τ_i : mide efecto del tratamiento

i y e_{ij} : es el a la medición Y_{ij} .

El estadístico corresponde a:

$$F_o = \frac{CM_T}{CM_E} \quad \textbf{(Ecuación 6)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Y si F_o es un valor grande y el valor p es mayor a α se rechaza H_o y si por el contrario F_o es un valor pequeño y el valor-p es menor a α se acepta H_o .

LSD

Una vez rechazado la hipótesis nula, se determinó la diferencia existente entre los pares de medias de los diferentes tratamientos, siendo el estadístico de prueba:

$$H_0: \mu_i = \mu_j$$

$$H_A: \mu_i \neq \mu_j \quad \textbf{(Ecuación 7)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Para toda $i \neq j$. Si el diseño es balanceado el LSD se expresa así:

$$LSD = t_{\frac{\alpha}{2}, N-k} \sqrt{\frac{2CM_E}{n}} \quad \textbf{(Ecuación 8)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Verificación de los supuestos del modelo

Es necesario que se cumplan los supuestos del diseño experimental: normalidad, independencia y varianza constante. Se utilizaron los residuos para la comprobación de los supuestos. Así, el estadístico para el DCA propuesto debería cumplir tres supuestos para los residuos:

1. *Los e_{ij} siguen una distribución normal con media cero.*
2. *Los e_{ij} son independientes entre sí.*
3. *Los residuos de cada tratamiento tienen la misma varianza s^2 .*

3.1.4. Evaluación del efecto biológico del extracto acuoso obtenido a partir de una extracción caliente sobre pudrición de corona

Para la evaluación *in vivo* del efecto biológico del mejor extracto obtenido en el ensayo *in vitro*, se aplicó un diseño completamente al azar con cinco réplicas y el ensayo se repitió tres veces. Los tratamientos analizados para las coronas de las manos de banano con *Colletotrichum musae*, fue: un testigo absoluto, un control para el fungicida tradicional y el extracto acuoso-a (400 $\mu\text{g/ml}$)

Para la evaluación del efecto biológico del extracto seleccionado, como el extracto que mayor efecto presentó *in vitro*, se utilizó una solución de inóculo al 10^4 esporas/ml. (Lassois, et al., 2009). Primeramente, se estableció el comportamiento de un testigo absoluto a la inoculación artificial del patógeno *Colletotrichum musae*, aislada de frutas con síntomas de la enfermedad. Para evaluar el progreso de la enfermedad, se utilizó la escala de severidad descrita por Alvindia y Kobayashi (2004) que se muestra en la figura 11.

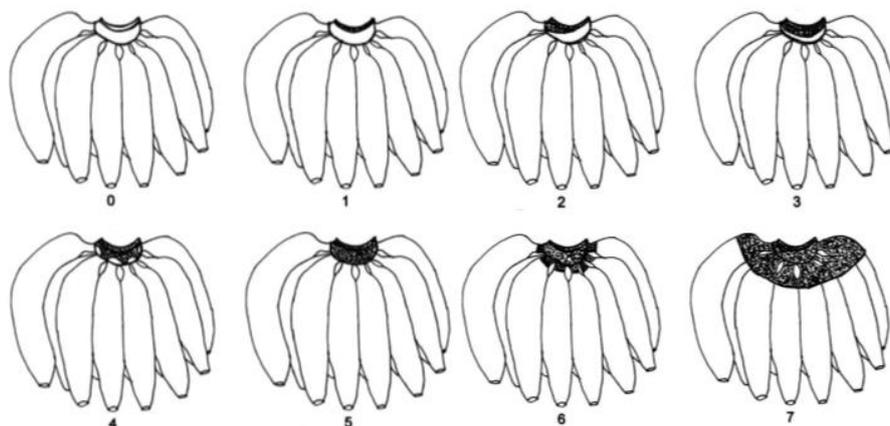


Figura 11. Escala de severidad visual de pudrición de corona

Tomado de: (Alvindhia y Kobayashi, 2004)

Escala Descripción:

0 Sana; 1 Evidencia de los primeros síntomas; 2 Un tercio del tejido de la corona podrida
 3 Un medio de tejido de la corona podrida; 4 Dos tercios de la corona podrida; 5 Pudrición del
 tejido de la corona pero los pedúnculos sanos; 6 Principio de necrosis de pedúnculos; 7
 Pedúnculos podridos, dedos empiezan a desprenderse de la corona

Luego de 24 horas se colocó el extracto acuoso-a en la corona en una concentración de 400 µg/ml en un volumen de 80 ml. de agua y después de 45 minutos de reposo al aire libre, se empacaron los clusters para imitar las condiciones de almacenamiento que tiene la fruta durante el transporte marítimo hasta destino de venta. Para esta evaluación, las manos de banano se colocaron en cajas de cartón corrugado (base y tapa), con fundas de polietileno. Se mantuvieron las cajas de banano en los laboratorios de la Universidad de las Américas a una temperatura promedio de 15,7°C, con una mínima de 13,8°C y una máxima de 17,6°C durante 29 días (Alvindhia y Kobayashi, 2004).

Para determinar la reducción de la pudrición de corona, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Reducción de pudrición de corona} = (\text{Control} - \text{Tratamiento} / \text{Control}) * 100\% \quad \text{(Ecuación 9)}$$

(Alvindhia, 2013)

Donde:

Control: Nivel de escala de severidad (Testigo absoluto)

Tratamiento: Nivel de escala de severidad (Extracto o Fungicida)

Para determinar cuál de los tratamientos es diferente significativamente en comparación al testigo absoluto y responder al planteamiento de las siguientes hipótesis, se aplicó un Test de Friedman.

Hipótesis nula

No existe una diferencia significativa en el nivel de severidad de pudrición de corona causada por en el hongo *Colletotrichum musae* considerando tres tratamientos: extracto acuoso-a, el fungicida preventivo tradicional y el testigo absoluto.

Hipótesis alternativa

Existe una diferencia significativa en el nivel de severidad de pudrición de corona causada por en el hongo *Colletotrichum musae* considerando tres tratamientos: extracto acuoso-a, el fungicida preventivo tradicional y el testigo absoluto.

Para el análisis de los datos del ensayo *in vivo* se utilizó el Test de Friedman y luego se aplicó un test de agrupación de medias LSD, en el programa Statgraphics Centurion XVI, Versión 16.1.15.

Test de Friedman

Esta prueba se utilizó puesto que se seleccionaron n grupos de k elementos de forma que los elementos de cada grupo sean lo más parecidos posible entre sí
El experimento pretendía responder a la hipótesis:

H_0 : No existe diferencia entre los tratamientos

H_A : Existe diferencia entre los tratamientos

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Si H_0 se cumple, la distribución de F se aproxima a una chi-cuadrado con $k - 1$ grados de libertad; rechazando la hipótesis nula por obtener valores superiores al valor crítico para un nivel de significancia del 95%.

Siendo el estadístico:

$$Q = \frac{SSt}{SSe} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Donde:

S: varianza

t: tratamiento

r: error

3.1.5. Determinación de la presencia de compuestos con principios activos en los extractos obtenidos de la cáscara de banano

Para determinar la presencia de taninos, saponinas, alcaloides y flavonoides en los extractos obtenidos, se realizaron pruebas colorimétricas. El fundamento de la prueba de Salkowski se basa en el cambio de color, debido a que el grupo hidroxilo del colesterol reacciona con los demás reactivos (Castro, 2008). La prueba de Shinoda se fundamenta por el carácter fenólico, al cambiar de color a amarillo o rojo se determina la presencia de flavonas y flavonoles (Vásquez, *et al.* 2012). La prueba de cloruro férrico para taninos, se basa en la reacción del grupo carboxilo de los ácidos gálicos (Velásquez, 2004). La prueba de Wagner para alcaloides, se basa en la reacción del metano con los reactivos. Los carbohidratos reaccionan por su OH, grupo hidroxilo del compuesto. (Castro, 2008).

Tabla 6. Pruebas fitoquímicas para determinación presencia de metabolitos secundarios

Sustancia	Prueba	Procedimiento	Resultado
Glicósidos saponínicos	Prueba de Salkowski	3mg de extracto + 5 gotas de H ₂ SO ₄	Cambio de color inmediato o gradual. Formación de un anillo rojo.
Glicósidos flavonoides	Prueba de Shinoda	5mg de extracto + trocito de Mg + 1ml HCl	Coloración roja, anaranjada-roja o azulosa.
Taninos	Cloruro férrico	2mg de extracto + 3 gotas de cloruro férrico	Coloración verde oscuro o azul oscuro
Alcaloides	Reactivo de Wagner	2mg de extracto + 5 gotas del reactivo de Wagner	Cambio a color marrón
Carbohidratos	Prueba de Fehling	2ml de Extracto + 2ml de Fehling A + 2ml de Fehling B y calentar suave.	Cambio de coloración anaranjada rojiza

Tomado de: (Castro, 2008; Velásquez, 2004).

4. Resultados y Discusión

4.1. Determinación de la presencia de metabolitos secundarios

En el presente trabajo, se determinó la presencia de taninos concentrados en banano en madurez fisiológica, gracias al cambio de color del extracto a un color verde oscuro como se observa en la figura 12. El cambio de color se debe a la reacción química que se produce al contacto de los grupos hidroxilos y carbonilos con los reactivos utilizados (Velásquez, 2004). En el caso del extracto acuoso proveniente de cáscara de banano maduro no se comprobó la presencia de ninguna sustancia fenólica, ya que no ocurrió un cambio de color para los metabolitos secundarios; taninos, flavonoides, alcaloides y saponinas. Por lo tanto, estos resultados demuestran que las proporciones de estas sustancias son mínimas o no existen en la fruta madura (Tabla 7).

Tabla 7. Determinación de la presencia de sustancias fenólicas en extractos de cáscara banano verde y maduro variedad Cavendish

Metabolitos secundarios presentes en extractos de cáscara de banano						
		Taninos	Flavonoides	Alcaloides	Saponinas	Carbohidratos
Extractos de cáscara verde	Acuoso.a	Presente	No Presente	No Presente	No Presente	No Presente
	Orgánico	Presente	No Presente	No Presente	No Presente	No Presente
	Acuoso.b	Presente	No Presente	No Presente	No Presente	No Presente
	Etanólico	Presente	No Presente	No Presente	No Presente	No Presente
	Cloro-fórmico	Presente	No Presente	No Presente	No Presente	No Presente
Extractos cáscara de banano maduro	Acuoso-maduro	No Presente				

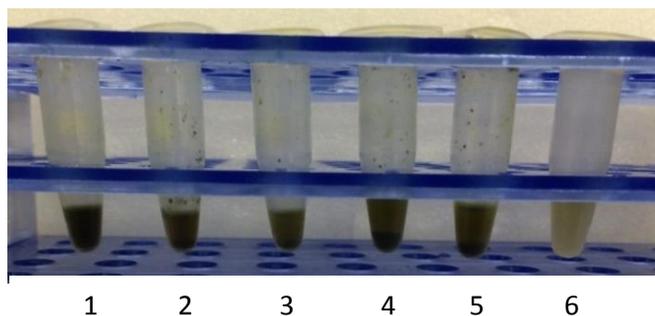


Figura 12. Taninos presentes en extractos de cáscara banano verde y maduro variedad Cavendish

De izquierda a derecha: Extractos:

1) Orgánico, 2) Etanólico, 3) Acuoso.a, 4) Clorofórmico, 5) Acuoso.b y 6) Acuoso-maduro

Los resultados obtenidos concuerdan con Ly (2004) y con Velásquez (2004), al afirmar que existe una gran proporción de taninos presentes en la cáscara de banano verde referidos como ácido tánico. Estos compuestos fenólicos, son solubles en agua y se precipitan al estar en contacto con proteínas. En efecto, estas sustancias presentan un efecto inhibitorio sobre la producción de la amilasa extracelular de los hongos (Greene y Morales, 1968).

4.2. Evaluación del rendimiento de los extractos obtenidos a partir de la cáscara de banano cv. Cavendish

Los extractos evaluados sobre cultivos *in vitro* de los hongos patógenos *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*, mostraron un rendimiento de extracción de 55% como el más alto y de 0,35% como el rendimiento más bajo. Estos resultados se presentan en la tabla 8, donde se observa el rendimiento de los cinco extractos obtenidos, a partir de la cáscara verde de banano variedad Cavendish. El concentrado acuoso-a, presenta el mayor rendimiento de extracción, con un 55,02%, seguido del extracto acuoso-b con 13,22%, pero a diferencia del primer extracto, el extracto acuoso-b se extrajo con etanol y cloroformo. El concentrado etanólico en cambio, muestra un rendimiento del 1,97%, el extracto orgánico presentó un 2,56% de rendimiento y finalmente el rendimiento más bajo obtenido fue del 0,35% en el

concentrado clorofórmico. El rendimiento fue calculado mediante un balance de masa realizado para cada extracto obtenido.

Tabla 8. Rendimiento y características físicas (descriptivas) de los extractos obtenidos de la cáscara verde de banano

Extractos	Método utilizado	Rendimiento (%)	Características
Acuoso-a	Hidrodestilador	55,02	Polvo color café claro
Acuoso-b	Soxhlet con etanol 96%	13,22	Sustancia pegajosa, color café oscuro
Orgánico	Soxhlet con etanol 96%	2,56	Sustancia en polvo Color verde
Etanólico	Frío con etanol 96%	1,97	Polvo verde oscuro
Clorofórmico	Frío con cloroformo	0,35	Sustancia pegajosa color amarillo-verdoso
Acuoso (cáscara madura)	Hidrodestilador	18,9	Polvo color café claro

Los rendimientos obtenidos en este trabajo son diferentes a aquellos obtenidos por Mokbel y Hashinaga (2005) quienes presentaron un rendimiento de 0,24% para el extracto orgánico y 4% para el concentrado acuoso-b. La diferencia entre el rendimiento obtenido entre los cinco extractos obtenidos de cáscara verde de banano, es el uso de acetona como solvente, al ser más selectivo, separa solamente sustancias apolares y por lo tanto el rendimiento es menor. Ferro (2008), en sus ensayos, obtuvo un rendimiento del 27,3% en el proceso de análisis de varios extractos acuosos solubles de corteza de Lapacho, mediante un secado por spray dry. Se comparó la cáscara de banano con la corteza de Lapacho, por presentar características fibrosas. Esta particularidad de la corteza de Lapacho y la cáscara de banano verde permiten extraer una gran cantidad de sustancias presentes en estas plantas.

4.3. Evaluación económica de los extractos obtenidos a partir de cáscara de banano verde

La tabla 9 presenta el costo de producción a nivel de laboratorio, por cada gramo de los cinco extractos obtenidos a partir de cáscara de banano verde variedad Cavendish. El cálculo de la maquinaria se realizó en base a la energía

consumida por las horas de producción de cada equipo. El extracto acuoso-a tiene un costo de producción de \$ 0,98 considerando 96 horas de producción para la obtención del mismo. Por otra parte, el concentrado etanólico se logró obtener con un costo de \$. 10,31 y 223 horas de extracción. Los extractos: acuoso-b, clorofórmico y orgánico superan las 100 horas de extracción y los costos de producción alcanzaron los \$. 30,00.

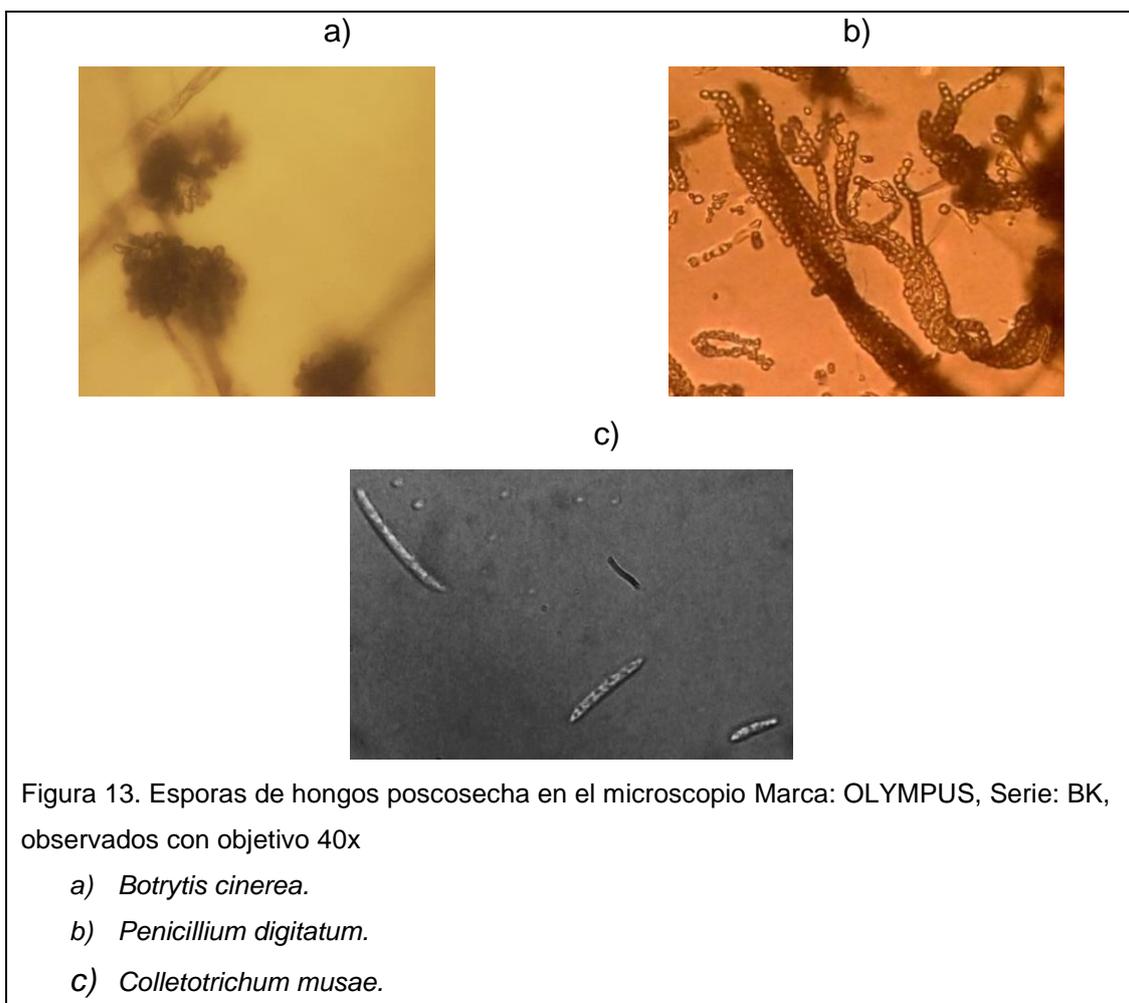
Tabla 9. Costo de producción por gramo de cada extracto

Extractos	Acuoso-a	Etanólico	Acuoso-b	Clorofórmico	Orgánico
Tiempo (h)	96	223	161	223	161
Maquinaria (\$)	5,23	8,72	9,68	8,72	9,68
Materiales (\$)	7,00	10,00	30,00	10,00	30,00
Reactivos (\$)	0,04	1,58	51,95	13,32	51,95
Costo de producción (\$)	0,98	10,31	30,54	91,55	163,63

El extracto acuoso-a se presentó como el concentrado más económico y cuenta con menor número de horas de extracción. El solvente y la maquinaria utilizada son factores influyentes sobre el costo de producción. La maquinaria y el solvente utilizados para el extracto acuoso-a fueron un liofilizador y agua respectivamente; mientras que para los demás extractos se usó, además de un liofilizador, un rotavapor, un soxhlet y un agitador orbital. En cuanto a los solventes, se emplearon etanol y cloroformo. El uso del liofilizador es fundamental, ya que este equipo elimina el agua a través del proceso de sublimación a -70°C y no separa los principios activos de los extractos, es por eso que no puede ser reemplazado con un deshidratador. Al utilizar varios equipos en un proceso de extracción, como los mencionados anteriormente, el rendimiento disminuyó y el tiempo de producción aumentó en el caso de los extractos.

4.4. Identificación de *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*

En la figura 13.a, se observan los cuerpos fructíferos de *Botrytis cinerea*, aislados de frutillas con síntomas de la podredumbre gris. Cada espora presenta una forma ovalada y estas forman un racimo. *Penicillium digitatum* (figura 13.b), aislado de una naranja con características del moho verde de los cítricos, presenta conidios, los cuales poseen una forma circular a diferencia de *Botrytis cinerea*, además presenta fiálides lisas. *Colletotrichum musae* (figura 13.c), fue obtenido de la corona con síntomas presentes de frutas de banano. Este último patógeno presenta esporas elípticas, cilíndricas y sin septos.



Los tres hongos anteriormente presentados pertenecen al grupo Ascomycota del reino Fungi, las características morfológicas como sus conidias corresponden a este grupo (Castellanos, et al., 2005, pp. 56-58). *Botrytis cinerea* presentó hifas hialinas, septadas y ramificadas de forma irregular. Conidióforos macronematosos y largos. El ápice finaliza en estructuras llamadas conidios unicelulares y globosos. Esta descripción coincide con la señalada por Agrios (1999) y por Chávez y Wang (2004). *Colletotrichum musae* mostró conidios unicelulares, lisos, fusiformes y aseptados. Las características de las esporas de *Colletotrichum musae* concuerdan con las descripciones propuestas por Lassois, et al., 2009 y Simmonds, 1963. *Penicillium digitatum* produce una gran cantidad de conidios. Los conidioforos forman verticilios. Los conidios son cilindroidales de color verde pálido, presentan una pared fina y lisa. Estas esporas se desarrollan en columnas irregulares ramificadas de acuerdo a las descripciones realizadas por Macarisin, et al., (2007). Esta descripción se puede corroborar con aquella presentada en este trabajo.

4.5. Evaluación del efecto del solvente sobre el crecimiento de *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*

Para el desarrollo de los ensayos *in vitro* de los hongos *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*, se utilizó una concentración de 10^4 esporas/ml, por presentar un crecimiento uniforme y no sobrepasar el límite de lectura de la absorbancia. Estos resultados concuerdan con Hadacek y Greger, (2000). La figura 14 a, b y c muestra el crecimiento de *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum* respectivamente, así como el crecimiento bajo el efecto inhibitorio del etanol con seis diferentes concentraciones: 0.25, 0.5, 1, 2, 4 y 10%. El crecimiento natural de los tres hongos se observa en las curvas de crecimiento indicando el 0% en concentración de etanol. Esta curva muestra las tres fases de crecimiento: latencia, exponencial y estacionaria de los microorganismos estudiados (Agrios, 2005).

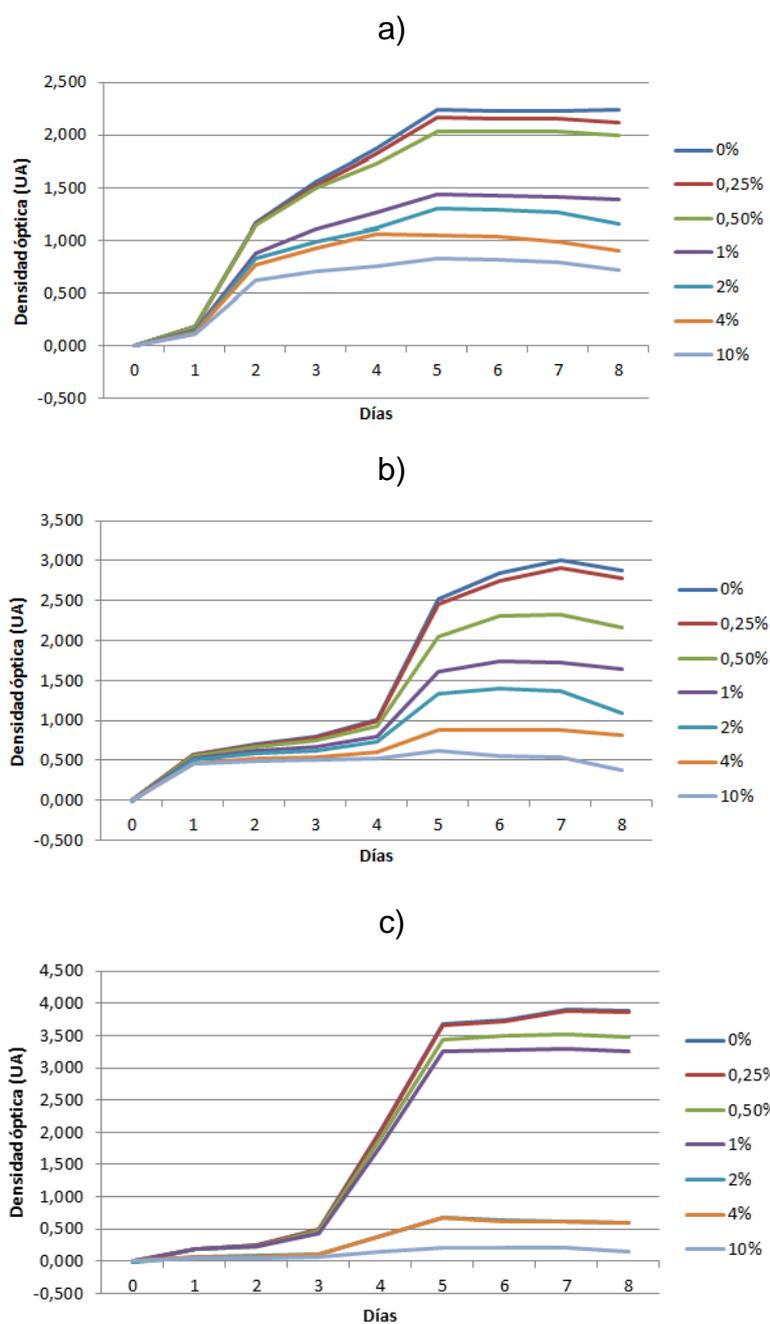


Figura 14. Variación en la concentración de etanol (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 10%) en cultivos *in vitro* bajo condiciones controladas (25°C) durante 8 días.

- a) *Colletotrichum musae*
- b) *Botrytis cinerea*
- c) *Penicillium digitatum*

Como se observa en las curvas de crecimiento (figura 14 a, b c), la concentración de 0,25% de etanol es la curva que más se asemeja a la de crecimiento natural para *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*. Esto muestra que la dosis de 0.25% de etanol no provoca un efecto negativo sobre el crecimiento de los hongos y el microorganismo cumple con las tres fases de crecimiento antes descritas en la literatura (Kouassi, et al., 2012). Además, como se observa en las tres figuras anteriormente descritas, la concentración de 10% de etanol inhibe el crecimiento de los tres hongos, en especial el de *Penicillium digitatum*. Las cinco concentraciones (0,5, 1, 2, 4, 10%) limitan la fase exponencial de acuerdo a los estudios desarrollados por Kouassi, et al., (2012) y Villa y Espín (2010) quienes utilizaron cuatro concentraciones de etanol, siendo la menor concentración 0,5% y obtuvieron una inhibición mínima a partir de esa dosis de etanol. En el presente estudio se utilizó una concentración menor: 0,25%, evitando que el solvente sea la sustancia inhibidora del crecimiento microbiano.

4.6. Evaluación del efecto biológico *in vitro* de los extractos obtenidos de cáscara de banano verde sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

4.6.1. *Colletotrichum musae*

Para determinar el extracto que presentara una inhibición significativa del crecimiento de *Colletotrichum musae* con respecto al crecimiento del hongo en solvente, se realizó un ANOVA simple. Al analizar los datos se descartaron ciertos extractos y se seleccionó aquel que presentará la menor Densidad Óptica y por lo tanto manifestará menor crecimiento *in vitro*. Se observó una diferencia significativa entre tratamientos, la cual se evidencia en la figura 15.

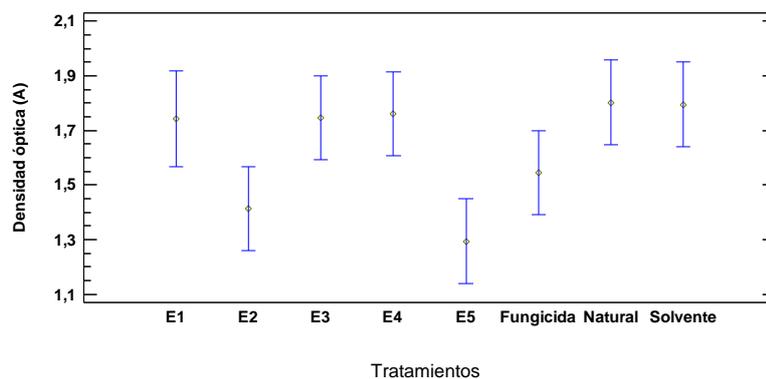


Figura 15. Comparación de medias de densidad óptica por el método LSD general para *Colletotrichum musae*.

La figura 15 demuestra que el extracto 5 y el extracto 2, es decir el extracto acuoso-a y el extracto etanólico presentan una diferencia en relación al crecimiento del hongo con respecto al solvente y al testigo. El mejor extracto entre los dos antes mencionados, se seleccionó mediante un ANOVA para cada extracto y se escogió el que presentó la menor unidad de absorbancia en su media, entre los tratamientos utilizados; correspondiendo al E5 (extracto acuoso-a) como el mejor tratamiento.

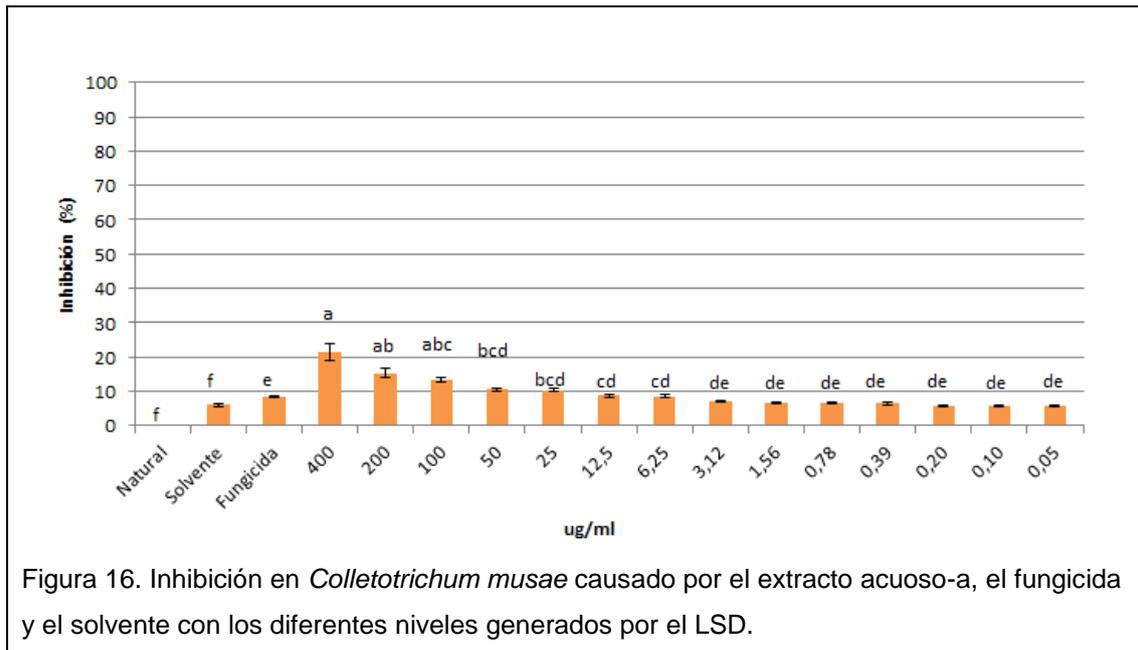
En la tabla 10, el ANOVA descompone la varianza en dos componentes: un componente entre el extracto acuoso-a, solvente, fungicida y el natural y un componente dentro de los tratamientos antes mencionados, en el cual el valor-p muestra un nivel de significancia estadística entre cada uno de los factores evaluados, con un 95% de nivel de confianza. Como el valor-p de los tratamientos (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) $\mu\text{g/ml}$, el solvente, el fungicida y el natural) es menor a 0,05, se determina que existe una diferencia significativa entre las medias de absorbancia y por consecuencia del crecimiento de *Colletotrichum musae* con respecto a los diferentes niveles de concentración por extracto.

Tabla 10. ANOVA para análisis de varianza para *Colletotrichum musae* para el extracto acuoso-a (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) µg/ml, el solvente, el fungicida y el natural

Fuente	Suma de cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	2,60409	16	0,162756	14,51	0,0000
Entre tratamientos	1,52535	136	0,0112158		
Total	4,12944	152			

Al existir una diferencia entre todos los tratamientos, se necesita comparar la absorbancia obtenida bajo el efecto de las diferentes concentraciones utilizadas del extracto, el fungicida, y el tratamiento natural. El análisis de rangos múltiples mediante el método del LSD, determinó que las medias son diferentes entre ellas significativamente (Figura 16). Se obtuvieron 6 grupos homogéneos. Los datos demuestran que no existe una diferencia entre la absorbancia obtenida por el testigo natural en comparación a la del solvente, pero sí existe una diferencia entre las primeras siete concentraciones del extracto acuoso-a con respecto a la absorbancia obtenida en la muestra del solvente, mientras que las otras 7 concentraciones presentaron una similitud en la medida de absorbancia con el fungicida (Figura 16).

Con el objetivo de mostrar los datos obtenidos por el método LSD, la figura 16 muestra los resultados de la inhibición producida por el extracto acuoso-a (21,31%) a 400 µg/ml. En base a los resultados presentados, se reporta un MIC mayor o igual a 400 µg/ml. Cabe recalcar que a partir de la concentración 12,5 µg/ml a la concentración 0,05 µg/ml presentan una inhibición causada por el solvente.



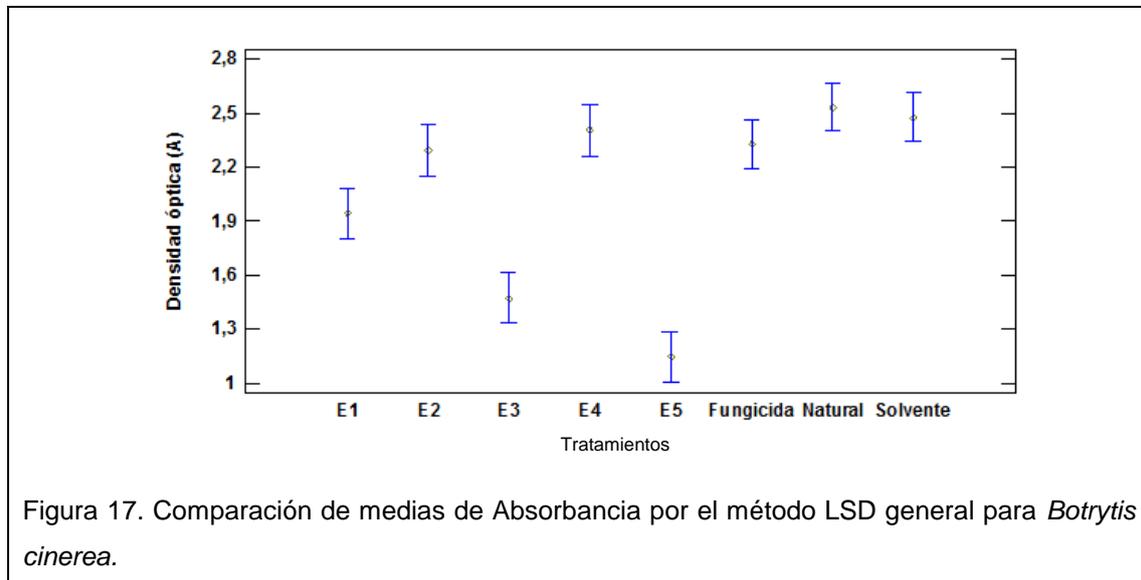
Greene y Morales (1968) demostraron que en ciertas ocasiones sí se produce la inhibición del crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* a partir del extracto de cáscara en proceso de descomposición. Esto demuestra que el tanino podría tener un efecto de inhibición sobre la producción de amilasa que actúa sobre la pared del hongo. En este caso, se corrobora el efecto inhibitorio de los taninos presentes en el extracto acuoso-a, como lo demuestran igualmente en sus ensayos, Mokbel y Hashinaga (2005). Al ser estos compuestos fenólicos solubles en agua caliente, se logró la máxima extracción de estos compuestos, a diferencia de los demás extractos.

Los datos obtenidos podrían inferirse a poblaciones más extensas de *Colletotrichum musae in vitro*, debido a que los datos indican una distribución normal para el extracto acuoso-a, gracias a la prueba de Shapiro-Wilk. con un 95% de confianza.

4.6.2. *Botrytis cinerea*

Los resultados obtenidos en la evaluación de los cinco extractos presentaron una diferencia significativa. En efecto, un ANOVA simple y un LSD permitieron determinar la diferencia entre extractos y la comparación de medias de lecturas

de la densidad óptica en cultivos de *Botrytis cinerea*. El mejor tratamiento fue el extracto 5 (acuoso-a) con una absorbancia de 1,14 A en comparación del testigo que presentó una absorbancia de 2,53 A (Figura 17).



En la tabla 11, el ANOVA descompone la varianza en dos componentes: un componente entre tratamientos (extracto acuoso-a, el solvente, el fungicida y el natural y un segundo componente dentro de los tratamientos antes mencionados, en el cual el valor-p muestra un nivel de significancia estadística entre cada uno de los factores evaluados, con un 95% de confiabilidad. Debido a que el valor-p de los tratamientos (14 concentraciones del extracto acuoso-a, el solvente, el fungicida y el testigo natural) es menor a 0,05, se determina que existe una diferencia significativa entre la media de la absorbancia medida en las muestras de *Botrytis cinerea*. Esto muestra que el crecimiento del hongo se ve afectado por el nivel de concentración de los extractos.

Tabla 11. ANOVA para análisis de varianza para *Botrytis cinerea* para el extracto acuoso-a (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) µg/ml, el solvente, el fungicida y el natural.

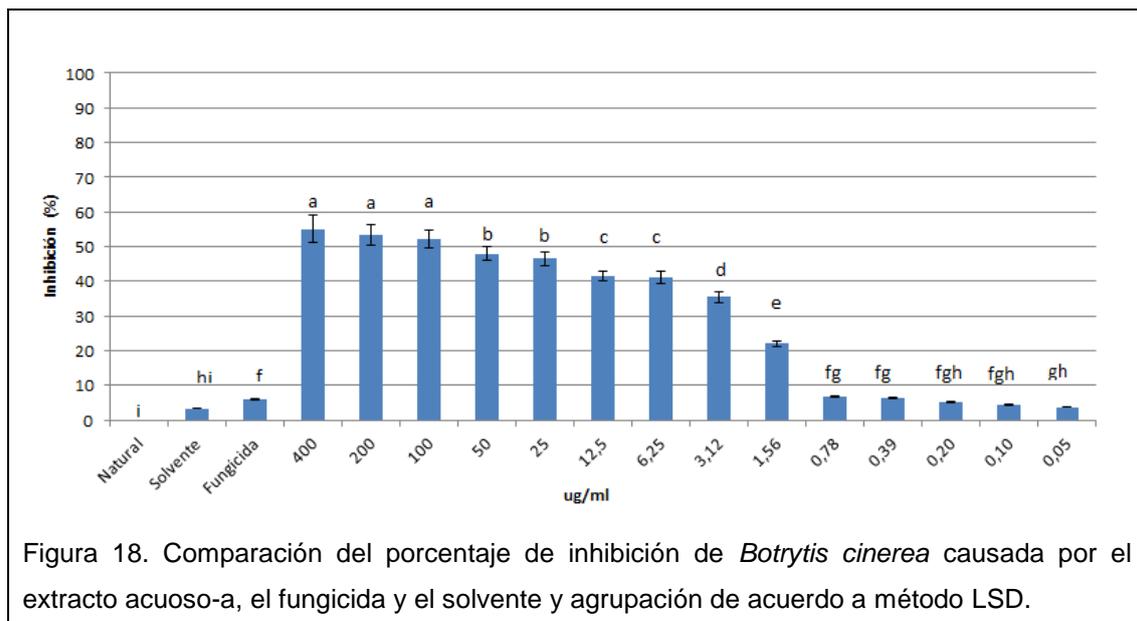
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	38,8829	16	2,43018	275,33	0,0000
Entre tratamientos	1,09449	124	0,00882655		
Total	39,9774	140			

Al existir una diferencia entre todos los tratamientos, se estableció la necesidad de comparar la absorbancia obtenida por el crecimiento entre las concentraciones del extracto orgánico, el fungicida y el tratamiento natural. Con este propósito, se realizó un análisis de rangos múltiples mediante el método LSD, que determinó que las medias son diferentes entre ellas (Figura 18) y se obtuvieron 9 grupos homogéneos. Los datos demostraron que no existe una diferencia entre el nivel de absorbancia causado por el tratamiento natural en comparación a la del solvente y que la inhibición es causada por el extracto. Por otra parte, se encontró diferencia entre las primeras nueve concentraciones del extracto acuoso-a con respecto a la absorbancia medida en el solvente y el fungicida (Figura 18). Confirmando los datos obtenidos por el LSD, la figura 18 demuestra la inhibición causada por el extracto acuoso-a sobre *Botrytis cinerea*, a 400 µg/ml. Bajo estas condiciones, se produce una inhibición del 55,07%, mientras que el fungicida presenta una inhibición del 5,92%.

En la figura 17 se puede observar que el extracto acuoso-a a 0,78 µg/ml presenta una capacidad de inhibición semejante al fungicida. Es así que se podría considerar a este extracto como una alternativa potencial para el control del hongo en sistemas de producción orgánica para la prevención del ataque de *Botrytis cinerea* en poscosecha.

En este trabajo se pudo determinar la actividad fungicida del extracto acuoso-a sobre la inhibición de *Colletotrichum musae* y *Botrytis cinerea*. A pesar de ello,

el efecto inhibitorio depende del microorganismo patógeno y de las concentraciones utilizadas. Al utilizar la dosis 400 $\mu\text{g/ml}$ se observó una inhibición del 21,31% en *Colletotrichum musae* y 55,07% en *Botrytis cinerea*. Se puede considerar que los organismos patógenos son inhibidos en diferentes niveles de acuerdo a su genética y morfología (Kouassi, et al., 2012).



En la figura 18 hay un aspecto importante, ya que la agrupación de nivel a se mantiene hasta con 100 $\mu\text{g/ml}$. Esto significa que el extracto acuoso-a inhibe a *Botrytis cinerea* incluso a 100 $\mu\text{g/ml}$, siendo este dato importante para la potencial formulación y producción de este fungicida natural, puesto que se necesita una cantidad menor de extracto para que cumpla el efecto inhibitorio sobre el hongo.

Espitia (2011) realizó una extracción caliente de tomillo (*Thymus vulgaris*), con agua como solvente. Al caracterizar el extracto, comprobó la presencia de carvacrol y el p-cimeno. Estas sustancias presentan actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea*. Los resultados de Espitia (2005) demostraron que con una dosis 500000 $\mu\text{g/ml}$, el hongo presentaba una inhibición del 60% al quinto día. En el caso del extracto de la cáscara de banano verde, este posee sustancias altamente polares en condiciones de extracción con alta temperatura. Como se observa en la figura 18, estos compuestos presentan una alta inhibición

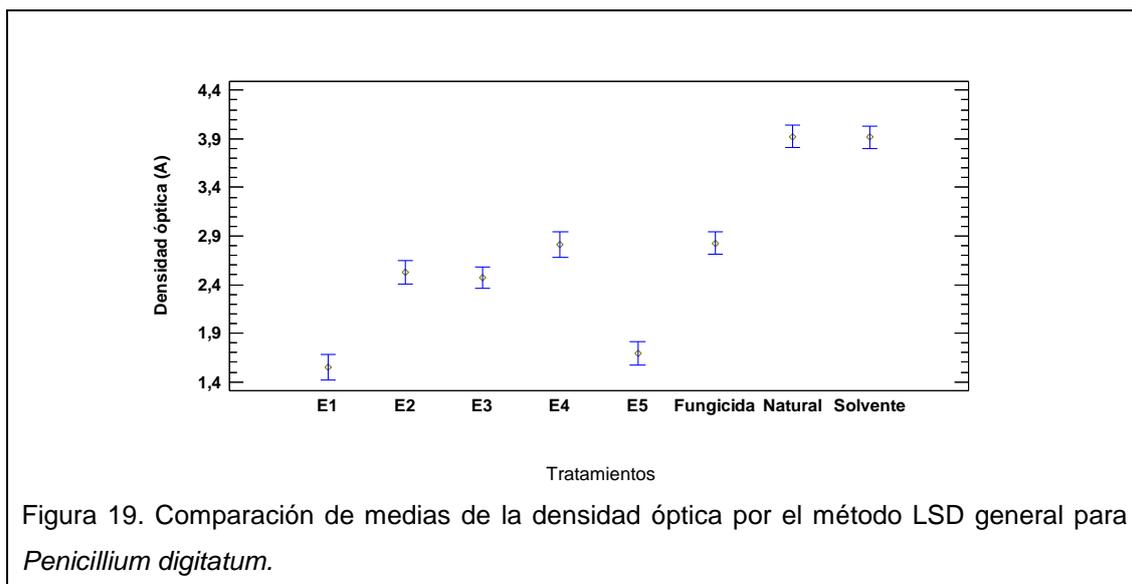
(55,07%) a concentraciones bajas (400 µg/ml) en comparación a otras plantas que de igual manera presentan compuestos antifúngicos.

Los datos obtenidos podrían inferirse a poblaciones más extensas de *Botrytis cinerea in vitro*, debido a que los datos, mediante la prueba de Shapiro-Wilk indicaron una distribución normal en los residuos para el extracto acuoso-a. con un 95% de confianza

4.6.3. *Penicillium digitatum*

Para elegir el extracto con un mayor efecto inhibitorio sobre *Penicillium digitatum* y que presentara una diferencia significativa en relación al solvente y el testigo natural, se realizó un ANOVA simple y posteriormente una comparación de medias con el método LSD. Los resultados obtenidos para evaluar los cinco extractos de cáscara de banano verde en este trabajo, presentaron una diferencia significativa entre los tratamientos. En efecto, un ANOVA simple y un análisis de rangos múltiples mediante el método del LSD permitieron determinar la diferencia entre extractos y la comparación de medias de lecturas de densidad óptica en cultivos *in vitro* de *Penicillium digitatum*.

El mejor tratamiento fue el extracto 1 (orgánico) con una densidad óptica de 1,54 A en comparación con el testigo que presentó una densidad óptica de 3,92 A como se observa en la figura 19. Sin embargo, al realizar un ANOVA para cada extracto (Orgánico y acuoso-a) se obtuvo el mismo valor-p (0,000) (Tabla 12). En este caso, se analizó cuál de los dos extractos presentan un bajo costo de producción y se escogió el extracto acuoso-a por ser el más económico en comparación al extracto orgánico como se presenta en la tabla 9.



En la tabla 12, el ANOVA descompone la varianza entre dos componentes: un componente entre el extracto acuoso-a, el solvente, el fungicida y el natural y un componente dentro de los tratamientos antes mencionados, en el cual el valor-p muestra un nivel de significancia estadística entre cada uno de los factores evaluados, con un 95% de confiabilidad. Debido a que el valor-p de los tratamientos (14 concentraciones del extracto orgánico, el solvente, el fungicida y el testigo natural) es menor a 0,05; se determina que existe una diferencia significativa entre las medias de la densidad óptica, directamente relacionada con el crecimiento de *Penicillium digitatum* en función de los tratamientos antes mencionados.

Tabla 12. ANOVA para análisis de varianza para *Penicillium digitatum* para el extracto acuoso-a (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56, 0,78, 0,39, 0,20, 0,10, 0,05) µg/ml, el solvente, el fungicida y el natural.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	61,4227	16	3,83892	29,97	0,0000
Entre tratamientos	13,5773	106	0,128088		
Total	75,0	122			

Al determinar una diferencia entre los tratamientos, se estableció la necesidad de comparar la absorbancia obtenida con respecto a las concentraciones del extracto orgánico, el fungicida y testigo natural. Con este propósito, se realizó un análisis de rangos múltiples mediante el método LSD, el cual determinó las medias que son diferentes entre ellas o presentan homogeneidad significativa (Figura 20) y se obtuvieron 10 grupos homogéneos. Se determinó una diferencia entre todas las concentraciones del extracto acuoso-a con respecto a la absorbancia del solvente y testigo natural (Figura 20). Reafirmando los datos obtenidos por el LSD, la figura 19 muestra el porcentaje de inhibición producida por el extracto acuoso-a (E5) sobre *Penicillium digitatum*, con 54,72% a una concentración de 400 µg/ml, mientras que el fungicida mostró un porcentaje de inhibición del 29,32%.

En la figura 20 hay un aspecto importante que recalcar ya que la agrupación de nivel (a) se mantiene hasta con 100 µg/ml. Esto significa que el extracto acuoso-a inhibe a *Penicillium digitatum* incluso a 100 µg/ml, siendo este dato importante para la potencial producción de este fungicida natural puesto que se necesitaría una cantidad menor de extracto para producir un mismo nivel de inhibición.

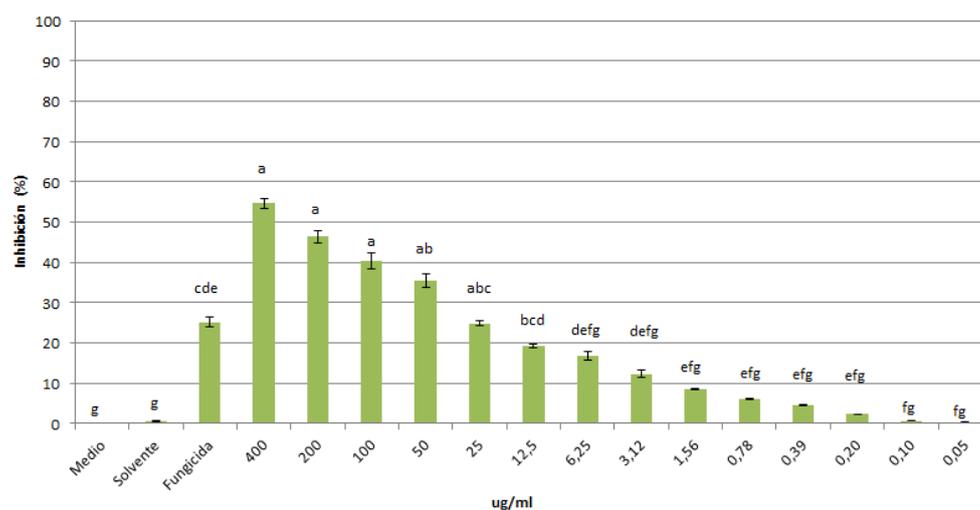


Figura 20. Inhibición de *Penicillium digitatum* causada por el extracto acuoso-a, el fungicida y el solvente de acuerdo a una agrupación por niveles generados por el método LSD.

Estos resultados concuerdan con los trabajos desarrollados por Guerrero, Solís, Hernández, Flores, y Sandoval (2007) quienes mencionan que el extracto obtenido con etanol de *Flourensia cernua* obtuvo un porcentaje de inhibición del 94,2% con una dosis de 500 µg/ml para el control de *Penicillium digitatum*. Esto demuestra que *Pencillium digitatum* puede ser inhibido en su mayoría por extractos que son obtenidos con solventes polares como el etanol y el agua.

En el caso del presente ensayo, los datos obtenidos no pueden inferirse a poblaciones más extensas de *Penicillium digitatum in vitro*, debido a que no presentó una distribución normal en los residuos para el extracto acuoso-a. El rechazo de esta hipótesis genera la necesidad de realizar mayor cantidad de muestras, debido a una alta variabilidad de los datos obtenidos en la determinación del crecimiento del hongo in vitro.

4.6.4. Porcentaje de inhibición del extracto obtenido de banano en madurez comercial sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*.

La figura 21 demuestra el porcentaje de inhibición causada por el extracto de cáscara de banano maduro sobre el crecimiento de los hongos patógenos estudiados. El porcentaje de inhibición del crecimiento es producido solo por el solvente más no por el extracto y se comprueba mediante el análisis de rangos múltiples usando el método LSD (Figura 21). Estos resultados muestran que no existe una diferencia significativa entre la densidad óptica del crecimiento del solvente con la densidad óptica del extracto acuoso-maduro.

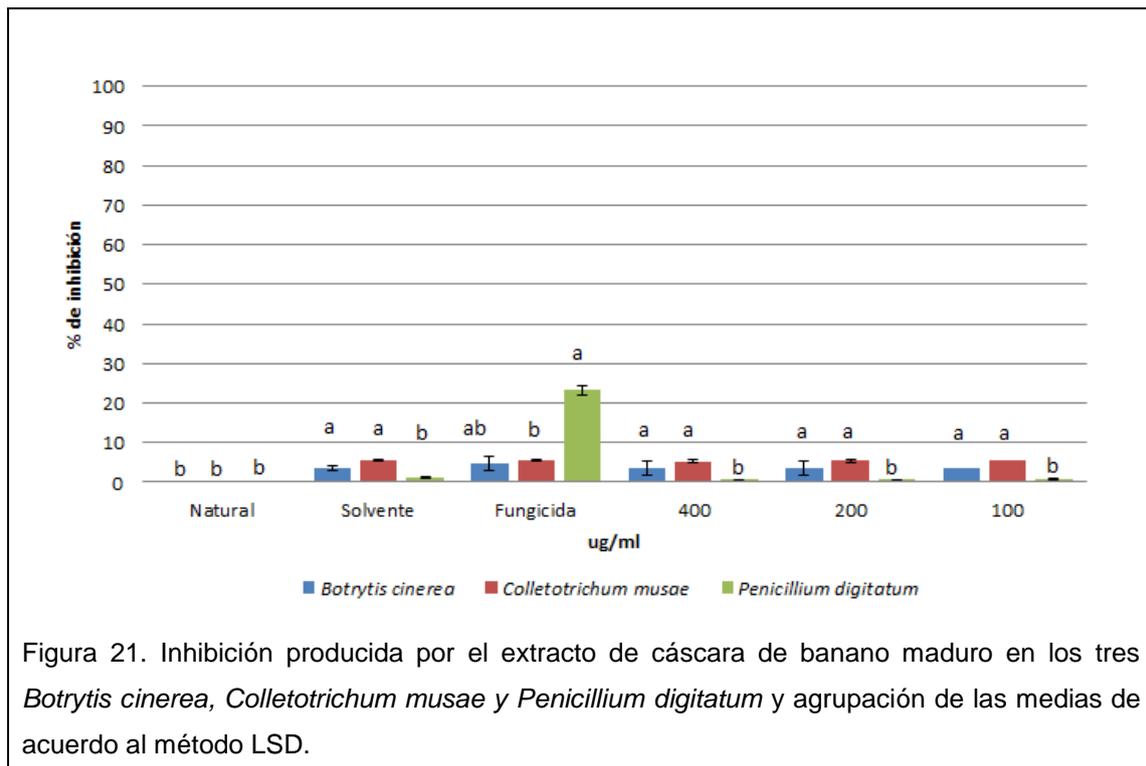


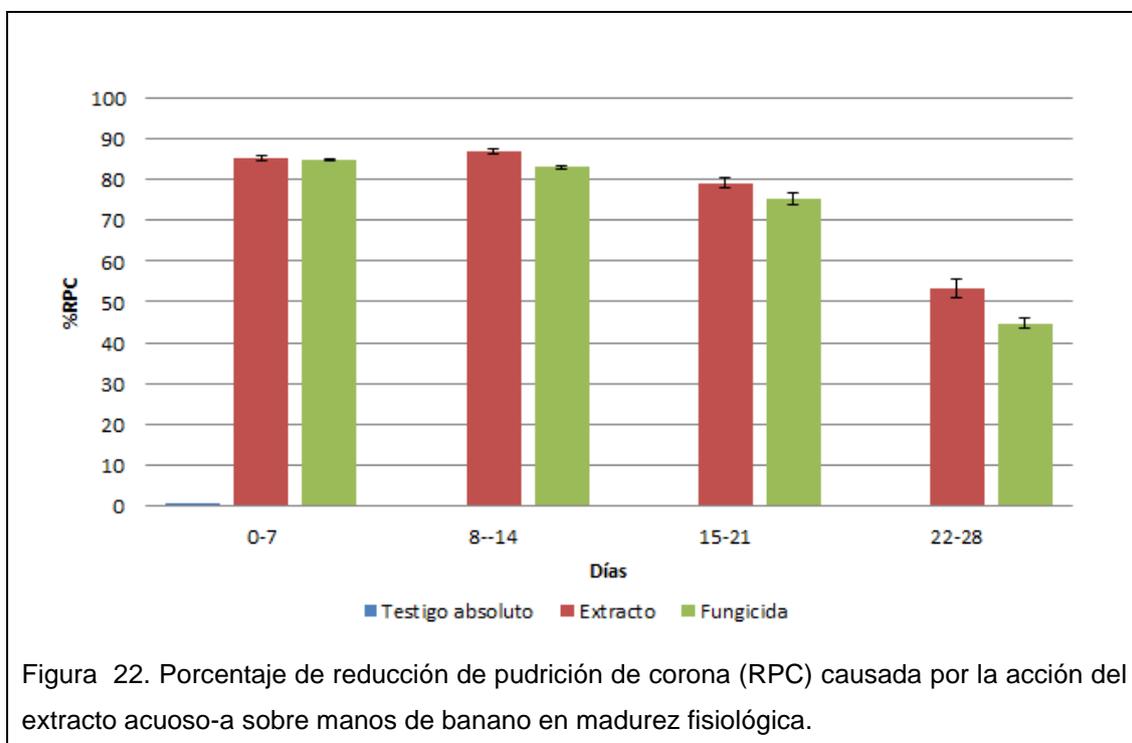
Figura 21. Inhibición producida por el extracto de cáscara de banana maduro en los tres *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum musae* y *Penicillium digitatum* y agrupación de las medias de acuerdo al método LSD.

Lii, Chang, y Young (1987) mencionan en sus trabajos que la conversión a carbohidratos simples en el proceso de maduración de *Musa paradisiaca* provoca la disminución de los metabolitos secundarios. Su transformación se debe a que los compuestos son convertidos a sustancias digeribles para consumo animal. En efecto, este estudio se corroboraría igualmente con Bejarano y Vejarano (2007) quienes demostraron en sus ensayos que no existe un efecto inhibitorio por parte de los compuestos provenientes de la cáscara de banana maduro sobre *Fusarium oxysporum*.

4.7. Evaluación del efecto biológico *in vivo* del extracto acuoso-a sobre *Colletotrichum musae*.

El índice de pudrición de corona se realizó de manera visual con la ayuda de la escala de severidad de pudrición de corona (figura 11) y el porcentaje de reducción de pudrición de corona se calculó mediante la fórmula citada por Alvindia y Kobayashi (2004) (Ecuación 11).

Los resultados comparativos de la severidad de ataque de *Colletotrichum musae* en banano bajo efectos de un fungicida, un tratamiento con el extracto acuoso-a y un testigo absoluto, se observa en la figura 22. La reducción en la pudrición de corona es inversamente proporcional al crecimiento del hongo. El extracto acuoso-a posee un efecto inhibitorio semejante a la del fungicida tradicional durante los 28 días de evaluación. En el caso del testigo absoluto, desde el período del día 0 al 7, no existió una reducción de pudrición de corona, corroborando que mientras existe una reducción en la pudrición de corona el hongo no se desarrolla.



Gracias a la solubilidad del principio activo del extracto acuoso-a, la aplicación en el fruto se realizó de manera homogénea. A una concentración de 400 µg/ml se obtuvo un 86,79% de reducción en la pudrición de corona a los 14 días. En los ensayos In vivo se pudo asociar la actividad biológica de los taninos presentes en la cáscara de banano verde sobre *Colletotrichum musae*, puesto que este hongo fue inoculado de manera artificial en las coronas de las manos de banano a una concentración de 10⁴ esporas/ml y de esta manera se

comprobó la actividad de los compuestos fenólicos sobre *Colletotrichum musae*.

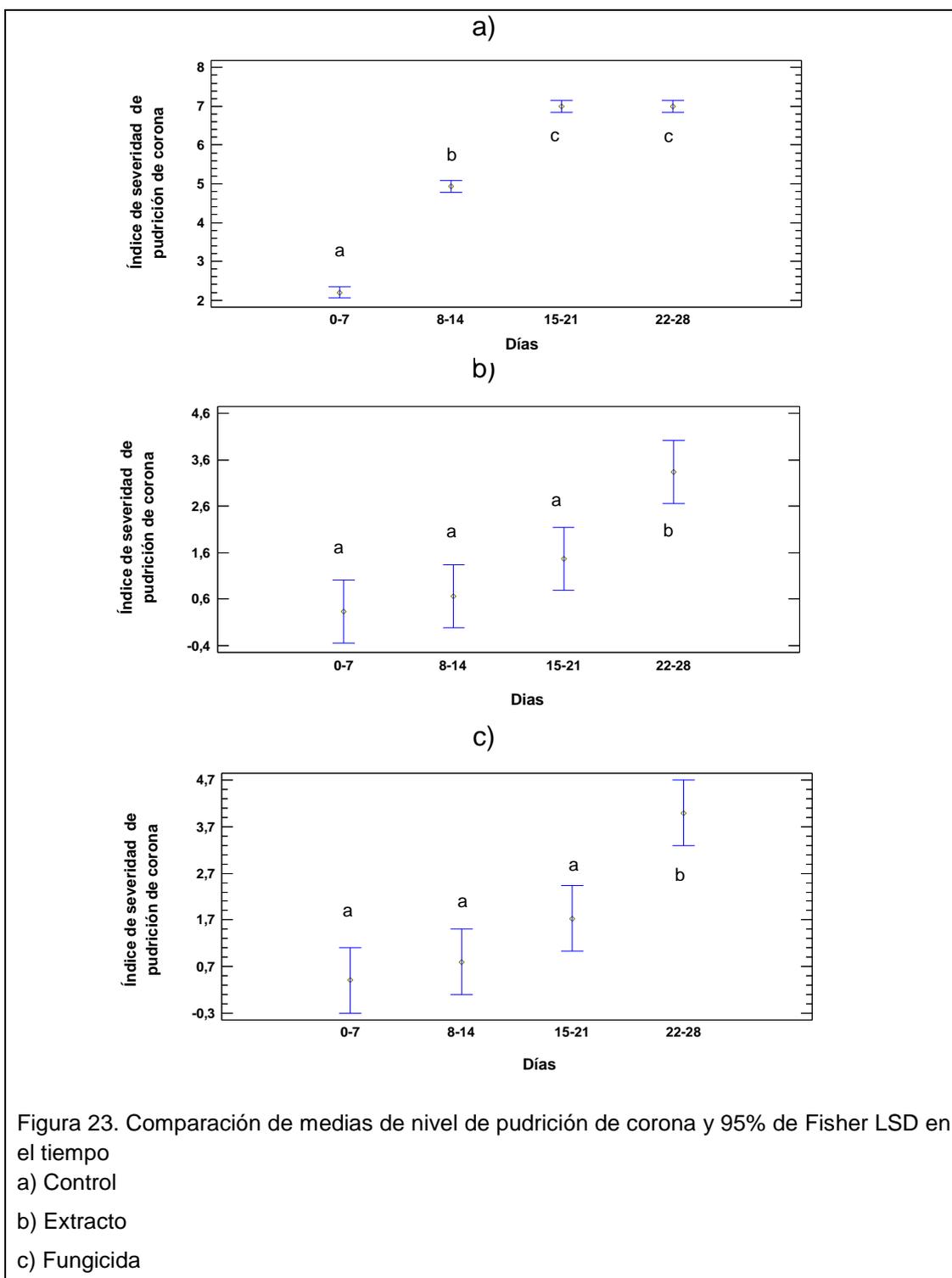
Alvindivia (2013) en sus experimentos, utilizó varias sales, de las cuales dos de ellas mostraron una gran reducción en la pudrición de corona; el carbonato de sodio con agua caliente, redujo un 87,99% la pudrición de corona y el hipoclorito de sodio redujo a 80,64% la pudrición de corona y al compararlo con el principio activo de un fungicida (thiabendazole) el cual presentó un 89,60% de reducción en la pudrición de corona.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se demuestra que los compuestos fenólicos del extracto acuoso-a poseen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Colletotrichum musae*. La inhibición causada por el extracto acuoso-a demuestra el potencial de este fungicida orgánico como alternativa de uso en poscosecha, debido a que el extracto fue obtenido a partir de desechos de banano y podrían ser aprovechados en una aplicación agroindustrial. De esta manera, se promueve la producción de fungicidas alternativos como controles biológicos de banano en el área de poscosecha.

La figura 23 demuestra el desarrollo de la pudrición de corona en el testigo absoluto y la inhibición de la enfermedad bajo el efecto del extracto y el fungicida durante 28 días. Puesto que los valores-p indican un valor menor a 0,05, esto muestra una diferencia estadística entre las medias de los tratamientos (cuartiles de tiempo) con un nivel de confianza del 95,0%. Mediante el método del LSD, se determinó cuál de los cuartiles serían estadísticamente similares entre sí y en función de cada tratamiento (Figura 23). Se obtuvieron 3 grupos homogéneos para cada tratamiento (Testigo, extracto, fungicida).

La figura 23.a, muestra el crecimiento exponencial del testigo, desarrollado hasta el nivel máximo de severidad (7). Con respecto al extracto y el fungicida, se puede evidenciar (Figura 23 b y c) que durante los primeros 21 días de almacenamiento de la fruta, no existe una diferencia en el progreso de la

enfermedad. Esto demuestra que los síntomas, tanto con la aplicación del extracto como del fungicida, los síntomas empiezan a aparecer posteriormente al cuartil 15-21 días.



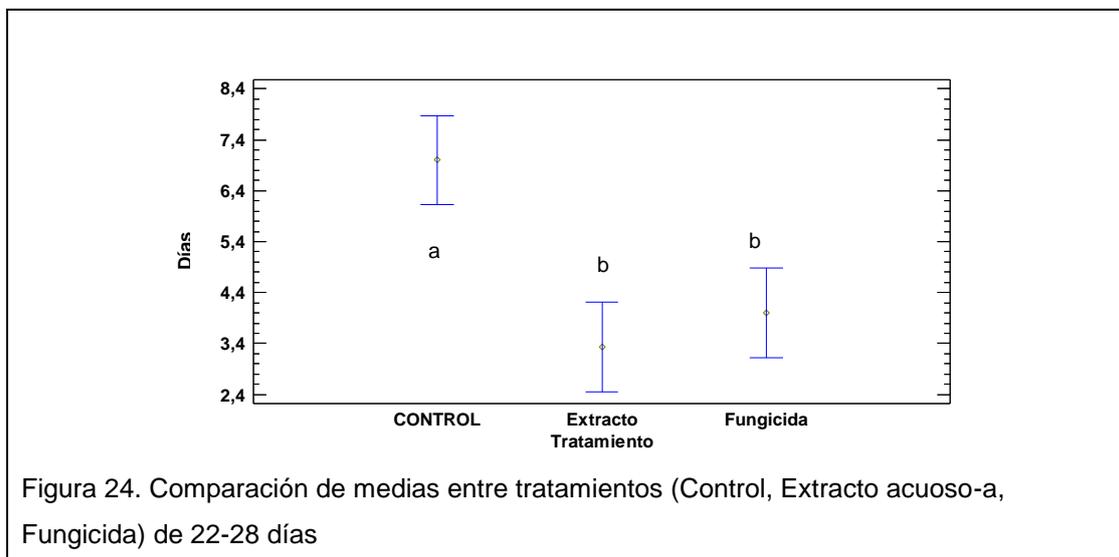
Cuando los bananos son cosechados en su madurez fisiológica y pasan al proceso de poscosecha, existen varios puntos posibles de contaminación de esporas de *Colletotrichum musae*. A pesar de que a las manos de banano se laven y se aplique un fungicida tradicional en la corona y las puntas de los dedos, existe un desarrollo de pudrición de corona. Al momento de llegar al destino final después de 18-20 días, los bananos son rechazados por la enfermedad antes mencionada, lo que ocasiona pérdida para el productor (Gonzabay, 2014).

Una vez que la fruta llega a su destino, son maduradas con etileno en cámaras de maduración artificial durante 5 días a 20°C con un porcentaje de humedad relativa entre 90 y 95% (Lassois, *et al.*, 2010). Luego de su maduración las manos de banano son llevadas a centros de venta de producto como tiendas o autoservicios, donde permanecen en percha durante 7 días como máximo (FAO, 2010). Los datos de este proyecto revelan que el extracto acuoso-a reduce la pudrición de corona del día 0 al 21, días en los cuales no existió una diferencia significativa de los síntomas presentes en los días 0-7 o en los días 15-21 (Figura 23-b). Esto implicaría que en el día 18 el tránsito del proceso de exportación del banano termina y con la aplicación del extracto acuoso-a, se lograría limitar los síntomas en nivel (1) de pudrición de corona. Mientras que durante los días 22 hasta los 28, los bananos son madurados y llevados a centros de venta, días en los cuales los resultados obtenidos presentan un nivel (4) de pudrición de corona de para el extracto acuoso-a en comparación con el testigo que llega a ese mismo nivel desde el día 10.

Es por eso que en base a los resultados obtenidos en el presente proyecto, se recomienda aplicar el extracto acuoso-a en la corona de las manos de banano antes de que sean empacadas para su comercialización.

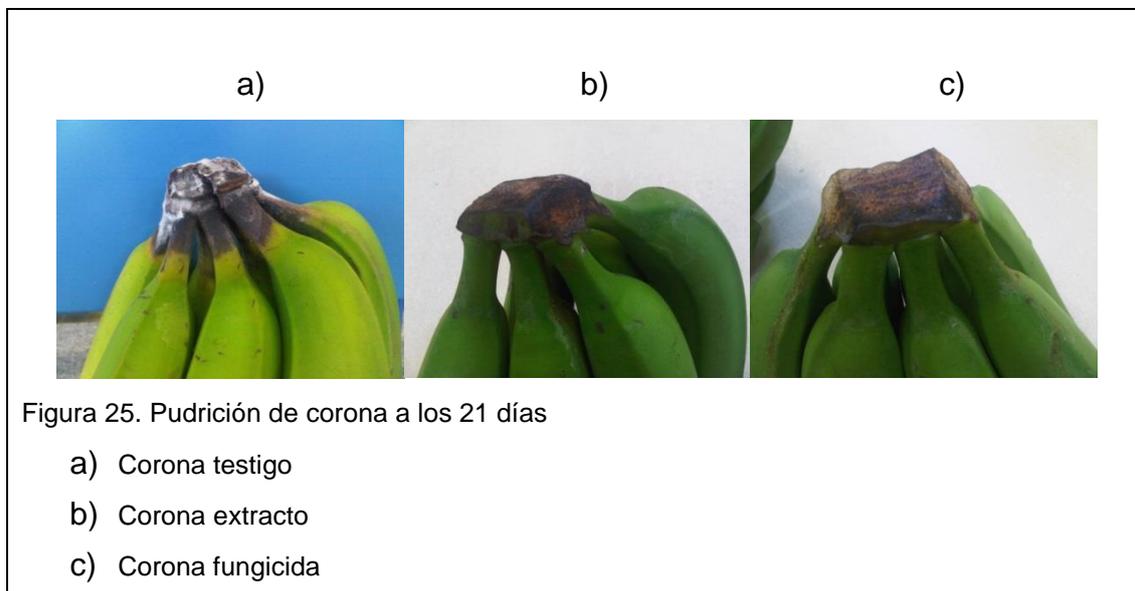
La figura 24 indica el análisis LSD con respecto al desarrollo de pudrición de corona entre el testigo, el extracto acuoso-a y el fungicida. Previamente, se realizó un ANOVA para los tratamientos antes mencionados y se obtuvo un valor-p menor a 0,05, lo cual demuestra que existe una diferencia significativa entre los tratamientos. El LSD muestra 2 grupos homogéneos. En los días 22 a

28 de almacenamiento, el extracto acuoso-a y el fungicida no presentan una diferencia estadística significativa, pero sí son diferentes con respecto al testigo. Los resultados del presente estudio son positivos para considerar como alternativa viable la utilización de fungicidas orgánicos obtenidos a partir de desechos, en este caso, del rechazo de banano para exportación. Incluso se demuestra que la actividad fungicida de los compuestos fenólicos presentes en el extracto acuoso-a puede igualar en efectividad de inhibición de pudrición de corona a los compuestos que conforman un fungicida tradicional. Por otra parte, al usar este tipo de controles orgánicos se promovería la exportación a diferentes mercados alrededor del mundo, los cuales incluyan interdicciones de uso de ciertas sustancias activas de síntesis química.



Al presentar el extracto acuoso-a un comportamiento similar al fungicida, se podría señalar que los principios activos del extracto llegan a presentar las mismas características inhibitoras que las del fungicida tradicional (carvacrol, cineol y borneol) y esta inhibición de la proliferación de síntomas se mantiene en el tiempo. No existe un estudio específico que relacione la actividad de la cáscara de banano sobre la enfermedad de pudrición de corona; no obstante, se puede mencionar el trabajo desarrollado por Hernández y Vásquez (2008) que demostraron la inhibición al 70% de *Colletotrichum gloeosporoides* causado por *Matricharia chamomilla*, *Thymus vulgaris* y de *Piper aduncum* en

condiciones in vitro y en plántulas, en comparación a un fungicida convencional, el cuál presentaba una inhibición del 85%.



En la figura 25.b se observa que la aplicación del extracto acuoso-a reduce la pudrición de corona, demostrando la efectividad del extracto obtenido a base de cáscara de banano verde cv Cavendish procedente del rechazo de exportación en condiciones de almacenamiento poscosecha. Los síntomas visuales son más acentuados en el testigo que en los tratamiento con extracto acuoso a y fungicida tradicional.

5. Conclusiones y Recomendaciones

5.1 Conclusiones

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que existe una diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos analizados (cinco extractos, catorce concentraciones, fungicida y testigo natural) sobre el crecimiento de los hongos patógenos *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*. En efecto, los resultados mostraron que algunos de los extractos inhibieron el desarrollo de los hongos antes mencionados en un 21,31%, 55,07 y 54,68% respectivamente. Sin embargo, es importante recalcar que los efectos de inhibición de los extractos dependen del tipo de hongo y de la concentración utilizada.

El extracto acuoso-a, fue el tratamiento que se destacó entre todos los extractos por el efecto biológico provocado sobre *Colletotrichum musae*. Este extracto presentó una inhibición *in vitro* del 21,31% a una concentración 400 µg/ml. Este porcentaje de inhibición se comparó con un fungicida comercial que mostró un 8,45% con respecto al testigo absoluto; demostrando así que el concentrado acuoso-a limita en mayor proporción el crecimiento del hongo que el fungicida orgánico. La actividad antifúngica del extracto acuoso radica en la gran presencia de taninos ya que estas sustancias son solubles en agua caliente. Por otra parte, el extracto acuoso obtenido de la cáscara de banano maduro no presentó un porcentaje de inhibición sobre *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*, ya que durante la maduración del fruto, los compuestos disminuyen o se transforman en otras sustancias.

La inhibición causada por el extracto depende del microorganismo y de la concentración utilizada. Sin embargo, la actividad antifúngica está basada en el efecto biológico de los metabolitos secundarios mencionados anteriormente. Es por eso que al igual que los ensayos de *Colletotrichum musae* el extracto acuoso-a muestra un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*.

Este hongo presentó una inhibición en su crecimiento *in vitro* del 55,07% a una concentración de 400 µg/ml.

Penicillium digitatum presentó una inhibición ligeramente mayor con el extracto orgánico, pero al ser este un extracto demasiado costoso, se estableció que el mejor extracto es el acuoso-a, por su actividad fungicida y su bajo costo de producción. Este hongo presentó una inhibición del 54,68% a una concentración de 400 µg/ml.

En base a las pruebas colorimétricas se demostró que los cinco extractos obtenidos a partir de cáscara de banano verde variedad Cavendish presentaban taninos concentrados. De esta manera, se relaciona la gran cantidad de compuestos fenólicos contenidos en la cáscara de banano en madurez fisiológica y un efecto biológico sobre el crecimiento de *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum*. Estos metabolitos secundarios se han asociado con la inhibición de síntesis de compuestos como la amilasa, componente estructural de la pared celular de los hongos.

En el ensayo *in vivo*, los resultados mostraron que el extracto acuoso-a reduce la pudrición de corona en un 86,79% durante tres semanas, tiempo en que los bananos terminan el tránsito de exportación y llegan a su destino para ser madurados artificialmente y vendidos a consumidores finales. Además se pudo evidenciar que el extracto acuoso-a tiene un comportamiento similar durante 28 días al compararlo con un fungicida convencional de producción orgánica. El potencial de este extracto es realmente importante a nivel de producción especialmente en poscosecha debido a que el extracto fue obtenido a partir del rechazo de exportación, el cual es considerado actualmente como un desperdicio. Al ser un desperdicio, el costo de producción es menor al de un fungicida tradicional.

El extracto acuoso-a, presentó un rendimiento del 55,02% con un costo de producción de \$ 0,98 por gramo. Esto permite considerar a este producto como

una alternativa para ser trasladada a una escala industrial, por la facilidad de obtención del extracto, y el costo de producción.

5.2. Recomendaciones

En base a los resultados obtenidos en este proyecto se recomienda que:

- En investigaciones futuras se analice analítica y cuantitativamente los compuestos químicos (HPLC) que se encuentran presentes en los extractos a utilizar, de esta manera se podrían conocer con exactitud cuáles son los compuestos inhibitorios y posteriormente realizar estudios de los modos de acción de las sustancias activas sobre los procesos metabólicos de los hongos.
- Es importante, como en el estudio realizado por Mokbel y Hashinaga, tomar en cuenta el uso de otro tipo de solventes apolares como la acetona para la extracción de los concentrados para establecer su efectividad y rendimiento y de igual manera es recomendable para estudios posteriores investigar con otro tipo de plantas o frutos tropicales del Ecuador.
- Para obtener la mayor cantidad de compuestos activos en el extracto, es necesario que la cáscara del banano se encuentre en madurez fisiológica debido a que los compuestos fenólicos disminuyen su concentración mientras el fruto madura.
- Es necesario imitar las condiciones de transporte como la temperatura, la cual no debe ser menor a 12°C para evitar el quemado por frío y se deberá empacar los clusters con sus coronas totalmente secas. Para comprobar la efectividad del extracto, es necesario que se evalúe con otro de tipo de hongos poscosecha como *Fusarium sp.* e incluso con bacterias.

- Para una determinación objetiva del grado de inhibición de los extractos, es necesario que el porcentaje de solvente a utilizar en las pruebas *in vitro* esté en una baja concentración, así el porcentaje de inhibición será producido por las sustancias activas del extracto y no del solvente.
- Al realizar la evaporación de la humedad en los extractos debe realizarse siempre con un liofilizador y no con un deshidratador, ya que de esta forma se evitan pérdidas de sustancias activas en los concentrados, a causa de la eliminación de agua por medio de la sublimación.

REFERENCIAS

- Agrios, G. (1999). *Plant pathology* (Tercera ed.). San Diego: United Kingdom.
- Agrios, G. (2005). *Fitopatología* (Quinta ed.). Ciudad de México, México: Limusa.
- Alvindia, D., & Kobayashi, T. (2004). Inhibitory influence of inorganic salts on banana postharvest pathogens and preliminary application to control crown rot. *The Phytopathological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo*, 70, 61-65.
- Alvindia, D. (2013). An integrated approach with hot water treatment and salt in the control of crown rot disease and preservation of quality in banana. *International Journal of Pest Management*, 59(4), 271-278.
- Anthony, S., Abeywickrama, K., Dayananda, R., Shanthi, W., & Arambewela, L. (2004). Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. *mycopathologia*, 157, 91-97.
- Aristegui, B. (2002). El Reino de los Hongos. *Iberoamericana Micología*, 1-4.
- Ávalos, A., & Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *REDUCA*, 2(3), 119-145.
- BCE. (2007). *Banano*. Recuperado el 12 de Junio de 2015, de <http://www.bce.fin.ec/index.php/component/search/?searchword=banano&searchphrase=all&Itemid=354>
- BCE. (2013). *Estadísticas. Banco Central del Ecuador*. Recuperado el 1 de Junio de 2015, de http://www.portal.bce.fin.ec/vto_bueno/seguridad/ComercioExteriorEst.jsp
- Bejarano, M., & Vejarano, X. (2007). Algunos ésteres con actividad fungistática presenets en la cáscara del plátano Harton maduro. *Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 77-103.
- Benito, E., Arranz, M., & Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Iberoamericana de Micología*(17), S43-S46.

- Bushra, S., Farooq, A., Muhammad, R., & Shahzad, A. (2008). Antioxidant potential of extracts from different agro wastes: Stabilization of corn oil. *Grasas y Aceites*, 59(3), 205-217.
- Castellanos, R., Ruiz, C., Peña, R., Rodriguez, L., Torruco, G., & Ortiz, M. (2005). *Anuario de Historia* (Vol. I). Villahermosa, Tabasco, México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
- Castro, A. (2008). *Composición química del aceite esencial de las hojas de Erythroxylum novogranatense (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a Streptococcus mutans*. Recuperado el 25 de 06 de 2015, de Repositorio de Tesis digitales: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/789>
- Cerón, I., & Cardona, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cascara de naranja. *SciELO*, VII(13), 65-86.
- Cerutti, M., & Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. *Redalyc*, VII(12), 149-155.
- Chaves, N., & Wang, A. (2004). Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomia Costarricense*, 28(2), 73-85.
- Cos, P., Vlietinck, A., Berghe, D. V., & Maesa, L. (2006). Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *Ethnopharmacology*, 106, 290-302.
- Da Silva, J., Silva, J., Nascimento, S., Daluz, S., Meireles, E., Alves, C. R., & Maia, J. (2014). Antifungal Activity and Computational Study of Constituents from *Piper divaricatum* Essential Oil against *Fusarium* Infection in Black Pepper. *Molecules*, 19, 17926-17942.
- Diario Oficial, U. E. (2005). Reglamento (CE) NO 396/2005 del parlamento Europeo y del consejo de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 1-70.

- Espitia, C. (2011). *Universidad Nacional de Colombia*. Recuperado el 4 de Enero de 2016, de Repositorio de tesis: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4264/1/05598931.2011.pdf>
- FAO. (2010). *Botrytis cinerea: Rosas y frutos rojos*. Obtenido de <http://www.fao.org/in-action/good-agricultural-practices-help-raise-farmers-incomes-in-lao-pdr/es/>
- FAO. (2010). *Frutos cítricos: Penicillium digitatum*. Recuperado el 22 de 08 de 2015, de <http://www.fao.org/soils-2015/news/news-detail/es/c/319899/>
- Ferro, E. (2008). *OBTENCION Y EVALUACION DE EXTRACTOS ACUOSOS SOLUBLES DE CORTEZA DE LAPACHO (Tabebuia sp.) Y DE UNA MEZCLA DE AMBAY (Cecropia adenopus), JAGUARUNDÍ (Piper fulvescens) Y KA'A HE'E (Stevia rebaudiana)*. Buenos Aires: TEAS.
- Finlay, A., & Brown, A. (1993). The relative importance of Colletotrichum musae as a crown-rot pathogen on Windward Island bananas. *Plant pathology*, 42, 67-74.
- Frisvad, J., & Samson, R. (2004). Polyphasic taxonomy of Penicillium subgenus Penicillium. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *STUDIES IN MYCOLOGY*(49), 1-174.
- Garcés, A. (2004). Detoxificación de banano verde. *Lasallista de Investigación*, 1(1), 48-55.
- Gonzabay, R. (2014). Cultivo de banano en el Ecuador. *AFESE*(58), 113-142.
- Greene, G., & Goss, R. (1963). Fungi associated with crown rot of boxed bananas. *Phytopathology*, 53, 271-275.
- Greene, G., & Morales, C. (1968). *Determinación de la presencia de sustancias fungitóxicas en leche y cáscara de banano*. Caracas: UNELLEZ.
- Guerrero, E., Solís, S., Hernandez, F., Flores, A., & Sandoval, V. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de Flourensia cernua D.C. en Patógenos de Postcosecha: Alternaria alternata (Fr.:Fr.) Keissl., Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. y Penicillium digitatum (Pers.:Fr.) Sacc. *Redalyc*, 25(1), 48-53.
- Gutiérrez, H., & De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos* (Segunda ed.). México, D.F.: Mc Graw Hill.

- Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*(11), 137-147.
- Hamilton-Kemp, T., Archbold, D., & Loughrin. (2000). Stimulation and inhibition of fungal pathogens of plants by natural volatile phytochemicals and their analogs. *Current Topics in Phytochemistry*, 4, 95-104.
- Herath, H., & Abeywickrama, K. (2008). In vitro application of selected essential oils and their major components in controlling fungal pathogens of crown rot in Embul banana (*Musa acuminata* – AAB). *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 440-447.
- Hernández, E., & Vásquez, J. (2007). Evaluación de cuatro extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides*) en tomate de árbol. *SciELO*(5), 86-92.
- Hubbard, N., Pharr, M., & Huber, S. (1990). Sucrose Phosphate Synthase in Sucrose Biosynthesis in Ripening Bananas and Its Relationship to the Respiratory Climacteric. *Plant Physiol*, 94, 201-208.
- INEC. (2014). *Aplicativo Agroalimentarias*. Recuperado el 27 de Agosto de 2015, de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/cadenas-agroalimentarias/>
- Johanson, A., & Blasquez, B. (1992). Fungi associated with banana crownrot on field-packed fruit the Windward Islands and assessment of their sensivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz and imazail. *Crop Prot*, 79-83.
- Kouassi, H., Bajji, M., Brostaux, Y., Zhiri, A., Samb, A., Lepoivre, P., & Haïssam, M. (2012). Development and application of a microplate method to evaluate the efficacy of essential oils against *Penicillium italicum* Wehmer, *Penicillium digitatum* Sacc. and *Colletotrichum musea* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, three postharvest fungal pathogens of fruits. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ*, 16(3), 325-336.
- Kuhar, F., Castiglia, V., & Papinutti, L. (2013). Reino Fungi: morfologías y estructuras de los hongos. *Boletín Biológica*(28), 11-18.
- Lassois, L., Bastiaanse, H., Chillet, M., Jullien, A., Jijakli, M., & De Lapeyre de Bellaire, L. (2009). Hand position on the bunch and source–sink ratio

- influence the banana fruit susceptibility to crown rot disease. *Annals of Applied Biology*, 221-229.
- Lassois, L., Jijakli, M. H., Chillet, M., & De Lapeyre de Bellaire, L. (2010). Crown rot of bananas. Preharvest factors involved in postharvest disease development and integrated control methods. *Plant disease*, 94(6), 648-658.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales* (3 ed.). San José, Costa Rica: Agroamérica del IICA.
- Lii, C., Chang, S., & Young, Y. (1987). Investigation of the physical and chemical properties of bananas starches. *Journal of food science*, 47, 1493-1497.
- López, G., & Gómez, F. (2014). Propiedades funcionales del plátano (*Musa* sp). *Med UV*, 22-26.
- Lukezic, F., Kaiser, W., & Martínez, M. (1967). The incidence of crown rot of boxed bananas in relation to microbial populations of the crown tissue. *Can. J. Bot*, 45, 413-421.
- Ly, J. (2004). Bananos y plátanos para alimentar cerdos: aspectos de la composición química de las frutas y de su palatabilidad. *Revista Computadorizada de producción porcina*, XI(3).
- Macarisin, D., Cohen, L., Eick, A., Rafael, G., Belausov, E., Wisniewski, M., & Droby, S. (2007). *Penicillium digitatum* Suppresses Production of Hydrogen Peroxide in Host Tissue During Infection of Citrus Fruit. *Phytopathology*, 97(11), 1491-1500.
- MAGAP. (2011). *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*. Recuperado el 2 de Junio de 2015, de Resultados provinciales del III Censo Nacional Agropecuario. Geoportal del Agro: <http://geoportal.agricultura.gob.ec/descarga/category/censos-sectoriales>
- Manjarrés, K., Castro, A., & Rodríguez, E. (2010). Producción de lacasa utilizando *Pleurotus ostreatus* sobre cáscaras de plátano y bagazo de caña. *Revista Lasallista de Investigación*, 7(2), 51-65.
- Mariendfeld. (2015). *Superior Mariendfeld*. Recuperado el 12 de Octubre de 2015, de Superior Mariendfeld:

https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjMLW7dbKAhXH7R4KHUG3COYQFgggMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.marienfild-superior.com%2Findex.php%2Fmanuals.html%3Ffile%3Dtl_files%2FInfo%2FAnleitungen%2520und%2

- Marin, D., Sutton, T., Blankenship, S., & Swallow, W. (1996). Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. *Plant Disease*, 525-528.
- McGrath, M. (2004). ¿Qué son los fungicidas? *The Plant Health*, 67-89.
- Mercader, G., Flores, S., González, G., & Sanfuentes, E. (2006). Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. *Bosque*, 27(2), 126-134.
- Meredith, D. (1971). Transport and storage diseases of bananas: Biology and control. *Trop. Agric*, 48, 35-50.
- Mokbel, M., & Hashinaga, F. (2005). Antibacterial and antioxidant activities of banana (*Musa*, AAA cv Cavendish) fruits peel. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1(3), 125-131.
- Molsalve, J., Medina, V., & Ruiz, A. (2006). Producción de etanol a partir de la cáscara de banano y de almidón de yuca. *Dyna*, 150, 21-27.
- Mukherjee, O., Joychandra, S., Babita, M., Nalini, L., Irabanta, N., & Lee, S.-G. (2008). Synthesis and in vitro evaluation of the antifungal activities of dihydropyrimidinones. *ELSEVIER*, 18, 6462-6467.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica* (Sexta ed.). Barcelona, España: Elsevier España.
- Orchard, J., & Dabzie, B. (1997). *Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: Criterios y métodos*. Pensilvania: Publicaciones The World.
- Pérez, L. (2009). Enfermedades de banano y plátano: Análisis retrospectivo y perspectivas. *Producción agropecuaria*, 2(1), 11-18.

- Pineda, M., Pineda, D., Labarca, J., Ulacio, D., Paredes, C., & Casassa, A. (2009). Micobiota del suelo asociada al cultivo del plátano (*Musa AAB* cv. Hartón) en bosque seco tropical del Sur del Lago de Maracaibo, Venezuela. *UDO Agrícola*, IX(1), 158-165.
- ProEcuador. (2013). *Dirección Inteligencia Comercial, Inversiones*. Recuperado el 26 de 10 de 2014, de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/09/PROEC_AS2013_BANANO.pdf
- Ramírez, S., López, O., Guzmán, T., Munguía, S., & Espinosa, S. (2011). Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et ál. *Tecnología en marcha*, 24(2), 3-17.
- Ranasinghe, L., Jayawardena, B., & Abeywickrama, K. (2002). Fungicidal activity of essential oils of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) Merr et L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 208-211.
- Robinson, J., & Galán, V. (2012). *Plátanos y Bananos* (Segunda ed.). Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa.
- Shillingford, C. (1977). Control of banana fruit rots and of fungi that contaminate washing water. *Trop. Sci.*, 19, 197-203.
- Simmonds, J. (1963). Studies in the latent phase of *Colletotrichum* species causing ripe rots of tropical fruits. *Queensl. J. Agric. Anim. Sci*, 20, 373-424.
- Soto, M. (1998). *Bananos, Cultivo y Comercialización*. (Segunda ed.). San José, Costa Rica: LIL, S.A.
- Stanier, R., & Villanueva, J. (1996). *Microbiología* (Segunda ed.). Barcelona, Bogotá, Buenos Aires, Caracas, México: Reverté.
- Sutton, G., & Peng, G. (1993). Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Phytopathology*(83), 615-621.
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.

- Uurú. (2013). *Información de exportación de la empresa Uurú*. Recuperado el 13 de Junio de 2015, de <http://www.uuru.de/en/legal-notice.html>
- Vásquez, A., Alvarez, E., López, J., Wall, A., & De la Rosa, L. (2012). Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *TECNOCIENCIA*, VI(2), 84-93.
- Velásquez, Á. (2004). Extracción de taninos presentes en el banano verde. *Revista Sallalista de Investigación*, 1(2), 17-22.
- Vidal, & Pérez, L. (2002). Aspectos de la biología de *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) v. arx y *Fusarium pallidroseum* (Cooke) Saccardo, agentes causales de la pudrición de corona de los bananos (*Musa* spp) en Cuba. *Fitosanidad*, 6(1), 3-10. *Fitosanidad*, 6, 3-10.
- Villa, Y., & Espín, N. (2010). Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica. *Politécnica*, 31(1), 70-74.
- Visintin, G., Fállico, L., & García, B. (2010). Manejo de mohos poscosecha de cítricos mediante antagonistas microbianos. *Ciencia, docencia y tecnología*(40), 187-240.
- Whiteside, J., Garnsey, S., & Timmer, L. (1988). Compendium of citrus diseases. *The American Phytopathological Society*, 2-36.

ANEXOS

ANEXO 1. Validación de supuestos de los residuos

Normalidad

Para demostrar la normalidad de datos en un diseño se debe graficar como un X-Y, si se observa que los residuos tienen una tendencia en línea recta, se comprueba la normalidad del supuesto.

- Prueba de Shapiro-Wilks

Prueba basada en la comparación de los cuartiles de la distribución normal ajustada a los datos.

H_0 : Los datos proceden de una distribución normal

H_A : Los datos no proceden de una distribución normal

Estadístico:

$$W = \frac{1}{(n-1)S^2} \left[\sum_{i=1}^k a_i (X_{(n-i+1)} - X_{(i)}) \right]^2 \quad \text{(Ecuación 9)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Donde;

S: es la varianza muestral

Homocedasticidad

Al graficar el supuesto de que todos los tratamientos tienen la misma varianza, en Y_{ij} va en el eje de las x y los residuos en eje de las y, si los datos se logran distribuir aleatoriamente, se verifica la varianza constante.

- Prueba de Levene para homogeneidad de varianzas

Al probar la normalidad de los tratamientos, es necesario probar la varianza mediante la hipótesis:

$$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \dots = \sigma_k^2 = \sigma^2$$

$$H_A: \sigma_i^2 \neq \sigma_j^2 \text{ para algún } i \neq j \quad \text{(Ecuación 10)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

Siendo el estadístico:

$$X_0^2 = 2,3026 \frac{q}{c} \quad \text{(Ecuación 11)}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

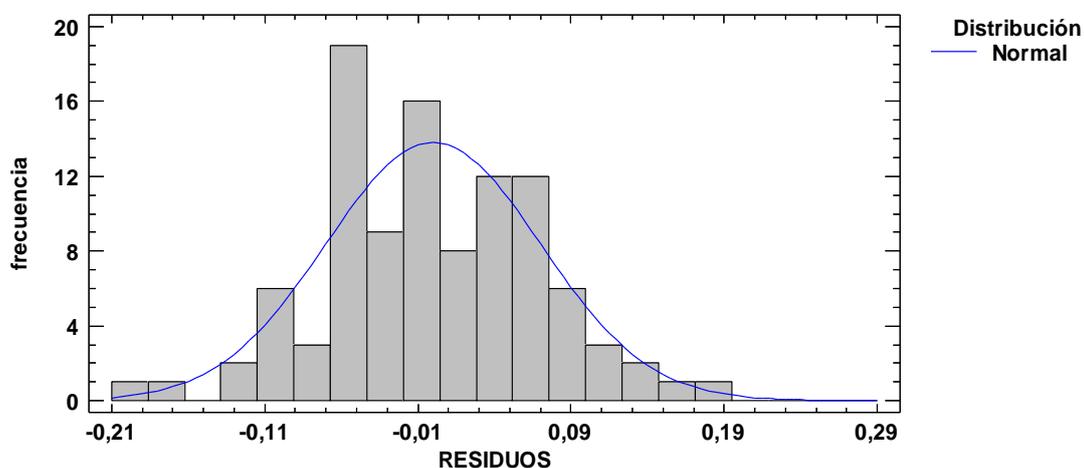
X_0^2 : sigue una distribución ji-cuadrada con k-1 grados de libertad

ANEXO 2. ANOVA de comparación de la densidad óptica para *Colletotrichum musae*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamientos	16,0197	72	0,222495	1,49	0,0082
Intra Tratamientos	87,4701	584	0,149778		
Total (Corr.)	103,49	656			

ANEXO 3. Histograma de distribución normal para *Colletotrichum musae*

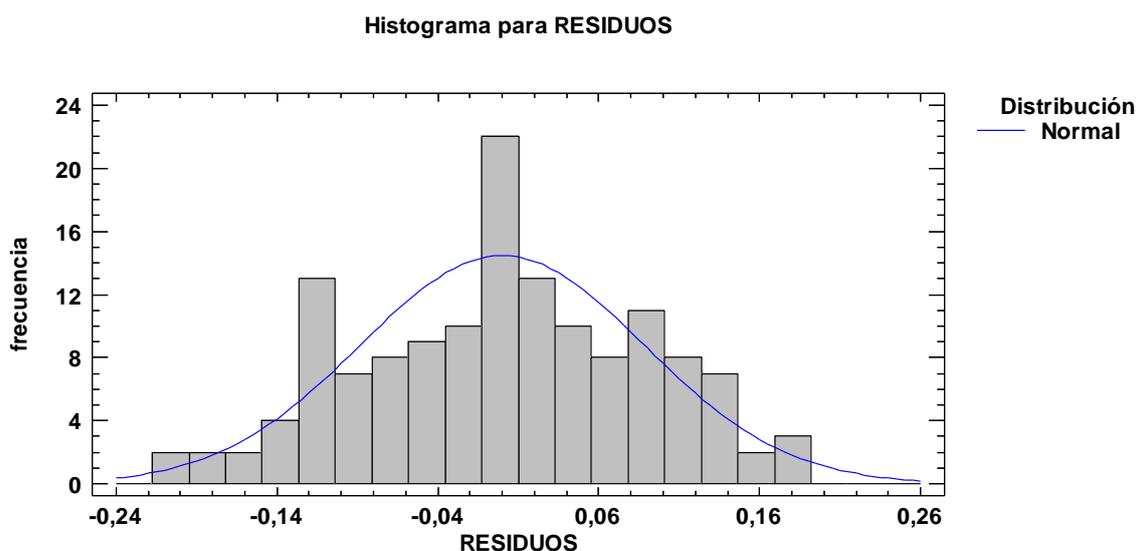
Histograma para RESIDUOS



ANEXO 4. ANOVA de comparación de la densidad óptica para *Botrytis cinerea*

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>GI</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamientos	15,0079	7	2,14399	26,83	0,0000
Intra Tratamientos	4,71527	59	0,0799198		
Total (Corr.)	19,7232	66			

ANEXO 5. Histograma de distribución normal para *Botrytis cinerea*



ANEXO 6. ANOVA de comparación de la densidad óptica para *Penicillium digitatum*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	44,8835	7	6,41193	112,36	0,0000
Intra Tratamientos	3,30983	58	0,0570661		
Total (Corr.)	48,1933	65			

ANEXO 7. ANOVA de comparación de la densidad óptica del extracto de cáscara madura sobre *Botrytis cinerea*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	0,204735	5	0,040947	11,33	0,0000
Intra Tratamientos	0,16265	45	0,00361444		
Total (Corr.)	0,367385	50			

ANEXO 8. ANOVA de extracto de cáscara madura sobre *Colletotrichum musae*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre Tratamientos	0,251478	5	0,0502956	36,64	0,0000
Intra Tratamientos	0,0658884	48	0,00137268		
Total (Corr.)	0,317367	53			

ANEXO 9. ANOVA de extracto de cáscara madura sobre *Penicillium digitatum*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Tratamientos	3,84597	5	0,769194	35,32	0,0000
Intra Tratamientos	0,892817	41	0,021776		
Total (Corr.)	4,73879	46			

ANEXO 10. Test de Friedman para ensayo in vivo. Tiempo de crecimiento en el testigo

	Tamaño de Muestra	Rango Promedio	Estadístico	Valor-P
0-7	15	1,0	45,0444	9,05363E-10
8-14	15	2,0		
15-21	15	3,5		
22-28	15	3,5		

ANEXO 11. Test de Friedman para ensayo in vivo. Tiempo de crecimiento en el extracto

	<i>Tamaño de Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0-7	15	1,76667	25,9515	0,00000976324
8-14	15	2,03333		
15-21	15	2,6		
22-28	15	3,6		

ANEXO 12. Test de Friedman para ensayo in vivo. Tiempo de crecimiento en el fungicida

	<i>Tamaño de Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>	<i>Estadístico</i>	<i>Valor-P</i>
0-7	15	1,66667	36,757	5,17957E-8
8-14	15	2,0		
15-21	15	2,43333		
22-28	15	3,9		

ANEXO 13. ANOVA de desarrollo de pudrición de corona para los diferentes tratamientos

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Tratamientos	114,444	2	57,2222	10,04	0,0003
Intra Tratamientos	239,333	42	5,69841		
Total (Corr.)	353,778	44			