



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN IN VITRO DE EXTRACTOS DE CÁSCARA DE BANANO
PARA CONTROL DE RHIZOPUS SPP., DURANTE POSCOSECHA EN
TOMATE (*Solanum lycopersicum*)



AUTORA

Melany Maribel Reinoso Paredes

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE EXTRACTOS DE CÁSCARA DE BANANO PARA
CONTROL DE *RHIZOPUS SPP.*, DURANTE POSCOSECHA EN TOMATE
(*SOLANUM LYCOPERSICUM*).

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

Profesor Guía

Ph.D. Mauricio Andrés Racines Oliva

Autora

Melany Maribel Reinoso Paredes

Año

2017

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”.

Mauricio Andrés Racines Oliva
Doctor of Bioscience Engineering
Cl.: 171090216-2

DECLARACIÓN PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los trabajos de titulación”.

María Raquel Meléndez Jácome
Magister en Protección Vegetal
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 ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

Melany Maribel Reinoso Paredes

CI.: 1726887951

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y la Virgen por sus infinitas bendiciones, a mis papis y ñaños por ser mi fuerza, ejemplo de lucha y por apoyarme guiándome siempre a lo largo de mi vida, a mi amor por ser mi compañero fiel y estar conmigo en la realización de esta tesis e impulsarme a culminar cada paso que he dado. Agradezco al Ing. Mauricio Racines e Ing. Raquel Meléndez por guiarme en la culminación de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis papis por ser la razón y el motor de mi vida, por apoyarme en cada buena y mala decisión tomada por ser los mejores padres y amigos. Todo lo que soy les debo a ustedes y cada logro alcanzado es por ustedes. Les amo demasiado.

RESUMEN

El presente trabajo de titulación fue realizado con el objetivo de evaluar el efecto biológico de los extractos obtenidos a partir de la cáscara de banano verde *Musa paradisiaca* en condiciones *in vitro*; para la obtención de un fungicida orgánico como alternativa de uso de los desechos del banano para su uso sobre hongos fitopatógenos presentes en tomate de mesa para una futura aplicación en la etapa poscosecha. Estos extractos fueron elaborados con agua y solventes polares con el fin de ser aplicados sobre dos cepas de *Rhizopus spp.* Se obtuvieron tres tipos de extractos diferentes elaborados con tres tipos de solventes: extracción caliente con agua, extracción fría con etanol y cloroformo. Se evaluó 7 dosis de etanol sobre las cepas de hongos 1 y 2 para conocer la dosis mínima de inhibición del solvente sobre los hongos. Los resultados mostraron que la dosis de 0,25 % del solvente no inhibía el crecimiento del hongo.

Los resultados obtenidos en el estudio muestran la acción fungicida de los extractos aplicados en ciertas aplicaciones. El extracto obtenido por método de extracción en caliente con agua mostró la mayor inhibición del crecimiento de las cepas 1 y 2 de la especie *Rhizopus spp.*, el cual inhibió el crecimiento de cada hongo en 25,22 % y 31,51 % respectivamente. Para el estudio se usaron 14 diluciones dobles consecutivas para cada extracto partiendo de la dosis 400 µg/ml como la mayor y 0,05 µg/ml como la menor. Los mayores porcentajes de inhibición alcanzados se lograron con la máxima concentración de los extractos (400 µg/ml). La acción inhibitoria de los extractos se debe a la presencia de compuestos activos presentes en la cáscara de banano en estado de madurez fisiológica, con respecto al control y al fungicida tradicional.

ABSTRACT

This project degree was realized with the main aim of evaluate the biological in vitro effect of extracts obtained from green banana peel *Musa paradisiaca* The purpose being to obtain an organic fungicide as an alternative for the use of banana industry waste to control phytopathogenic fungi found in tomato post-harvest stage. These extracts were obtained with polar solvents and tested on two strains of *Rhizopus spp.* Three types of extracts were therefore selected using the different solvents, resulting in the following extractions methods: hot extraction with water, cold extraction with ethanol and cold extraction with chloroform. Seven doses of ethanol were evaluated on the fungal strains 1 and 2 to know the minimum dose of inhibition of the solvent on the fungi. The results showed that the 0.25% dose of the solvent did not inhibit the growth of the fungus. The outcome achieved showed the extract's fungicide action, where the major inhibition of growth was found in aqueous extract mainly for the control of the 1 and 2 fungi strains which inhibited the growth about 25.22% and 31.51 %, respectively. In the present research, 14 consecutive double dilutions for each extract were used, taking into account that the initial and therefore higher dose contained 400 µg/ml and the final and therefore lesser dose was 0,05 µg/ml. The highest inhibition percentages were shown with the highest extract concentration (400 µg/ml). The inhibitory actions of the obtained solutions were caused by the active compounds present in physiological mature green banana peel.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico	4
2.1. Generalidades del cultivo de tomate de mesa (<i>Solanum lycopersicum</i>).....	4
2.1.1. Origen, distribución, características y evolución del cultivo de tomate de mesa.....	4
2.1.2. Importancia del tomate de mesa en Ecuador y en el mundo.....	5
2.1.3. Variedades de tomate de mesa de importancia en Ecuador.....	7
2.2. Enfermedades y agentes causales de frutos en poscosecha.....	8
2.2.1. Morfología de hongos de importancia en poscosecha.....	8
2.2.2. Descripción morfológica del género <i>Rhizopus spp.</i>	10
2.3. Fungicidas biológicos desarrollados a base de extractos vegetales usados en microorganismos.....	11
2.3.1. Modo de acción de los fungicidas.....	11
2.3.2. Antifúngicos obtenidos de plantas.....	12
2.3.3. Antifúngicos obtenidos de plantas de la división <i>Magnoliophyta</i>	13
2.3.4. Antifúngicos extraídos de plantas del Orden <i>Zingiberales</i>	14
2.3.5. Compuestos antibacterianos de la Familia <i>Musaceae</i> , Género <i>Musa</i>	15
2.4. Químico taxonomía de la cáscara de banano verde.....	15
2.4.1. Características de la cáscara de banano verde.....	15
3. Objetivos	16
3.1. Objetivo General	16
3.2. Objetivos específicos	17
4. Metodología	17

4.1. Materiales y métodos.	17
4.1.1. Recolección, aislamiento y purificación de microorganismos..	17
4.1.2. Elaboración de extractos	18
4.1.3. Evaluación del efecto biológico de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre <i>Rhizopus spp.</i>	22
5. Resultados y Discusión	27
5.1. Evaluación del rendimiento de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde.	28
5.2. Evaluación económica de los extractos obtenidos	29
5.3. Identificación de las dos cepas de <i>Rhizopus spp.</i>	30
5.4. Evaluación del efecto del etanol sobre el crecimiento de las dos cepas de <i>Rhizopus spp.</i>	31
5.5. Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre las dos cepas de <i>Rhizopus spp.</i>	33
5.5.1. Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre cepa 1 (Hongo gris)	33
5.5.2. Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre cepa 2 (Hongo blanco)	37
6. Conclusiones y Recomendaciones	40
6.1. Conclusiones.....	40
6.2. Recomendaciones.....	42
REFERENCIAS	44
ANEXOS.....	51

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hortalizas con mayor producción en el país.....	6
Tabla 2. Principales destinos de exportación de tomate de mesa.....	7
Tabla 3. Clasificación taxonómica de hongo poscosecha, agente causal de podredumbre húmeda en tomate de mesa.	10
Tabla 4. Composición bromatológica del banano verde.....	16
Tabla 5. Rendimientos y características físicas de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde.....	28
Tabla 6. Costo de producción por gramo de cada extracto.	30
Tabla 7. ANOVA para análisis de varianza para cepa 1- hongo gris para los tres extractos con las 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, testigo y fungicida).....	34
Tabla 8. ANOVA para análisis de varianza para cepa 2- hongo blanco para los tres extractos con las 14 concentraciones, testigo y fungicida)....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Podredumbre húmeda (<i>Rhizopus stolonifer</i>).....	11
Figura 2. Proceso de extracción en calor de cáscara de banano verde con agua como solvente.	19
Figura 3. Proceso de extracción en frío de cáscara de banano verde con etanol como solvente.	20
Figura 4. Proceso de extracción en frío de cáscara de banano verde con cloroformo como solvente.	21
Figura 5. Microplaca para lector Elisa con el diseño del ensayo para la evaluación <i>in vitro</i> de los extractos sobre las dos cepas de <i>Rhizopus spp.</i>	24
Figura 6. Esporas de hongos de la especie <i>Rhizopus spp.</i> , observados en microscopio con el lente 100x.	31
Figura 7. Evaluación de las concentraciones de etanol (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 10 %) sobre dos cepas de <i>Rhizopus spp.</i> Bajo condiciones <i>in vitro</i> durante 21 días.	32
Figura 8. Comparación entre tratamientos según la densidad óptica para Cepa 1- Hongo gris.	35
Figura 9. Porcentaje de Inhibición en la cepa 1 (hongo gris) causado por el extracto acuoso, fungicida y natural por método LSD.	35
Figura 10. Comparación entre tratamientos según la densidad óptica para Cepa 2- Hongo blanco.	38
Figura 11. Inhibición en la cepa 2 (hongo blanco) causado por el extracto acuoso, fungicida y testigo con los niveles generados por método LSD.	38

1. Introducción

En Ecuador, la producción de tomate riñón (*Solanum lycopersicum*) fue de 68.355 toneladas métricas, con una superficie total sembrada de 2.544 hectáreas (INEC, 2015). Los niveles de exportación para el año 2010 fue de 3.180 toneladas métricas, lo que representa \$ 200.150, cuya producción estuvo destinada hacia los países de Colombia, Antillas Holandesas, Estados Unidos, España y Países Bajos, siendo Colombia el país al que llegan aproximadamente el 95 % de las exportaciones (MAGAP, 2015).

La gran mayoría de explotaciones productoras de tomate de mesa se encuentran ubicadas en las provincias de la región Sierra, siendo Loja, Chimborazo, Tungurahua, Imbabura y Carchi las provincias con mayor producción en la región Sierra y Guayas la provincia con mayor producción en la región Costa (INEC, 2015).

De un total de 12'585.860 hectáreas cultivadas en Ecuador, 1'469.990 hectáreas corresponden a la superficie cultivada del grupo de las hortifrutícolas. De estas, 749.649 hectáreas corresponden al grupo de las hortalizas y 720.341 hectáreas al grupo de los frutales (Banco Central del Ecuador, 2010). Además, toda la superficie de hortalizas cultivadas se concentra en la región Sierra con 86% en región Costa, con 13 % y el 1 % restante en la región Amazónica (MAGAP, 2015). En general hay 23 tipos de hortalizas que son reconocidos en Ecuador, de los cuales 7 hortalizas ocupan los primeros puestos con un total de 57,5 %, lo que significa 431.048 hectáreas del total de la superficie cultivada de hortalizas. Cabe recalcar que entre 7 hortalizas principales, el tomate de mesa ocupa el séptimo puesto (FAO, 2010).

A nivel mundial existen 44 variedades de tomate de mesa para consumo en fresco e industrial, de las cuales Ecuador produce 3 variedades a mayor escala para los dos fines: Michaela, Dominique, Alambra y Cherry (Alarcón, 2013).

El tomate de mesa es un fruto nativo del continente Americano y con gran popularidad a nivel mundial, cada persona consume aproximadamente 4 kilogramos de este fruto anualmente (INEC, 2015). Esto se atribuye a su alto contenido de vitaminas, compuestos antioxidantes, azúcares, microelementos, pigmentos carotenoides, metabolitos secundarios (Agarwal y Rao, 2000). El aporte energético es de 25 calorías por cada 100 gramos de tomate de mesa fresco e incluso en la publicación realizada por Ellinger, Ellinger y Stehle (2006) se menciona que una dieta rica en tomate de mesa podría ayudar a reducir y prevenir enfermedades cardíacas, vasculares, cáncer, entre otras.

El tomate de mesa se puede cultivar tanto en campo abierto como en invernadero y se adapta a zonas tropicales, andinas y valles (Barraza, Fischer, y Cardona, 2004). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Ecuador en el año 2014 sembró 2.962 hectáreas de tomate de mesa y se produjeron 71.831 toneladas de tomate fresco. De estos datos se puede deducir que el rendimiento promedio de tomate de mesa en el país es de 24 toneladas por hectárea. Sin embargo, este dato se encuentra muy por debajo del promedio de los países vecinos. El INEC (2015), indicó que, del total de producción obtenida en comparación con el total de toneladas vendidas, hubo 1.307 toneladas que no se vendieron. Esto significa que el 1,81 % del total de producción, debido al efecto de plagas, incorrecta manipulación y enfermedades, de éste total el 92,5 % tiene que ver con pérdidas causadas por malas prácticas en todas las etapas que interviene el proceso de poscosecha incluyendo la comercialización (INEC, 2015).

Adicional a esto, la industria de la producción de alimentos ha desarrollado un gran número de productos elaborados con tomate de mesa como materia prima. Esto hace que su demanda sea alta y no se logre cubrir la demanda nacional, impulsando a que las industrias importen los productos ya procesados y perjudican la balanza comercial del Ecuador (MAGAP, 2015).

Las prácticas realizadas durante el proceso de poscosecha del tomate de mesa son fundamentales al momento de obtener alta calidad en la comercialización

en el mercado nacional e internacional. En esta etapa se producen las mayores pérdidas por daños mecánicos, incorrectos sistemas de conservación y cambios fisiológicos (Banco Central del Ecuador, 2010). La nutrición vegetal del cultivo, las características del suelo, la genética, la humedad relativa, microorganismos y entre otros, son algunos de los tantos factores que afectan a los frutos del tomate (Londoño, 2009). De los factores antes mencionados, se puede destacar a los factores ambientales como los principales causantes de las pérdidas del fruto, sobre todo la humedad relativa por influir sobre la pérdida de humedad y causar la proliferación de microorganismos fitopatógenos en el tomate de mesa al momento del almacenamiento (Banco Central del Ecuador, 2010).

Una de las enfermedades más serias que afectan al tomate en la etapa de poscosecha se menciona a la podredumbre húmeda causada por del hongo *Rhizopus spp.* Este patógeno penetra agresivamente por las heridas ablandando sus tejidos y dejando una eflorescencia oscura del hongo (FAO, 2010).

Para evitar las pérdidas en las etapas poscosecha los productores usan plaguicidas y sustancias sintéticas, pero en los últimos años se ha buscado alternativas para disminuir la utilización de químicos sobre todo en la obtención de frutos orgánicos. Estas alternativas para la producción son sustancias naturales con menor impacto ambiental y residualidad. Se usan por lo tanto extractos y compuestos naturales de origen vegetal (Bautista, Velázquez y Hernández, 2008).

Estudios de Montes, Restrepo y Mcewen (2003) evaluaron a 200 especies vegetales para controlar a 26 hongos patógenos de las cuales 100 especies vegetales provocaron inhibición total de los hongos estudiados mediante la inactivación de la actividad enzimática para causar el deterioro de la membrana celular.

2. Marco teórico

2.1. Generalidades del cultivo de tomate de mesa (*Solanum lycopersicum*).

2.1.1. Origen, distribución, características y evolución del cultivo de tomate de mesa.

El género *Solanum* se originó en la región andina, desde Colombia a Chile y fue llevado desde esta región hacia Centroamérica, específicamente a México, país en donde se domesticó al tomate de mesa. Esta fruta constituyó durante años parte básica de la dieta de los habitantes de Mesoamérica. Posteriormente se transportó a Europa por los conquistadores (Escalona, Alvarado, Monardes, Urbina y Martin, 2009 y Peralta y Spooner, 2000).

En el siglo XVI en Centroamérica, inicialmente se consumían tomates de mesa de varios tamaños, formas, colores. Las variedades del fruto se mostraban desde rojo hasta amarillo y en el mismo siglo fueron llevados a España e Italia en donde se usaron como alimento. En cambio, en Alemania se utilizaban en farmacia con fines medicinales. En el siglo XIX España y Portugal difundieron el tomate de mesa hacia Oriente Medio, África, Asia, Estados Unidos y Canadá (Alarcón, 2013).

Taxonómicamente se describe al tomate de mesa como una planta de la división *Magnoliophytina*, clase Dicotiledónea, orden *Solanales*, perteneciente a la familia *Solanaceae*, género *Solanum* y especie *Solanum lycopersicum* (Spooner, Peralta y Knapp, 2005).

Las raíces de esta planta pueden alcanzar los 2 metros de profundidad, posee numerosas raíces secundarias unidas a una raíz principal corta (Jaramillo, Rodríguez y Guzmán, 2007). Las hojas crecen de forma alterna sobre el tallo,

contienen de 7 – 9 foliolos peciolados, bordes dentados y están cubiertas de pelos glandulares (FAO, 2011).

Las flores están compuestas por más de 5 sépalos e inflorescencias denominadas racimos (Escalona et al., 2009, p. 21). Su fruto es una baya compuesta por 2 a 3 lóbulos, su color puede ser amarillo, rojo o rosado, tienen forma globular, de superficies lisas y diámetros que varían de 3 a 16 cm (Spooner et al., 2005).

El tomate de mesa se cultiva en estaciones cálidas y por su tolerancia al calor y sequía, requiere una temperatura óptima de 20 a 30 °C para un correcto desarrollo. Temperaturas superiores o inferiores a este rango pueden afectar la fructificación y desarrollo del sistema radicular (FAO, 2011). La humedad relativa óptima varía entre 60 y 80 %, requiere suelos con un mínimo de 1 metro de profundidad, con texturas permeables y un pH de 5,5 a 6,8 (Jaramillo et al., 2007).

2.1.2. Importancia del tomate de mesa en Ecuador y en el mundo.

El tomate de mesa es la hortaliza más importante a nivel mundial y es el segundo más importante dentro del grupo de las *Solanaceae*, por su papel dentro de los hábitos alimenticios de las personas, su amplio consumo ya sea fresco o procesado, inclusive su incremento en el rendimiento del cultivo ha provocado el aumento de la producción y comercialización (FAO, 2012).

Actualmente, la producción de tomates en el mundo es de aproximadamente 130 millones de toneladas métricas y de 39 toneladas/hectárea en promedio (FRESH PLAZA, 2016). De acuerdo con cifras del MAGAP (2015), la comercialización del tomate de mesa y sus derivados en el mundo fue del 33 % en el periodo 2001 a 2010 para el comercio de tomates frescos, mientras que la producción de pulpa y jugo de tomate subió de 2,74 millones de toneladas para el 2001 a 4 millones de toneladas en el 2010.

Según FAO (2012) el cultivo de hortalizas en Ecuador ha ido creciendo significativamente desde los años 90 debido a los cambios en los hábitos alimenticios provocando un mayor consumo de vegetales. La industrialización de las hortalizas como materia prima para la comercialización en el mercado externo ha sido otra razón para que el cultivo de tomate de mesa tenga importancia económica en el mercado ecuatoriano (Banco Central del Ecuador, 2010).

El MAGAP (2015), menciona que hubo un incremento del 23,9 % en la superficie cultivada de hortalizas en Ecuador en el periodo 2006 – 2013, es decir, una tasa de crecimiento del 4,5 % por año, mientras que la producción para el mismo período creció en un 8 %, esto significa que anualmente creció el 4 %, y que dicho crecimiento se debe al cultivo de 23 hortalizas, entre las cuales 7 hortalizas representan más del 50 % de toda la superficie total cultivada de hortalizas (MAGAP, 2015). A continuación, se puede observar una tabla con las 7 hortalizas de mayor producción en Ecuador.

Tabla 1.

Hortalizas con mayor producción en el país.

HORTALIZAS	PROMEDIO (Toneladas)	% PRODUCCIÓN
Maíz suave choclo	31.325	29,5
Frejol tierno	14.086	13,2
Maíz duro choclo	10.403	9,7
Cebolla colorada	9.372	8,8
Arveja tierna	8.910	8,3
Haba tierna	8.202	7,7
Tomate riñón	3.914	3,7

Adaptado de: (FAO, 2010).

En Ecuador, el cultivo de tomate de mesa se concentra en la región Sierra, especialmente en la provincia de Tungurahua con un 60 % del total de la producción interna. Además, tiene un promedio de 24 toneladas/hectárea (INEC, 2015). Por otro lado, en cuanto a las exportaciones del periodo 2010 – 2016, Ecuador presentó 4 destinos principales para la exportación de tomate de mesa (tabla 2):

Tabla 2.

Principales destinos de exportación de tomate de mesa.

País	Promedio de producción periodo 2010 - 2016 (Toneladas métricas)
Colombia	1.790,99
Estados Unidos	33,19
España	2,30
Antillas Holandesas	0,96

Adaptado de: (MAGAP, 2015).

2.1.3. Variedades de tomate de mesa de importancia en Ecuador.

En Ecuador bajo un sistema de campo abierto o invernadero se cultivan preferentemente las siguientes variedades: Dominique, Michaela y Alambra (MAGAP, 2015). La variedad Dominique es la más usada por los productores tanto para consumo nacional como para exportación.

Esta variedad de tomate de mesa tiene crecimiento indeterminado, posee varias características que hacen la variedad de tomate más vendida, como: larga vida en percha, resistencia a nemátodos, tendencia al incremento del volumen cultivado, amplia adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales para su desarrollo (Hazera, 2014). Es una variedad que presenta una planta vigorosa, con un gran número de frutos, abundante sistema radicular y foliar;

uniformidad excelente en cuanto a su calibre de frutos, una larga vida y se puede cosechar los frutos desde los 75 días a partir del trasplante, alta tolerancia a: *Verticilium* y *Fusarium* (FAO, 2010).

La variedad Michaela, presenta una planta con fuerte vigorosidad, maduración relativamente tardía, buena firmeza, soporta largos tiempos en almacenamiento; el peso promedio del fruto varía entre 120 - 180 gramos, es redondo, de coloración rojo intenso y produce aproximadamente 6 kilogramos/planta (Hazera, 2014).

Finalmente, la variedad Alambra de manera similar que las anteriores variedades presenta una vida prolongada en anaquel, es una planta robusta, tiene alta tolerancia a humedad y lluvias; sus frutos son achatados, de color rojo intenso en estado de madurez, tienen un peso aproximado de 200 - 220 gramos y presenta alta tolerancia a *Verticilium*, *Fusarium* y nemátodos (Banco Central del Ecuador, 2010).

2.2. Enfermedades y agentes causales de frutos en poscosecha.

2.2.1. Morfología de hongos de importancia en poscosecha.

El Reino Fungi es un grupo grande de organismos con biodiversidad, actividades ecológicas en todos los ecosistemas y de gran variabilidad morfológica (Cepero, Restrepo y Franco, 2012, p. 3). Estos seres son definidos como organismos con membrana nuclear, núcleo diferenciado, incapaces de producir su propio alimento, inmóviles, reproducción sexual y asexual a través de esporas (Montes et al., 2003).

Los hongos morfológicamente son de dos tipos: filamentosos (multicelulares) y levaduriformes (unicelulares) (Cepero et al., 2012, p. 58). Los hongos multicelulares o mohos son aerobios y crecen en las superficies de vegetales a

través del desarrollo de las hifas sobre el sustrato generando micelios que se extienden gracias a los nutrientes y condiciones medio ambientales favorables (Aguirre, Ulloa, Aguilar, Cifuentes, y Valenzuela, 2014). Además, se caracterizan por la producción de colonias con textura pulverizada o algodonosa y la producción de enzimas extracelulares degradadoras de polímeros insolubles en monómeros solubles (Aristegui, 2002). Por otro lado, los hongos unicelulares o levaduras son anaerobios facultativos que crecen por división celular, reproducción por gemación discontinua de la pared; característica principal de los hongos unicelulares (Kuhar, Castiglia y Papinutti, 2013). Los requerimientos físicos para el correcto crecimiento de los hongos incluyen: humedad relativa del 70 %, pH óptimo entre 5 – 7, luz visible entre 380 – 720 nm para el correcto proceso de reproducción y temperaturas comprendidas entre 0 - 65 °C (Cepero et al., 2012, p. 50).

El filo *Zygomycota* es un grupo de hongos que comprende alrededor de 1.500 especies. Se caracterizan por causar podredumbres en alimentos que contienen agua, estructuralmente poseen zigosporas (esporas sexuales) compuestas por hifas cenocíticas; es decir, micelios con núcleos haploides sin divisiones (James y O'Donnell, 2007). Adicionalmente, dentro de los esporangios se producen esporas asexuales que durante la reproducción sexual forman la zygospora con paredes resistentes en dónde ocurre la meiosis (UNIVERSIDAD DE ALMERÍA, 2010).

Dentro del grupo de los hongos fitopatógenos que afectan al tomate de mesa en etapa poscosecha se encuentran *Geotrichum candidum*, causante de la pudrición ácida dejando lesiones que se asemejan a masas gelatinosas (Mahovic, Sargent, Bartz y Lon Kan, 2002). El hongo *Rhizopus stolonifer* es el principal causante de la enfermedad más grave en poscosecha: la podredumbre húmeda que ataca a frutos en estado de madurez penetrando por sus heridas en presencia de humedad relativa alta y temperatura de aproximadamente 25 °C, causando la pérdida del 100 % del fruto ya que se produce ablandamiento total de los tejidos provocando la drenación total del

líquido y rotura de la piel (FAO, 2014). El hongo *Rhizopus stolonifer* pertenece al Phylum Zygomycota, a continuación, se puede observar la taxonomía del hongo (tabla 3).

Tabla 3.

Clasificación taxonómica de hongo poscosecha, agente causal de podredumbre húmeda en tomate de mesa.

Clasificación Taxonómica	
Reino	Fungi
Phylum	<i>Zygomycota</i>
Clase	<i>Zygomycetes</i>
Orden	<i>Mucorales</i>
Familia	<i>Mucoraceae</i>
Género	<i>Rhizopus</i>
Especie	<i>Rhizopus stolonifer</i>

Tomado de: (Cepero et al., 2012, p.338).

2.2.2. Descripción morfológica del género *Rhizopus spp.*

Es un hongo muy versátil que crece y se desarrolla en condiciones ambientales extremas, coloniza rápidamente la superficie de vegetales mediante la excreción de sustancias enzimáticas que degradan las pectinas de la membrana celular (Bautista et al., 2008). En la figura 1, se puede observar el desarrollo del hongo *Rhizopus stolonifer* en tomates de mesa.



Figura 1. Podredumbre húmeda (Rhizopus stolonifer).

Tomado de: (Revista iberoamericana de micología, 2002).

Tal como indica la Figura 1, el hongo forma un micelio aéreo con esporangios en sus extremos para alojar las esporangiosporas, las cuales pueden vivir por largos periodos a altas temperaturas y sin presencia de agua, provocando la germinación de tejidos vegetales dañados, maceración y posterior pudrición de los frutos (Velázquez, Angulo, García, Carrillo y Guerrero, 2006). Es considerado como hongo saprófito capaz de sobrevivir por largos periodos en sustratos secos de frutos en descomposición, el contacto con la enfermedad se da principalmente cuando los frutos maduros o con heridas que han sido cosechados se colocan en contenedores que no se han desinfectado correctamente, desencadenando una epidemia (Cepero et al., 2012, pp. 340-345). La presencia de corrientes de aire pueden dispersar las esporas de los hongos a largas distancias (Sánchez, 2007). En presencia de humedad relativa alta los micelios del hongo empiezan a crecer produciendo masas de color gris blanquecino Figura 1 (Bautista et al., 2008).

2.3. Fungicidas biológicos desarrollados a base de extractos vegetales usados en microorganismos.

2.3.1. Modo de acción de los fungicidas.

Los fungicidas en general se encargan de la destrucción de los hongos y de los compuestos que generan resistencia en el huésped (Rondón, Sanabrá y

Rondón, 2006). La manera cómo los fungicidas actúan dentro de los tejidos celulares de la planta para causar daño en el ciclo de vida del hongo dependen de la interacción del vegetal con el fungicida, habiendo dos tipos de interacciones: protectantes y curativas o sistémicas (McGrath, 2004). Los fungicidas protectantes ayudan a controlar al hongo afectando al mismo tiempo varias de sus funciones. Es decir, interrumpen la germinación de las esporas, formando una barrera en la superficie del vegetal para posteriormente ser absorbido en cantidades tóxicas para el hongo (Bautista et al., 2008). Por otro lado, los fungicidas sistémicos, controlan una sola estructura del hongo y para que el fungicida llegue al sitio de acción específico necesita atravesar varias barreras para llegar a su punto de acción, como: cutícula, metabolismo, membrana y absorción de la planta hospedera (Rondón et al., 2006).

Se basan por lo tanto en la realización de una barrera en la estructura seleccionada para que el hongo no pueda seguir desarrollándose (McGrath, 2004).

2.3.2. Antifúngicos obtenidos de plantas.

Para controlar los hongos poscosecha se utiliza principalmente fungicidas de origen sintético, pero estas sustancias desarrollan mecanismos de resistencia (Donli y Dauda, 2003). Además, dejan residuos que son tóxicos en los alimentos y al medio ambiente causando riesgos a la salud, razón por la que es necesario encontrar alternativas nuevas mediante el uso de fungicidas que se extraigan de vegetales, es decir biofungicidas (Angulo, Reyes, García, Carrillo, Salazar y Valdez, 2009).

Varios compuestos obtenidos de algunos vegetales han mostrado efecto antimicrobiano entre esos: fenoles, flavonoides, aceites esenciales, terpenos, lectinas, alcaloides y polipéptidos (Bautista et al., 2008). Estos compuestos muestran diferentes mecanismos de acción, como, por ejemplo, los fenoles inhiben la acción enzimática mediante la oxidación de los compuestos microbianos; los terpenos y aceites esenciales causan rotura de la membrana

gracias a los compuestos lipofílicos. Los alcaloides interactúan con el ADN y lectinas y los polipéptidos son capaces de formar iones dentro de la membrana microbiana provocando la inhibición por adhesión de sus proteínas a los polisacáridos del hospedero (Hernández, Bautista y Velázquez, 2007).

Los estudios realizados para la evaluación de productos vegetales sobre el control de *Rhizopus spp.*, son iniciales y escasos. Estos estudios se han realizado en condiciones in vitro, utilizando extractos de semillas de la planta *Moringa oleífera*, presentando inhibición sobre el crecimiento de los micelios y formación de esporas (Velázquez et al., 2006).

En cuanto a estudios en condiciones in situ, se determinó que existe variación de la actividad fungistática entre extractos en polvo, acuosos y las especies analizadas, evidenciando la acción selectiva entre la planta y el hongo usado (Bautista, Hernández y Barrera, 2000). Para dichos estudios se usó extractos en polvo obtenidos de las semillas de la especie guamúchil (*Pithecellobium dulce*) pero no mostró un control significativo del hongo (Bautista, Hernández y Barrera, 2000). Por otro lado, se usó extracto acuoso obtenido de la especie (*Moringa spp.*) y se observó inhibición significativa del crecimiento de *Rhizopus stolonifer* (Donli y Dauda, 2003).

2.3.3. Antifúngicos obtenidos de plantas de la división *Magnoliophyta*.

El compuesto mentol obtenido de la especie (*Mentha piperita*) y linalol extraídos de la albahaca (*Ocimum basilicum*) ha sido usado para controlar los hongos *Rhizopus stolonifer*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Mucor sp.*, agentes causantes de descomposición del melocotón en sistema cerrado. Inicialmente los aceites esenciales obtenidos de las especies vegetales usadas independientemente de las proporciones usadas inhibían los crecimientos de los hongos (Edris y Farrag, 2003). Finalmente, el estudio comprobó que el uso de la mezcla de los dos componentes obtenidos de la menta y albahaca en proporciones similares a las concentraciones del aceite original tuvo propiedades antifúngicas (Edris y Farrag, 2003).

Otro estudio realizado por Plotto, Roberts y Roberts (2003), demostró que se puede usar aceites esenciales de orégano (*Origanum compactum*), tomillo (*Thymus glandulosus*), hierba de limón (*Cymbopogon citratus*) y cilantro (*Coriandrum sativum*), para la obtención de carvacrol, timol, citral, y trans- 2 - decenal, respectivamente. Se observó que los vapores de los componentes del tomillo, orégano y hierba de limón manifestaron inhibición completa de los hongos *Botrytis cinerea* y *Artemaria arborescens*, mientras que el hongo *Geotrichum candidum* tuvo más sensibilidad al componente citral de la hierba de limón (Plotto, Roberts y Roberts, 2003). Por otro lado, los vapores obtenidos del aceite de orégano y tomillo inhibieron *Rhizopus stolonifer*, únicamente al incorporar en el medio de cultivo los aceites obtenidos del orégano y tomillo a una concentración de 500 mg/L, el aceite de hierba limón tuvo efecto fungistático en concentraciones de 1.000 mg/L pero no en el caso del hongo *Rhizopus*, además el aceite del cilantro fue fungicida para *Alternaria*, *Botrytis* y *Geotrichum* sólo en forma de vapor ya que al incorporar en el medio de cultivo se perdió su efecto fungistático (Plotto et al., 2003).

2.3.4. Antifúngicos extraídos de plantas del Orden Zingiberales.

Gregorio, Ramírez, López y Alvarado (2015), realizaron un estudio para controlar la enfermedad moniliasis del cacao causada por el hongo *Moniliophthora roreri* mediante la extracción de compuestos de la especie *Zingiber officinale* por destilación, evaluando su efecto antifúngico en condiciones *in vitro*.

Para el estudio se obtuvieron concentraciones usando: material fresco y material seco, con agua y alcohol como solventes, colocando en tubos de ensayo en relación 10:1 y 10:0 junto al hongo y extracto de cacao, observando cada 0, 24, 48, 72 y 96 horas (Gregorio et al., 2015).

Los resultados mostraron la inhibición en todas las concentraciones usadas, siendo el tratamiento con material seco, en concentración de 45 g/L a una relación 10:1, el tratamiento con mejor resultados ya que alcanzó

aproximadamente el 88 % de control sobre la germinación de conidias en un tiempo de 72 horas (Gregorio et al., 2015).

2.3.5. Compuestos antibacterianos de la Familia *Musaceae*, Género *Musa*.

Un estudio realizado por Mokbel y Hashinaga (2005), mostró la actividad antibacteriana de la cáscara de banano verde y amarillo de la variedad Cavendish, para lo cual trataron a las cáscaras con 70 % de acetona repartidas secuencialmente con cloroformo y acetato de etilo, para la actividad antimicrobiana usaron un disco de papel para evaluar su crecimiento y concentración mínima inhibitoria. Los resultados del estudio arrojaron que el extracto de cáscara de banano verde realizado con acetato de etilo como solvente. El estudio registró actividades antimicrobianas significativas, mientras que los extractos de cáscara amarilla registraron baja actividad y no se registró actividad en el extracto de cloroformo. El resultado final de la concentración mínima inhibitoria indicó que existe inhibición de las bacterias Gram negativas y positivas probadas en una variación de 140 - 750 ppm (Mokbel y Hashinaga, 2005).

2.4. Químico taxonomía de la cáscara de banano verde.

2.4.1. Características de la cáscara de banano verde.

La cáscara de banano está compuesta químicamente por: fibra, ácidos grasos poliinsaturados, aminoácidos esenciales, proteínas, y potasio. Por otro lado, algunos estudios muestran que se puede obtener metanol, pectinas, etanol y además es una fuente importante de sustancias antimicrobianas y compuestos fitoquímicos (Blasco y Gómez, 2014). Esto se puede verificar en la tabla 4.

Tabla 4.

Composición bromatológica del banano verde.

Índice (% en base seca)	Fruto	Cáscara
Materia seca	20	18
Proteína	5,5	9,5
Fibra bruta	1,3	26,7
Cenizas	4,0	22,0
Taninos	7,4	40,5
Almidón	72,3	-

Tomado de: (Velásquez, 2004).

El contenido de compuestos fenólicos de la cáscara de plátano del género *Musa*, es de 0,9 - 3 gramos por cada 100 gramos en base seca, mientras que el contenido de taninos es de 40,5 % en base seca (Blasco y Gómez, 2014). El banano verde destinado para rechazo posee gran cantidad de taninos y polifenoles. Los taninos son compuestos anti nutricionales por lo que no es usado como alimento para animales (Velásquez, 2004).

Blasco y Gómez (2014), identificaron la concentración del antioxidante galocatequina en la cáscara de banano verde siendo de 160 mg/100 g en base seca. Por otro lado, la cáscara del banano maduro contiene otros compuestos antioxidantes como antocianinas y catecolaminas. Así también, contiene carotenoides y xantofilas en concentraciones de 300 – 400 µg; esteroles y triterpenos en cantidades aún no identificadas (Blasco y Gómez, 2014).

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Evaluar el efecto de los extractos de cáscara de banano verde (*Musa paradisiaca*) sobre el hongo patógeno *Rhizopus spp.*, causante de pérdidas poscosecha en tomate de mesa.

3.2. Objetivos específicos

Determinar el efecto biológico *In vitro* del extracto de cáscara de banano verde sobre el hongo poscosecha *Rhizopus spp.*

Establecer la concentración mínima inhibitoria del extracto de cáscara de banano verde sobre el hongo patógeno en poscosecha.

4. Metodología

4.1. Materiales y métodos.

El presente estudio fue realizado en la ciudad de Quito, en los laboratorios de la Universidad de las Américas, campus Queri y Granados.

Los extractos realizados los cuales se detallan a continuación se obtuvieron a partir de la cáscara de banano verde, la cual es considerada como desecho de las producciones bananeras.

Los microorganismos usados para el análisis fueron aislados de tomates de mesa con síntomas de enfermedad.

4.1.1. Recolección, aislamiento y purificación de microorganismos.

Las dos cepas de hongos utilizadas: gris y blanca se aislaron de tomates de mesa (*Solanum lycopersicum*, variedad Dominique) maduros con síntomas de enfermedad. Para esto los tomates fueron expuestos a condiciones ambientales extremas por 7 días hasta observar la presencia de enfermedad en la superficie: 30 °C y 70 % humedad relativa.

El aislamiento de los hongos patógenos se realizó mediante la técnica descrita en Agros (2005). Se hizo una variación del medio de cultivo utilizando V-8 (Ver composición en anexo 3), dejando las cepas aisladas en agar de jugo V-8

en incubación a 25 °C hasta observar el crecimiento de los hongos en las cajas Petri.

La purificación de los hongos de interés se realizó con varios repiques de inóculos procedentes de la fase anterior mediante repiques, hasta obtener las dos cepas de los hongos provenientes de la especie *Rhizopus spp.*, que fueron identificados inicialmente según su color, forma, textura, tamaño.

La identificación de la morfología de los hongos usados como causantes de pérdidas en poscosecha se hizo mediante la observación morfológica en microscopio óptico (marca OLYMPUS, modelo CX21FS1), de estructuras como: esporas e hifas.

La conservación de la viabilidad y las características de las dos cepas puras: gris y blanca, se realizó con repiques cada 15 días para mantener las cepas frescas para su uso y dejando a 4 °C para su conservación para uso posterior.

4.1.2. Elaboración de extractos

Los extractos realizados en este estudio fueron elaborados a partir de la cáscara de banano verde (*Musa paradisiaca*) variedad Cavendish en estado de madurez fisiológica. Se realizó una extracción en calor y dos extracciones en frío, con el uso de reactivos con permiso del Consejo Nacional de Control de Sustancias Estupefacientes y Psicotrópicas para uso industrial, tal como se puede observar a continuación:

4.1.2.1. Proceso de extracción en calor para obtención de compuestos activos de la cáscara de banano en estado de madurez fisiológica.

Para el proceso se utilizó la siguiente maquinaria: Liofilizador, marca LABCONCO, modelo 7750020; Hidrodestilador, marca GLASCO. Como se observa en la figura 2, para el proceso se siguió el método propuesto por Cerutti y Neumayer (2004), realizando la variación del solvente al usar agua por

metanol, debido a que los compuestos activos a extraer son solubles en agua (Isaza, 2007).

A continuación, se puede observar el diagrama de flujo con los principales procesos realizados para la obtención de compuestos activos por extracción en calor con agua como solvente:

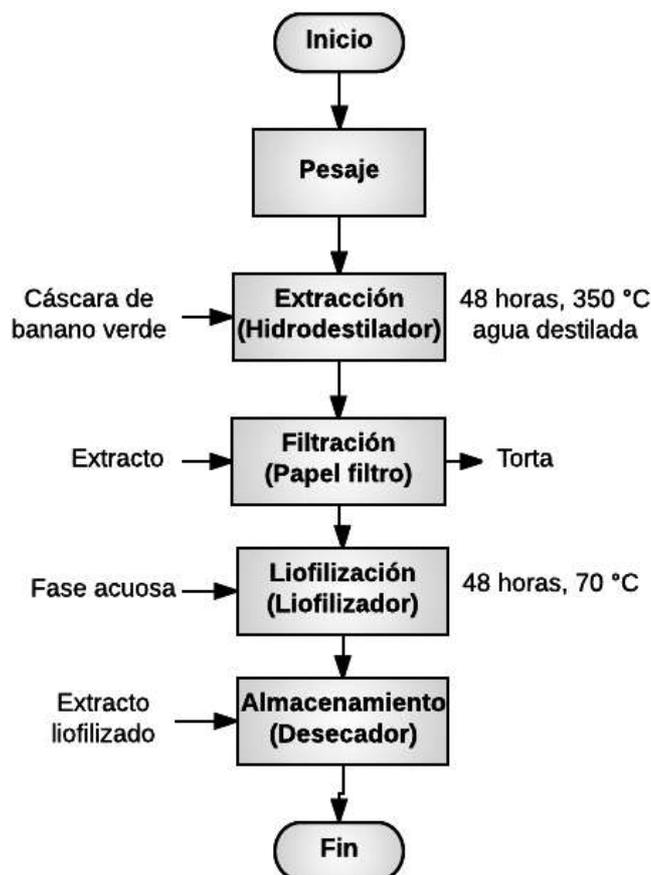


Figura 2. Proceso de extracción en calor de cáscara de banana verde con agua como solvente.

4.1.2.2. Proceso de extracción en frío para obtención de compuestos activos de la cáscara de banana en estado de madurez fisiológica.

Para realizar este proceso no se usó temperaturas altas, ya que se buscaba evitar perder compuestos, como: vitaminas, fibra y minerales. Sin embargo, se necesitó agitación constante por periodos largos, para lograr la homogeneidad

del extracto. Para realizar estos extractos se utilizó los siguientes equipos: Agitador orbital, marca BOECO, modelo PSU-10L; Rotavapor, marca YAMATO, modelo BM100; Liofilizador, marca LABCONCO, modelo 7750020.

Para el proceso de extracción en frío se usó dos solventes: etanol 96 % y cloroformo como indica la metodología de Cerón y Cardona (2011). Para la extracción se dejó en agitación constante por 7 días, realizando filtraciones cada dos días para cambiar el solvente usado sin realizar fraccionamiento del extracto, como se puede observar en las figuras 3 y 4.

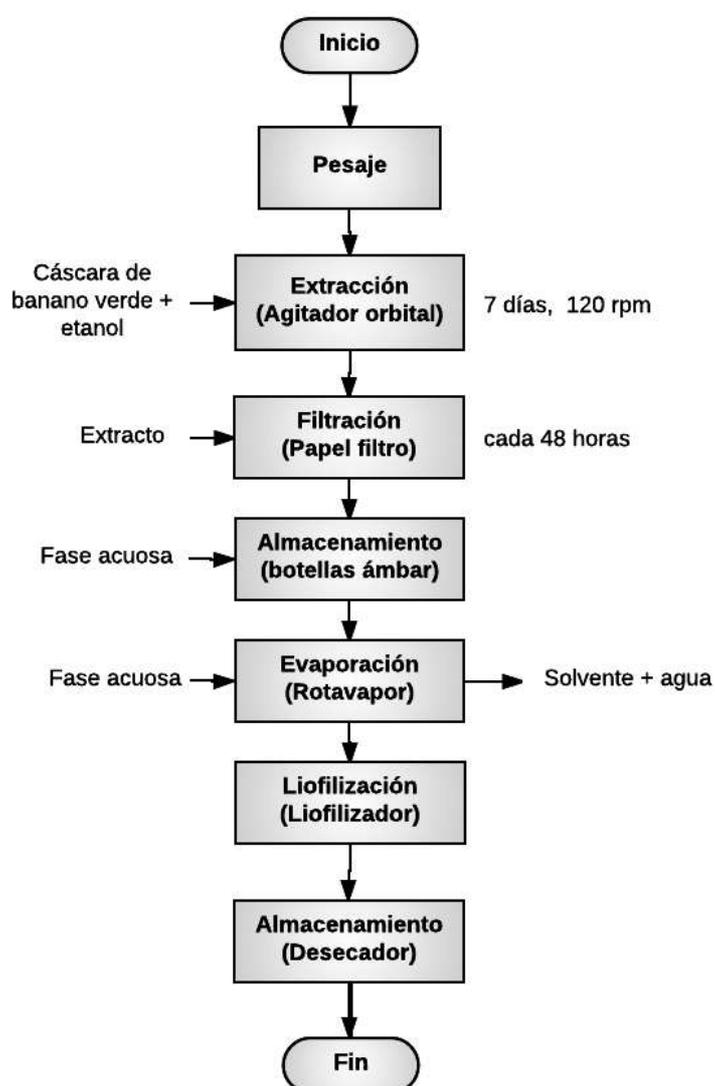


Figura 3. Proceso de extracción en frío de cáscara de banano verde con etanol como solvente.

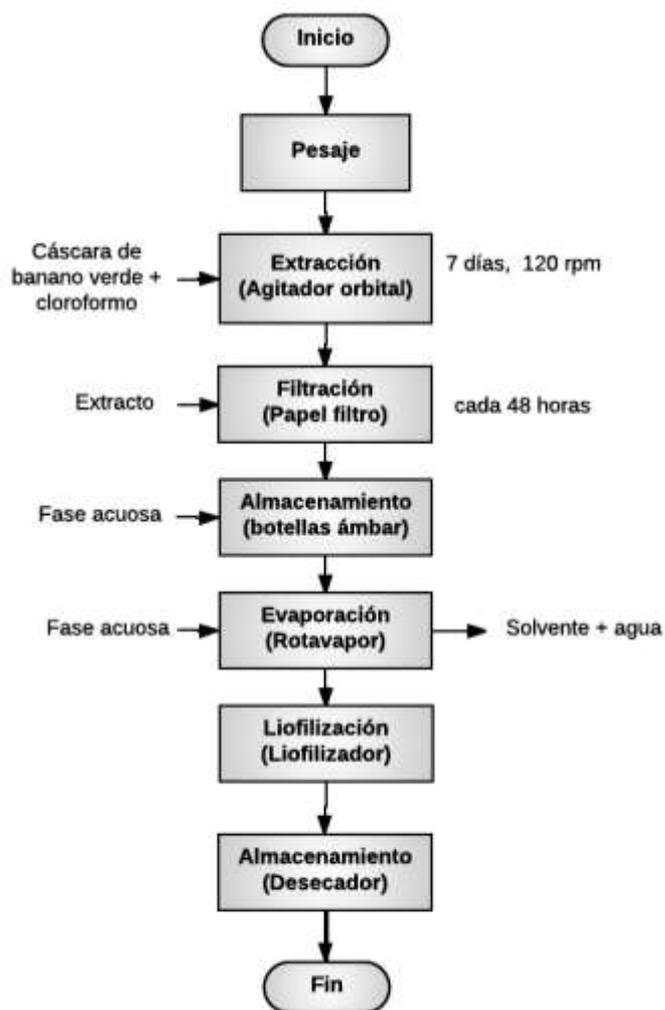


Figura 4. Proceso de extracción en frío de cáscara de banano verde con cloroformo como solvente.

Luego de obtener los extractos se determinó el rendimiento de cada uno, mediante el método gravimétrico-volumétrico:

(Fórmula 1)

$$\% \text{ RE} = \frac{\text{P.E. (g)}}{\text{P. Inicial (g)} \times 100 \%}$$

(Castro, 2008).

En donde:

% RE: Porcentaje del rendimiento del extracto.

P. E. (g): Peso del extracto en gramos.

P. inicial (g): Peso inicial de la muestra en gramos.

4.1.3. Evaluación del efecto biológico de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre *Rhizopus spp.*

Para evaluar los tres tipos de extractos obtenidos de la cáscara de banano en estado de madurez fisiológica sobre las dos cepas de hongos, se realizó la determinación de la concentración a usar para cada inóculo mediante conteo celular, posteriormente se determinó una concentración de etanol que no inhiba el crecimiento de las dos cepas y finalmente se evaluó con las 14 concentraciones de los tres tipos de extractos para evaluar el efecto biológico de cada extracto sobre los hongos, tal como se detalla a continuación:

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

Las cepas fúngicas fueron preparadas en condiciones asépticas en cámara de flujo laminar, marca: THERMO SCIENTIFIC, modelo: 1395 y siguiendo la metodología de Kouassi, Bajji, Brostaux, Zhiri, Samb, Lepoivre y Haïssam (2012) modificando el jugo de frutas que usaron por medio de cultivo V-8.

El hongo fue cultivado en medio V-8 e incubado a 25 °C por 8 días en cajas Petri. Posteriormente, se agregó 6 ml de suero fisiológico, la solución se sometió a agitación durante 10 segundos en Vórtex (marca BOECO, modelo V-XPLUS) y se filtró con una gasa estéril para dejar sólo esporas en la solución. Posteriormente, se contaron las conidias en cámara de Neubauer (marca MARIENFELD, profundidad 0,1 mm, líneas claras), mediante la siguiente fórmula:

(Fórmula 2)

$$\text{Número de células} = \frac{\text{células contadas}}{\text{área contada (mm}^2\text{) x profundidad de cámara x dilución}}$$

(Marienfeld, 2010).

Luego de este procedimiento se estableció la concentración a utilizar para tener una solución de 10^4 esporas/ml. Para determinar el crecimiento de los hongos mediante la medición de la Densidad Óptica, se realizaron medidas en microplacas para lector ELISA (fondo cóncavo), con caldo de jugo V-8 filtrado como medio de cultivo. El crecimiento fue medido en unidades de absorbancia en el equipo de lector de microplacas Elisa (marca SEAC RADIM, modelo, SIRIO) a 492 nm. Las lecturas se realizaron cada 24 horas por 5 días, después de cada medición las placas se incubaron a 25 °C para el adecuado crecimiento de los hongos. Antes de realizar las mediciones de las placas para lector Elisa se realizaba agitaciones por 10 segundos, con el fin de establecer la concentración adecuada de esporas/ml para cada inóculo a usar en la evaluación.

Posteriormente, se realizó la evaluación del solvente etanol sobre los hongos debido a que los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde fueron realizados con etanol. Por lo tanto, fue necesario encontrar una concentración que no afecte los crecimientos de las dos cepas de *Rhizopus spp.*

Con este fin, se preparó una solución de inóculo de 10^4 esporas/ml para cada hongo, siete concentraciones de etanol (0; 0,25; 0,5; 1; 2; 4 y 10 %) y el medio de cultivo V-8, los cuales fueron depositados en las microplacas para lector Elisa utilizando un volumen de 200 μ l, se midió la absorbancia a una longitud de onda a 492 nm, cada 24 horas durante 21 días; esta evaluación se realizó con tres repeticiones en el tiempo y tres repeticiones técnicas del ensayo.

4.1.3.2. Evaluación *in vitro* del efecto biológico de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre las dos cepas de *Rhizopus spp.*

Para esta evaluación se usó un diseño de bloques completamente al azar: tres repeticiones para cada hongo y tres repeticiones técnicas de cada ensayo. Los tratamientos analizados fueron: testigo, control para solvente, control para fungicida y catorce concentraciones de los extractos (400; 200; 100; 50; 25;

12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39; 0,20; 0,10; 0,05) $\mu\text{g/ml}$ de cada uno de los extractos (etanólico, clorofórmico y acuoso). Para esto se usó microplacas para lector Elisa y en cada pocillo se fue colocando cada una de las concentraciones para cada uno de los extractos.

Los extractos antes de ser colocados en cada pocillo de las microplacas para lector Elisa fueron diluidos en etanol a una concentración de 0,25 % y esterilizados en filtros Corning (0,2 μm).

Las microplacas para lector Elisa (CITOTEST, fondo cóncavo, 96 pocillos) fueron usadas con la distribución que muestra la figura 5.

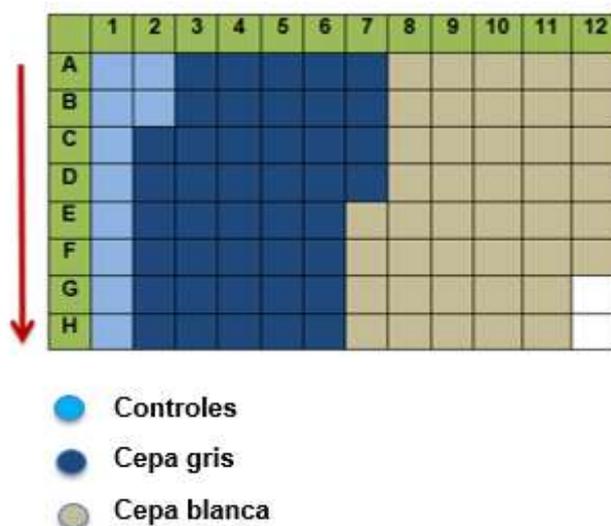


Figura 5. Microplaca para lector Elisa con el diseño del ensayo para la evaluación *in vitro* de los extractos sobre las dos cepas de *Rhizopus spp.*

Las placas Elisa fueron usadas sin dejar libres los contornos, colocando cada tratamiento de arriba hacia abajo empezando en A1, para lo cual en el primer pocillo se dejó un blanco (suero fisiológico). A partir del pocillo B1 se fueron colocando los siguientes tratamientos con sus 3 repeticiones (testigo absoluto, control para solvente, control para fungicida, concentración del extracto 400; 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,13; 1,56; 0,78; 0,39; 0,20; 0,10; 0,05 $\mu\text{g/ml}$ de la primera cepa. A partir del pocillo E7 se usó las mismas concentraciones del

extracto, pero con la segunda cepa. Cada pocillo además del extracto tenía una concentración de 10^4 esporas/ml (Figura 5).

Cada Microplaca para lector Elisa fue medida cada 48 horas durante 21 días, antes de cada medición se agitó por 10 segundos y luego de la misma se dejaba en incubación a 25 °C hasta su próxima medición. La evaluación se realizó a 492 nm de longitud de onda.

Para analizar el porcentaje de inhibición de cada extracto sobre las dos cepas de los hongos se usó la siguiente fórmula:

(Fórmula 3)

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = \frac{\text{control} - \text{tratamiento}}{\text{control}} \times 100 \%$$

(Singh, Singh, Devi, Singh y Lee, 2008).

En donde:

Control: crecimiento del hongo en el medio de cultivo

Tratamiento: crecimiento del hongo en el extracto

Para determinar entre los tres extractos usados cuál es diferente con respecto al crecimiento normal de las dos cepas de *Rhizopus spp.*, en el medio de cultivo V-8 con el solvente, se realizó un ANOVA planteando las siguientes hipótesis:

Hipótesis Nula:

No existe efecto del extracto de cáscara de banano verde en el control de las dos cepas de *Rhizopus spp.*

Hipótesis alternativa:

Existe efecto del extracto de cáscara de banano verde en el control de las dos cepas de *Rhizopus spp.*

Para el análisis de cada dato obtenido de la evaluación *In vitro* se utilizó un análisis de varianza con diseño de bloques completamente al azar y de encontrarse con diferencias significativas se prosiguió con un análisis funcional de comparación de medias (Tukey con $\alpha=5\%$). Se usó para este análisis el programa INFOSTAT, versión libre. Este tipo de análisis compara todos los tratamientos o estudia el efecto de los factores en cada bloque, de tal forma que las diferencias existentes en el estudio sean a causa del factor de interés. Este diseño considera a los factores: tratamientos, bloques y error aleatorio como fuentes de variabilidad, siguiendo el siguiente modelo estadístico (Fórmula 4), siempre que haya efecto entre los tratamientos:

(Fórmula 4)

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \gamma_j + \varepsilon_{ij}$$

(Gutierrez y De la Vara, 2008)

En donde:

Y_{ij} : resultado del tratamiento i y bloque j .

μ : media global.

τ_i : efecto al tratamiento i .

γ_j : efecto al bloque j .

ε_{ij} : error aleatorio del resultado Y_{ij} .

La hipótesis por probar se expresa de la siguiente manera:

(Fórmula 5)

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \dots = \tau_k = 0$$

$$H_A: \tau_i \neq 0 \text{ para algún } i$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

En donde:

τ_i : efecto al tratamiento i sobre la variable.

El modelo estadístico para las hipótesis es:

(Fórmula 6)

$$F_o = \frac{CM \text{ tratamiento}}{CM \text{ error}}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

De la fórmula 6 se deduce que si **Fo** resulta un valor alto y el valor-p es mayor al nivel de significancia se rechaza la hipótesis nula. Caso contrario el valor **Fo** es un valor pequeño y es menor al nivel de significancia se acepta la hipótesis alternativa.

Luego de haber rechazado la hipótesis nula, se debe buscar cuál de los tratamientos usados son diferentes entre sí, mediante el método LSD para encontrar la diferencia mínima entre las medias, con el siguiente modelo estadístico:

(Fórmula 7)

$$LSD = \alpha, gl \sqrt{\frac{2CM_{\text{error exp.}}}{r}}$$

(Gutiérrez y De la Vara, 2008)

En donde:

α : nivel de significancia.

gl : grados de libertad.

r : repeticiones.

De la fórmula 6, se deduce que sí el valor de las medias muestrales es mayor en comparación al valor LSD, la diferencia mínima es significativa.

5. Resultados y Discusión

El presente apartado muestra todos los resultados obtenidos durante el estudio, el cual contiene rendimientos y costos de los tres tipos de extractos,

así como los resultados que arrojaron los análisis estadísticos para la selección del mejor extracto que cause la inhibición en el crecimiento de las dos cepas de la especie *Rhizopus spp.*

5.1. Evaluación del rendimiento de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde.

Los tres extractos obtenidos para la evaluación *in vitro* de las dos cepas del hongo *Rhizopus spp.*, mostraron un rendimiento de 4,18 % como el más alto para el extracto obtenido por proceso de hidrodestilación con agua como solvente, seguido de 2,08 % para el extracto en frío usando etanol como solvente y finalmente de 0,76% para el extracto en frío usando cloroformo como solvente. Estos resultados se pueden observar en la tabla 5. Cada rendimiento fue calculado aplicando la fórmula del método gravimétrico - volumétrico (fórmula 1).

Tabla 5.

Rendimientos y características físicas de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde

Extractos	Método utilizado	Rendimiento (%)	Características
Clorofórmico	Frío con etanol (96%)	0,76	Polvo color café verdoso oscuro
Etanólico	Frío con cloroformo	2,08	Polvo color café amarillento claro
Acuoso	Hidrodestilador	4,18	Polvo color café oscuro

Peñuelas, Arellano, Vargas, Lares, Cantú, Hernández, Gutiérrez y Mungarro (2015), en sus ensayos, obtuvieron un rendimiento del 4,71 % al usar etanol como solvente y 3,24 % con agua como solvente en el proceso de análisis de

extractos vegetales obtenidos de la planta gobernadora originaria de México (*Larrea tridentata*). Estos extractos se usaron para el control de los hongos *Alternaria sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, y *Rhizopus sp.*, mediante procesos físicos de extracción por maceración y evaporación en frío. Se comparó este rendimiento por usar metodología y solvente semejante al usado en la obtención de los tres extractos (etanólico, clorofórmico y acuoso), la diferencia entre los rendimientos es atribuida a que se usó diferente especie, condiciones ambientales del lugar de desarrollo y también a las metodologías de extracción usadas, ya que la temperatura y los equipos juegan un papel importante en la obtención de los compuestos de interés.

Esta teoría es ratificada al analizar la publicación Sarmento, Machado, Petrus, Tamanini y Bolzan (2008), quienes realizaron ensayos para la obtención de extractos a partir de la cáscara de cacao y obtuvieron un rendimiento del 0,50 % para los extractos con solventes clorofórmicos y 15 % con solventes acuosos con fraccionamiento líquido – líquido mediante agitación magnética. Se comparó la cáscara de banano verde con la cáscara de cacao por presentar estructuras fibrosas, característica que permite la extracción de altas cantidades de sustancias presentes.

5.2. Evaluación económica de los extractos obtenidos

La tabla 6 muestra los costos de producción por cada gramo obtenido de los tres tipos de extractos a nivel de laboratorio. El rubro para la maquinaria se calculó en base al costo de la energía por hora de producción para cada uno de los equipos usados. El extracto acuoso tiene un costo de producción de \$ 1,38 considerando 480 horas de producción, mientras que el extracto con etanol como solvente tiene un costo de \$ 4,95 con 339 horas de producción y el concentrado clorofórmico se logró obtener a un costo de \$ 31,40 para 337 horas de producción.

Tabla 6.

Costo de producción por gramo de cada extracto

Variable	Acuoso	Etanólico	Clorofórmico
Tiempo (h)	480	339	337
Maquinaria (\$)	0,44	1,86	1,30
Reactivos (\$)	0,66	2,61	28,80
Materiales (\$)	0,27	0,47	1,30
Costo producción	1,38	4,95	31,40

El extracto acuoso fue el más económico y cuenta con mayor número de horas de extracción. La maquinaria y los reactivos son los rubros con mayor influencia sobre el costo de producción. La maquinaria utilizada para el extracto acuoso fue un hidroddestilador, estufa y liofilizador con agua como solvente, mientras que para los dos extractos se usó, además de un liofilizador, un agitador orbital y un rotavapor, con etanol y cloroformo como solventes. El uso del liofilizador para cada uno de los extractos es primordial ya que facilita la eliminación del agua por proceso de sublimación a -70 °C sin retirar o eliminar los principios activos de cada extracto. Además, el rotavapor usado para los extractos con etanol y cloroformo ayudó a separar los solventes de los extractos por arrastre de vapor sin perder sus componentes activos. Al usar hidroddestilador, liofilizador, agitador orbital, rotavapor y estufa como maquinaria para la extracción se produjo la disminución del rendimiento y por ende un aumento en las horas de obtención.

5.3. Identificación de las dos cepas de *Rhizopus spp.*

En la figura 6.a y 6.b, se pueden observar los esporangios de dos cepas del hongo *Rhizopus spp.*, aislados de tomates de mesa con síntomas de pudrición.

Las esporas en los dos casos son muy similares al formar conidias ovaladas en forma de racimos.

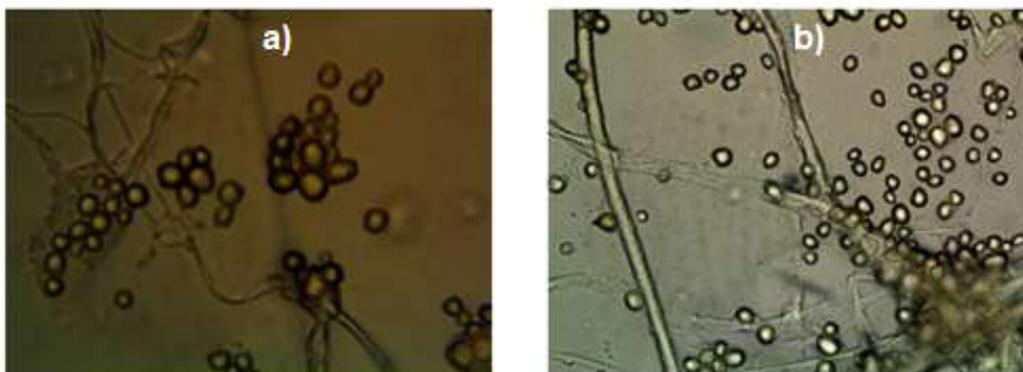


Figura 6. Esporas de hongos de la especie *Rhizopus spp.*, observados en microscopio con el lente 100x.

- a) Cepa gris
- b) Cepa blanca

Los hongos observados en la figura 6 pertenecen al grupo *Zygomycota* del reino Fungi y se caracteriza por la formación de zigosporas (Cepero, Restrepo y Franco, 2012). Las dos cepas observadas presentaron esporangios esféricos. La cepa 1 (figura 6.a) presentó esporangios largos y rizoides no ramificados que se origina en hifas no tabicadas y micelios hialinos. La cepa 2 (figura 6.b) presentó hifas gruesas con abundantes rizoides y gran cantidad de esporangiosporas, estas son características que coinciden con (Forbes, Sahn y Weissfeld, 2009).

5.4. Evaluación del efecto del etanol sobre el crecimiento de las dos cepas de *Rhizopus spp.*

Para la evaluación se utilizó una concentración de 10^4 esporas/ml, por ser la concentración con mejor crecimiento uniforme y estar en el rango de longitud de onda permitido para la lectura de absorbancia, lo cual concuerda con los

resultados obtenidos por Bautista, Velázquez y Hernández (2008). La figura 7 a y b muestran el crecimiento de las dos cepas gris y blanca de *Rhizopus spp.* respectivamente, en donde se puede observar el crecimiento de los mismo en las diferentes concentraciones de etanol (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 10 %), así como el crecimiento del hongo naturalmente a una concentración de 0 % de etanol, en donde se puede observar las tres fases de crecimiento de un hongo: latencia, exponencial y estacionaria (Agrios, 2005).

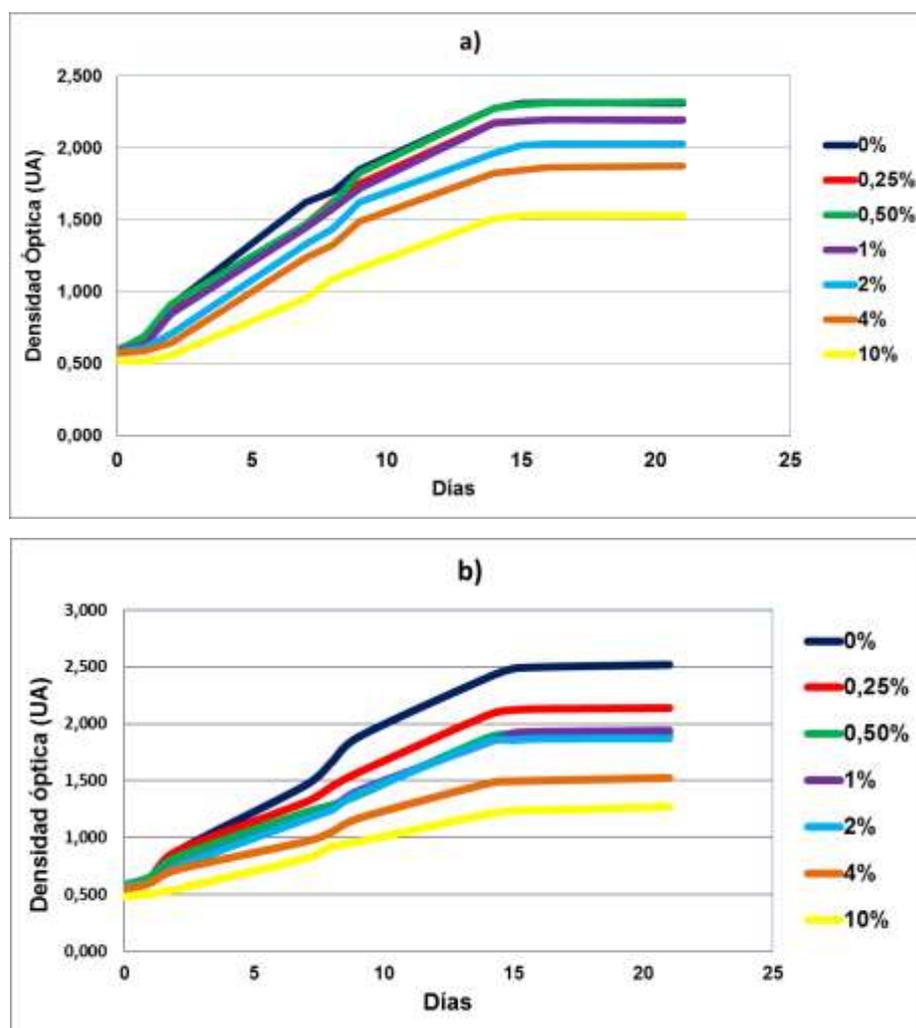


Figura 7. Evaluación de las concentraciones de etanol (0,25; 0,5; 1; 2; 4; 10 %) sobre dos cepas de *Rhizopus spp.* Bajo condiciones *in vitro* durante 21 días.

- a) Cepa 1 (Gris)
b) Cepa 2 (blanca)

Como se observa en la figura 7a y 7b, la concentración de 0,25 % del solvente es la curva con mayor semejanza a la de crecimiento natural con 0 % del solvente para las dos cepas, lo que significa que a 0,25 % de etanol no se produce un efecto negativo para que los hongos cumplan con las tres fases de crecimiento: latencia, exponencial y estacionaria (López, López, Vazquez, y Rodriguez, 2005). Mientras que la concentración de 10 % de etanol causa la inhibición del crecimiento de las dos cepas de hongos. Además, se aplicó un análisis estadístico para confirmar que no exista diferencias significativas en la concentración de 0,25 % (Ver anexo 4).

Las concentraciones mayores a 0,025 % de etanol para el hongo *Rhizopus spp.*, limitan al hongo a llegar a la fase exponencial, según los estudios realizados por Peñuelas et al., (2015) quienes usaron tres concentraciones (0,15; 0,20; 0,25 %) de etanol y obtuvieron inhibición a partir de 0,25 % comprobando que el etanol no sea el solvente que cause la inhibición del crecimiento del hongo.

Por otro lado, estudios realizados por Cornejo (1997) mostraron que al usar una concentración del 0,1 % de etanol se logra el 100 % de germinación de las esporas de *Rhizopus spp.*, mientras que al usar una concentración mayor con 1 % de etanol el porcentaje de germinación disminuye en un 10 % y a concentraciones mayores del 5 % de etanol se logra la inhibición total de la germinación del hongo *Rhizopus spp.*

5.5. Evaluación *in vitro* de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre las dos cepas de *Rhizopus spp.*

5.5.1. Evaluación *in vitro* de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre cepa 1 (Hongo gris)

Para determinar cuál de los tres extractos causa inhibición significativa en el crecimiento del hongo con respecto a su crecimiento natural sin ningún control, se realizó un ANOVA con DBCA (tabla 7).

Tabla 7.

ANOVA para análisis de varianza para cepa 1- hongo gris para los tres extractos con las 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, testigo y fungicida)

Fuente de variación	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor-p
Total	143	4,97			
Extracto	2	2,54	1,27	2386,03	0,00
Concentraciones	15	1,33	0,09	166,86	0,00
Ext. * Conc.	30	1,05	0,04	66,12	0,00
Error experimental	94	0,05	0,00		

En la tabla 7, el ANOVA descompone a las fuentes de variación en tres componentes: un componente entre los tres extractos, un segundo componente entre 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 µg/ml, testigo y fungicida) y un tercer componente entre los tratamientos y extractos mencionados, para los cuales se evaluó el valor-p con un 95 % de nivel de confianza. Como el valor-p de los tres componentes analizados es menor a 0,05 se deduce que existe diferencia significativa entre las medias de las unidades de absorbancia, los extractos y el crecimiento de la cepa 1-hongo gris con respecto a cada concentración de cada extracto.

Al analizar los datos se observó una diferencia significativa entre los diferentes extractos usados, como se evidencia en la figura 8.

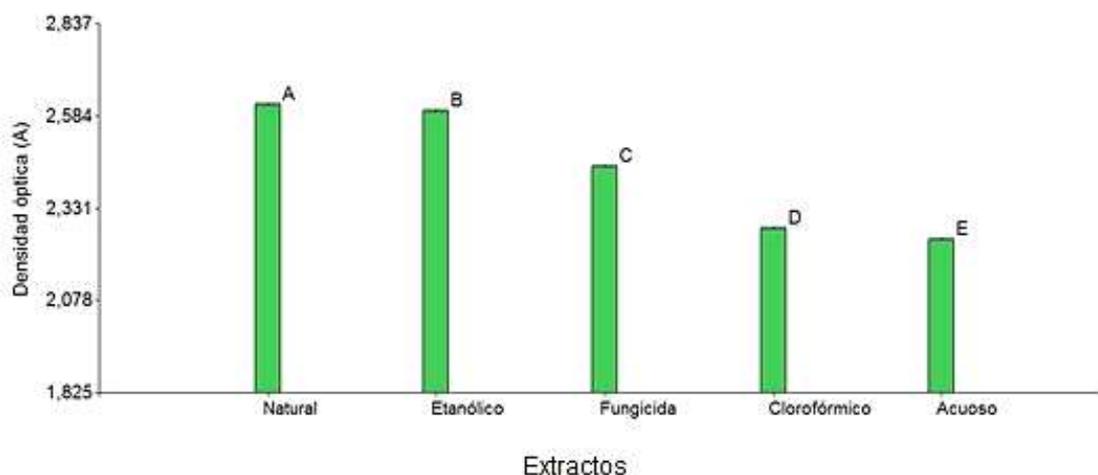


Figura 8. Comparación entre tratamientos según la densidad óptica para Cepa 1- Hongo gris.

La figura 8 demuestra que el extracto acuoso y clorofórmico presentan una diferencia significativa en relación con el crecimiento del hongo en condiciones naturales sin control. Por lo tanto, al existir diferencia entre los tratamientos, es necesario comparar la absorbancia obtenida de cada concentración mediante método LSD (Figura 9).

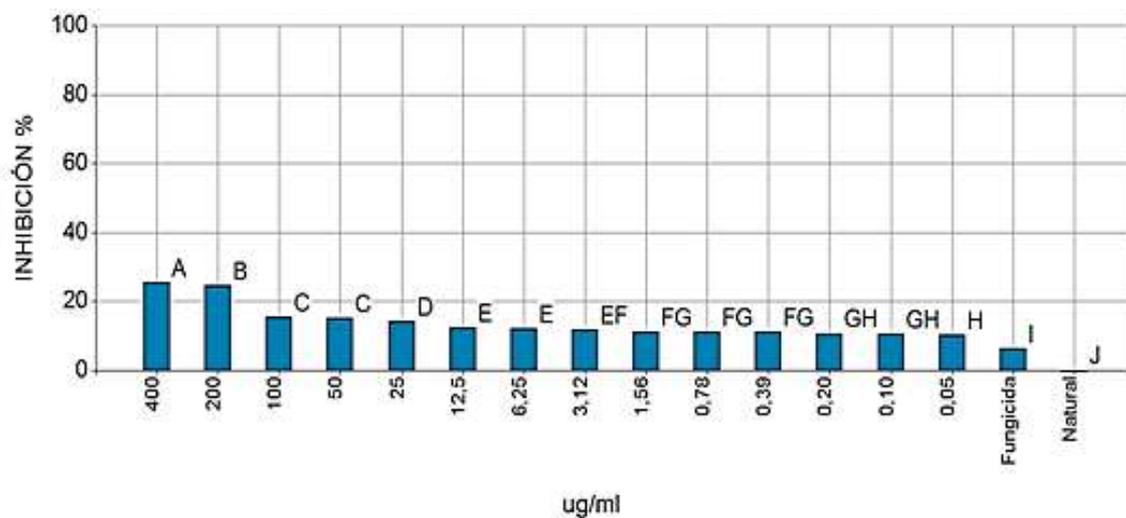


Figura 9. Porcentaje de Inhibición en la cepa 1 (hongo gris) causado por el extracto acuoso, fungicida y natural por método LSD.

De la figura 9, se puede determinar que hay 9 grupos homogéneos. Los datos demuestran que la inhibición producida por el extracto acuoso es de 25,22 % a una concentración de 400 µg/ml. Todas las concentraciones mostraron diferencia en la medida de absorbancia con el fungicida químico. Existe diferencia entre la absorbancia obtenida del testigo en comparación con el fungicida. Además, se reporta que la concentración mínima inhibitoria es mayor o igual a 400 µg/ml.

Valero, González y González (2014) demostraron que los extractos acuosos obtenidos a partir de hojas de plantas de *Larreas tridentata*, *Fluorensia cernua* y *Quercus pungens* sobre el control del crecimiento de *Rhizopus spp.*, en concentración del 20 %, causó la inhibición del 18,03 %; 44,96 % y 63,43 % respectivamente, lo que nos muestra que los extractos acuosos obtenidos a partir de la cáscara de banano verde en estado de madurez fisiológica funcionan en menor proporción que los extractos de las especies *Fluorensia cernua* y *Quercus pungens*, pero en mayor proporción que el extracto obtenido de la especie *Larreas tridentat*.

Los estudios hechos por Peñuelas et al., (2015) y Velázquez et al., (2015) demuestran que si se puede inhibir el crecimiento radial del hongo *Rhizopus spp.*, con los extractos obtenidos de solventes como: agua y etanol. Lo que demuestra que los componentes activos podrían causar la inhibición en la producción de amilasa sobre las paredes de los hongos. Esto es confirmado por los ensayos de Mokbel y Hashinaga (2005), al referirse al efecto inhibitorio de los componentes activos. El tanino siendo el principal componente activo de ellos, por ser compuestos fáciles de extraer por su solubilidad en agua y a temperaturas altas, logrando su máximo rendimiento frente a los extractos con etanol y cloroformo.

5.5.2. Evaluación *in vitro* de los extractos obtenidos de la cáscara de banano verde sobre cepa 2 (Hongo blanco)

El ANOVA y la comparación de medias realizado para los tres extractos demostraron diferencias significativas entre cada uno (Figura 10 y Tabla 8).

Tabla 8.

ANOVA para análisis de varianza para cepa 2- hongo blanco para los tres extractos con las 14 concentraciones, testigo y fungicida)

Fuente de variación	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor-p
Total	143	6,75			
Extracto	2	3,82	1,91	3086,30	0,00
Concentraciones	15	1,76	0,12	189,85	0,00
Ext. * Conc.	30	1,10	0,04	59,22	0,00
Error Exp.	94	0,06	0,00		

En la tabla 8, el ANOVA descompone a las fuentes de variación en tres componentes, tal como se realizó en la Tabla 7 para la cepa 1. El valor-p de los tres componentes analizados es menor a 0,05 de lo cual se infiere que existe diferencias entre las medias de la absorbancia, los extractos y el crecimiento de la cepa 2-hongo blanco con respecto a cada concentración de cada extracto.

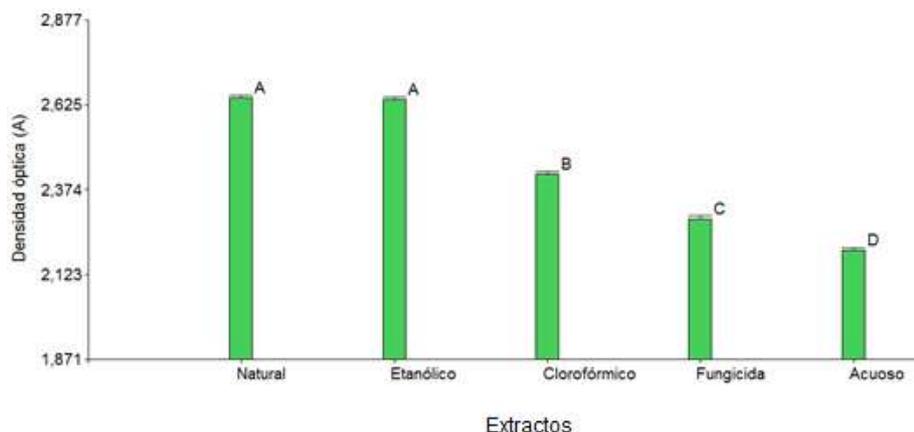


Figura 10. Comparación entre tratamientos según la densidad óptica para Cepa 2- Hongo blanco.

La figura 10 demuestra que el extracto acuoso presentó la mejor absorbancia con 2,23 unidades de absorbancia (grupo D) en comparación con la absorbancia del extracto natural que es de 2,65 unidades de absorbancia (grupo A). Lo que significa que el extracto acuoso al tener menor valor en unidades de absorbancia es mejor porque indica que la turbidez producida por el crecimiento de los hongos es baja porque se está inhibiendo su crecimiento dentro de las microplacas para lector Elisa.

Por lo tanto, al existir diferencia entre los tratamientos, es necesario comparar la absorbancia obtenida de cada concentración mediante método LSD (Figura 11).

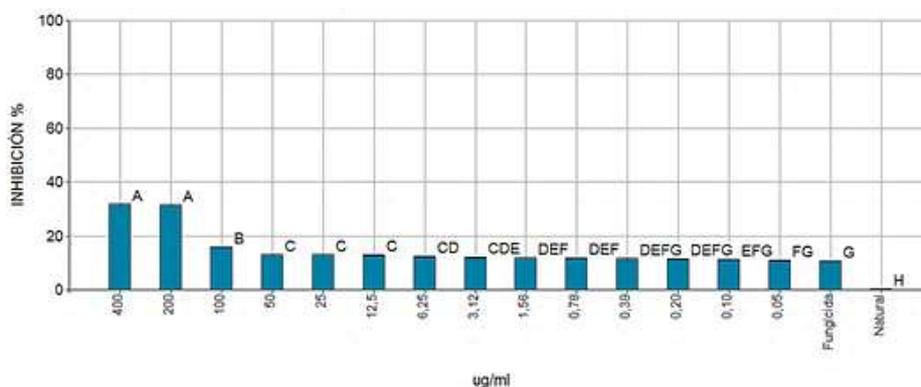


Figura 11. Inhibición en la cepa 2 (hongo blanco) causado por el extracto acuoso, fungicida y testigo con los niveles generados por método LSD.

De la figura 11 se puede determinar que hay 8 grupos homogéneos. Los datos demuestran que la inhibición producida por el extracto acuoso es de 31,51 % a 400 µg/ml muy seguido de la segunda concentración con 31,22 %. A partir de la concentración 50 µg/ml se muestran una similitud en el porcentaje de inhibición con alrededor del 12% para cada una de las dosis mencionadas.

Existe diferencia entre la absorbancia obtenida del testigo en comparación con el fungicida. Además, a partir de la concentración 1,56 µg/ml hasta la última de 0,05 µg/ml se observa una similitud en sus porcentajes con respecto al fungicida. Estos datos corroboran con Rosso (2009), los extractos de cáscara de banano verde contienen sustancias con poder antioxidante, antocianinas y compuestos fenólicos que son polares en condiciones de temperaturas altas para su extracción.

Bautista, Velázquez y Hernández (2008), realizaron extracciones en frío de hojas de la especie *Cestrum nocturnum*, con agua y etanol como solventes. Al caracterizar los extractos obtenidos, comprobaron la presencia de metilphidroxibenzoato y triclorohidroxidifenil, compuestos que causan actividad antifúngica por su capacidad oxidativa al alterar la membrana e impidiendo la esporulación de hongos poscosecha: *Botrytis, spp.*, *Rhizopus, spp.*, y *Fusarium, spp.* Los resultados de Barrera y Bautista (2008), mostraron que con el uso de 50 y 100 mg/ml de los extractos se inhibió el crecimiento micelial del hongo *Rhizopus spp.*, a partir de las 24 horas de incubación.

6. Conclusiones y Recomendaciones

6.1. Conclusiones

Para el estudio se probó inicialmente con PDA como medio de cultivo, pero las dos cepas de hongos no crecieron a pesar de dejar durante 15 días en incubación, por lo que se cambió el medio a jugo V-8, por tener en su composición hortalizas como el tomate de mesa, en efecto, el cambio fue acertado y el hongo inició su crecimiento inmediatamente observando su esporulación a partir de las 24 horas.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que hay diferencias significativas entre los tres extractos (etanólico, clorofórmico y acuoso) sobre el crecimiento de las dos cepas (1 y 2) de la especie *Rhizopus spp.* En efecto, los resultados mostraron inhibición del 25,22 % y 31,51 % respectivamente para las dos cepas de hongos mencionadas. Sin embargo, el efecto en la inhibición de cada extracto depende de la concentración aplicada para cada hongo.

El extracto acuoso fue el tratamiento con mayor efecto biológico sobre la cepa 2 del hongo *Rhizopus spp.* Este extracto mostró dos inhibiciones altas en condiciones *in vitro*, la primera de 31,51 % para la concentración más alta de 400 µg/ml muy seguido de 31,22 % para la concentración 200 µg/ml. Al comparar este porcentaje de inhibición con el fungicida comercial que mostró 10,31 % en relación con el testigo absoluto, demostrando que el extracto acuoso limita en más proporción al crecimiento del hongo que el fungicida tradicional. Los compuestos fenólicos presentes en la cáscara de banano verde principalmente los taninos poseen gran actividad antifúngica.

De acuerdo al análisis estadístico LSD usado para el presente estudio, el extracto acuoso realizado por método de extracción en caliente con agua como solvente fue el más aceptado, obteniendo las siguientes medias: 2,24 para la cepa 1 y 2,19 para la cepa 2, valores medidos en unidades de absorbancia, en

los dos caso agrupándose en el grupo D del LSD, en comparación con el tratamiento natural sin ningún control para el cual se obtuvo las siguientes medias: 2,61 cepa 1 y 2,65 cepa 2, en los dos casos agrupándose en el grupo A del LSD.

La actividad antifúngica se basa en la cantidad de compuestos activos y metabolitos secundarios presentes en los extractos (Velásquez, 2004). Los cuales determinarán la inhibición de cada extracto según la concentración utilizada para cada hongo. Es por eso que al igual que los ensayos de la cepa 2, el extracto acuoso mostró un efecto inhibitorio ligeramente menor sobre el crecimiento de la cepa 1 en condiciones *in vitro* con el 25,22 % a la máxima concentración usada de 400 µg/ml.

El extracto acuoso presentó el mayor rendimiento con 4,18 % y el menor costo de producción con \$ 1,38. Esto permite considerar a este extracto como alternativa principal para controlar al hongo *Rhizopus spp.*, a escala industrial, por la facilidad en su elaboración y el costo de producción.

Las dos cepas usadas a pesar de haber mostrado similitud en su morfología con presencia de zigosporas, mostraron diferencias en su crecimiento en condiciones *in vitro* tanto para la evaluación del efecto del etanol como para la evaluación del efecto biológico de cada extracto. La cepa 1 mostró un valor mayor en unidades de absorbancia en todas sus mediciones, mientras que la cepa 2 demostró ser un hongo menos agresivo por sus absorbancias menores que la de la cepa 1. Esto parece confirmar que la virulencia de las cepas difiere por expresión del genoma.

El estudio se limitó a la obtención de los tres extractos: acuoso en caliente por hidrodestilación; etanólico y clorofórmico en frío por agitación, debido a que no se tenía las mismas condiciones del estudio inicial para obtener los dos extractos acuoso y orgánico en caliente por soxhlet. Las cáscaras debían permanecer durante 48 horas continuas en el equipo, pero al no poder dejar en

el proceso continuamente por ese periodo se optó por no realizar el análisis con los dos extractos mencionados, para evitar que los compuestos activos presentes se pierdan durante el proceso.

6.2. Recomendaciones

Según los resultados obtenidos durante la elaboración de este proyecto se recomienda:

Realizar análisis con mayor profundidad para evaluar analítica y cuantitativamente con exactitud los compuestos químicos que se encuentran presentes en cada extracto para saber cuáles son los compuestos inhibitorios y probar con más hongos.

Ampliar los estudios con la investigación de otras especies de plantas, métodos y solventes que mejoren los rendimientos y costos obtenidos en el control de fitopatógenos en poscosecha.

Es importante que para estudios posteriores se realice previamente un análisis a profundidad del hongo a controlar con el fin de conocer su curva de crecimiento y en base a eso saber con exactitud los puntos a controlar en el tiempo.

Para la obtención de mayor cantidad de compuestos con principios activos es importante que las cáscaras a usar estén lo más verdes posible, es decir en etapa de madurez fisiológica.

Se recomienda que para establecer la concentración de esporas a usar en el estudio mediante el conteo en cámara de Neubauer, se proceda a filtrar el hongo y agitar en Vórtex, debido a que *Rhizopus spp.*, posee esporas grandes y de esta manera se logra separar las hifas.

En la elaboración de los extractos para poder retirar la humedad del extracto acuoso es importante ayudarse de un liofilizador para evitar la pérdida de los compuestos de interés y evitar en lo posible el uso de deshidratadores, estufa, mufla, etc.

Pruebas de control *in vivo* serian la siguiente fase para evaluar el efecto biológico del extracto obtenido por extracción en calor con agua como solvente, ya que fue el que dio mejores resultados en cuanto a su costo de producción y a su % de inhibición de crecimiento de las dos cepas de hongos.

REFERENCIAS

- Agarwal, S. y Rao, A. (2000). *Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases*. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <http://www.cmaj.ca/content/163/6/739.full.pdf+html>
- Agrios, G. (2005). *Fitopatología*. (5.^a ed.). México: Limusa.
- Aguirre, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J. y Valenzuela, R. (2014). *Biodiversidad de hongos en México*. Recuperado el 3 de junio de 2017 de http://www.ib.unam.mx/m/revista/pdfs/09.-_1297.pdf
- Alarcón, A. (2013). *Calidad poscosecha del tomate (*solanum lycopersicum* L.) cultivado en sistemas ecologicos de fertilizacion*. (Tesis de maestría). Universidad Politécnica de madrid.
- Angulo, M., Reyes, E., García, R., Carrillo, J., Salazar, E. y Valdéz, J. (2009). *Extractos de Semilla de *Swietenia humilis* Zucc. con Actividad Antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill*. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000200001
- Aristegui, B. (2002). *El reino de los hongos*. Recuperado el 25 de junio de 2017 de <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/001.PDF>
- Banco Central del Ecuador. (2010). *Encuestas de Coyuntura*. Recuperado el 12 de junio de 2017 de <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/PublicacionesNotas/Catalogo/Encuestas/Coyuntura/Integradas/etc201004.pdf>
- Barraza, F., Fischer, G. y Cardona, C. (2004). *Estudio del proceso de crecimiento del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle del Sinú medio, Colombia*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <http://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/17771/18597>
- Barrera, L. y Bautista, S. (2008). *Actividad Antifúngica de Polvos, Extractos y Fracciones de *Cestrum nocturnum* L. Sobre el Crecimiento Micelial*

- de *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Recuperado el 25 de abril de 2017 de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v26n1/v26n1a5.pdf>
- Bautista, S., Hernández, M. y Barrera, L. (2000). *Antifungal Screening of Plants of the State of Morelos, Mexico Against Four Fungal Postharvest Pathogens of Fruits and Vegetables*. Recuperado el 26 de junio de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61218105>
- Bautista, S., Velázquez, M. y Hernández, A. (2008). Estrategias de Control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, Agente Causal de Pudriciones Postcosecha en Productos Agrícolas. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092008000100008&script=sci_arttext
- Blasco, G. y Gómez, F. (2014). Propiedades funcionales del plátano (*Musa sp*). Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/veracruzana/muv-2014/muv142d.pdf>
- 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*. (Tesis de maestría). Universidad nacional mayor de San Marcos.
- Cepero, M., Restrepo, S. y Franco, A. (2012). *Biología de los hongos*. Colombia: Universidad de los Andes.
- Cerón, I. y Cardona, C. (2011). Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. Recuperado el 13 de junio de 2017 de <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v7n13/v7n13a04.pdf>
- Cerutti, M. y Neumayer, F. (2004). Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Recuperado el 26 de mayo de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=87701214>
- Cornejo, G. (1997). Uso de etanol, acetona, b-ionona, 2-nonanona, hexanal y hexanol para el control de enfermedades poscosecha de guayaba (*psidium guajava* L.). (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de

Queretaro.

- Donli, P. y Dauda, H. (2003). *Evaluation of aqueous Moringa seed extract as a seed treatment biofungicide for groundnuts*. Recuperado el 4 de junio de 2017 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ps.595/abstract;jsessionid=DCE7FE707F8F5C53F204C9327E19AD21.f04t02>
- Edris, A. y Farrag, E. (2003). *Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase*. Recuperado el 26 de mayo de 2017 de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/food.200390021/abstract>
- Ellinger, S., Ellinger, J. y Stehle, P. (2006). *Tomatoes, tomato products and lycopene in the prevention and treatment of prostate cancer: do we have the evidence from intervention studies?*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.1097/01.mco.0000247470.64532.34>
- Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C. y Martin, A. (2009). *Manual del cultivo del tomate (Lycopersicon esculentum Mill.)*. Chile: Innova Chile Corfo.
- FAO. (2010). *Horticultura y Fruticultura en el Ecuador*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de http://fao.org/ag/agn/pfl_report_en/_annexes/Annex4/.../Importancereport.doc
- FAO. (2011). *El daño producido por las heladas*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <http://fao.org/docrep/012/y7223s/y7223s00.htm>
- FAO. (2012). *Producción vegetal hortalizas*. Recuperado el 26 de mayo de <http://fao.org/3/a-i3818s.pdf>
- FAO. (2014). *Cosecha y Manejo poscosecha*. Recuperado el 26 de mayo de 2017 de <http://fao.org/3/a-a1374s/a1374s07.pdf>
- Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2009). *Diagnóstico microbiológico*. Estados Unidos: Médica Panamericana.
- Fresh plaza. (2016). *La producción mundial de tomates alcanza los 130*

millones de toneladas. Recuperado el 14 de junio de <http://www.freshplaza.es/article/97083/La-producción-mundial-de-tomates-alcanza-los-130-millones-de-toneladas>

Gregorio, J., Ramírez, S., López, O. y Alvarado, Á. (2015). Efecto antifúngico de hidrodestilados de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif&Par). Recuperado el 8 de mayo de 2017 de

https://www.researchgate.net/publication/299497063_Efecto_antifungico_de_hidrodestilados_de_Zingiber_officinale_Roscoe_sobre_Moniliophthora_roreri_CifPar

Gutierrez, H. y De la Vara, R. (2008). *Análisis y diseño de experimentos*. (2.^a ed.). México: McGraw-Hill.

Hazera. (2014). *Varieties of tomatoes*. Recuperado el 8 de mayo de 2017 de <http://www.hazera.com/?s=tomato>

Hernández, A., Bautista, S. y Velázquez, M. (2007). *Prospective of plant extracts for controlling postharvest diseases of horticultural products*. Recuperado el 26 de mayo de <http://www.redalyc.org/html/610/61030202/>

INEC. (2015). Estadísticas agropecuarias. Recuperado el 14 de mayo de 2017 de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>

Isaza, J. (2007). Taninos o polifenoles vegetales. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/download/5817/3399>

James, T. y O'Donnell, K. (2007). *Zygomycota*. Recuperado el 8 de junio de 2017 de <http://tolweb.org/Zygomycota>

Jaramillo, J., Rodríguez, V. y Guzmán, M. (2007). *Manual técnico: Buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas [Versión electrónica]*. Colombia: FAO.

Kouassi, H., Bajji, M., Brostaux, Y., Zhiri, A., Samb, A., Lepoivre, P. y Haïssam, M. (2010). *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. Recuperado el 8 de mayo de 2017 de <http://popups.ulg.ac.be/1780-4507/index.php?id=8888>
- Kuhar, F., Castiglia, V. y Papinutti, L. (2013). Morfología de los hongos. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <http://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/7765>
- Londoño, M. (2009). *Cosecha y Manejo Poscosecha tomate [versión electrónica]*. Colombia: FAO.
- López, A., López, S., Vazquez, M. y Rodriguez, S. (2005). Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223212.pdf>
- MAGAP. (2015). Tomate riñón. Recuperado el 26 de mayo de 2017 de http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/cultivo/2016/bol_etin_situacional_tomate_rinon_2015.pdf
- Mahovic, M., Sargent, S., Bartz, J. y Lon Kan, E. (2002). Identificación y Control Postcosecha de las Enfermedades del Tomate en la Florida. Recuperado el 4 de junio de 2017 de <https://hortintl.cals.ncsu.edu/es/articles/identificaci-n-y-control-postcosecha-de-las-enfermedades-del-tomate-en-la-florida>
- Marienfild, S. (2010). *Mariendfeld*. Alemania: Laboratory Glassware.
- McGrath, M. (2004). *What are Fungicides?*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2004-0825-01>
- Mokbel, M. y Hashinaga, F. (2005). *Antibacterial and Antioxidant Activities of Banana (Musa, AAA cv. Cavendish) Fruits Peel*. Recuperado el 28 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2005.125.131>
- Montes, B., Restrepo, A. y Mcewen, J. (2003). Nuevos aspectos sobre la clasificación de los hongos y su posible aplicación médica. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <http://www.efn.uncor.edu/departamentos/divbioeco/divveg1/micologi>

a/practico micologia/trabajo de campo/Concepto de especie en hongos(todos).pdf

- Peñuelas, O., Arellano, M., Vargas, I., Lares, F., Cantú, E., Hernández, S., Gutierrez, G. y Mungarro, C. (2015). Bioactividad in vitro de extractos de gobernadora (*larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *alternaria tenuissima*, *aspergillus niger*, *penicillium polonicum* y *rhizopus oryzae*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.12>
- Peralta, I. y Spooner, D. (2000). *Classification of wild tomatoes: a review*. Recuperado a partir de 24 de mayo de 2017 de http://www.vcru.wisc.edu/spoonerlab/pdf/Classification_of_wild_tomatoes_a_review.pdf
- Plotto, A., Roberts, D. y Roberts, R. (2003). *Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (lycopersicon esculentum)*. Recuperado el 4 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.628.93>
- Revista iberoamericana de micología. (2002). *Rhizopus stolonifer*. Recuperado el 26 de mayo de 2017 de <http://hongos-alergenicos.reviberoammicol.com/files/038.PDF>
- Rondón, O., Sanabría, N. y Rondón, A. (2006). Respuesta *in vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *colletotrichum gloeosporioides penz*, en frutos de mango. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S0002-192X2006000200005&script=sci_abstract
- Sánchez, M. (2007). Manejo de Enfermedades del Tomate. Recuperado el 8 de mayo de 2017 de http://www.funprover.org/formatos/manualTomate/Manejo_de_Enfermedades_del_Tomate.pdf
- Sarmiento, L., Machado, R., Petrus, J., Tamanini, T. y Bolzan, O. (2008). *Extraction of polyphenols from cocoa seeds and concentration through polymeric membranes*. Recuperado el 26 de mayo de 2017 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.supflu.2007.11.007>

- Singh, M., Singh, S., Devi, M., Devi, L., Singh, N. y Lee, S. (2008). *Synthesis and in vitro evaluation of the antifungal activities of dihydropyrimidinones*. Recuperado el 24 de mayo de 2017 de <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.10.063>
- Spooner, D., Peralta, I. y Knapp, S. (2005). *Comparison of AFLPs with other markers for phylogenetic inference in wild tomatoes [Solanum L. section Lycopersicon (Mill.) Wettst.]*. Recuperado el 2 de mayo de 2017 de <https://doi.org/10.2307/25065301>
- Universidad de almería. (2010). *Filo Zygomycota*. Recuperado el 24 de mayo de 2017 de <https://w3.ual.es/GruposInv/myco-ual/zigos.htm>
- Valero, J., González, C. y González, R. (2014). Efecto de los extractos acuosos de hojas de plantas de gobernadora (*Larreas tridentata*), hojasesn (*Flourensia cernua*) y encino (*Quercus pungens*), sobre el crecimiento micelial in vitro de hongos fitopatógenos. *Multidisciplinary Scientific*, 24(5), 13-19 doi: 10.15174.au.2014.630
- Velásquez, A. (2004). Extracción de taninos presentes en el banano verde. Recuperado el 20 de mayo de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69510203>
- Velázquez, A., Angulo, M., García, R., Carrillo, J. y Guerrero, C. (2006). Extractos de semilla de *Moringa oleífera Lam* . para el Control de *Rhizopus stolonifer* (*Ehrenb . rFr .*) Vuill. Recuperado el 8 de mayo de 2017 de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61224201>

ANEXOS

ANEXO 1. ANOVA de comparación de la densidad óptica para evaluación de etanol sobre las dos cepas.

Fuente de variación	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	Valor-P
Total	125	46,70			
Cepa	1	1,18	1,18	4,09	0,04
Concentraciones	6	12,21	2,04	7,08	0,00
Cepa x Conc.	6	1,09	0,18	0,63	0,70
Error experimental	112	0,05	0,29		

ANEXO 2. ANOVA de comparación de la densidad óptica por concentración de etanol sobre las dos cepas.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,86691

Error: 0,2877 gl: 112

CONC. ETANOL	CEPA	Medias	n	E.E.
1	20	2,50	9	0,18 A
1	10	2,32	9	0,18 A B
3	10	2,31	9	0,18 A B
2	10	2,20	9	0,18 A B
4	10	2,19	9	0,18 A B
2	20	2,13	9	0,18 A B
5	10	2,03	9	0,18 A B C
4	20	1,93	9	0,18 A B C
3	20	1,91	9	0,18 A B C
5	20	1,87	9	0,18 A B C
6	10	1,86	9	0,18 A B C
7	10	1,53	9	0,18 B C
6	20	1,50	9	0,18 B C
7	20	1,24	9	0,18 C

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

ANEXO 3. Composición de medio de cultivo V-8.

Ingrediente	Cantidad
Caldo V-8	200 ml
Carbonato de calcio	3 g

Agar	15 g
Agua destilada	Aforar 1 L

ANEXO 4. Resultados de ANOVA de las concentraciones de etanol sobre las dos cepas de hongos.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,85841

Error: 0,2821 gl: 112

CONC.	ETANOL	CEPA	Medias	n	E.E.
1	20		2,48	9	0,18 A
1	10		2,31	9	0,18 A B
3	10		2,30	9	0,18 A B
2	10		2,19	9	0,18 A B
4	10		2,18	9	0,18 A B
2	20		2,12	9	0,18 A B
5	10		2,02	9	0,18 A B C
4	20		1,92	9	0,18 A B C
3	20		1,91	9	0,18 A B C
5	20		1,86	9	0,18 A B C
6	10		1,85	9	0,18 A B C
7	10		1,53	9	0,18 B C
6	20		1,50	9	0,18 B C
7	20		1,24	9	0,18 C

En donde:

CONCENTRACIONES DE ETANOL	1	0 %
	2	0,25 %
	3	0,5 %
	4	1 %
	5	2 %
	6	4 %
	7	10 %
CEPAS	10	Gris
	20	blanca

ANEXO 5. Glosario de abreviaciones.

- **P.** Peso
- **% RE** Porcentaje de rendimiento
- **g** Gramos
- **P.E.** Peso extracto
- **ANOVA** Análisis de varianza
- **CM** Cuadrado medio
- ***F_o*** Factor F
- **LSD** Least significant difference
- **h** horas
- **UA** Unidades de absorbancia
- **DBCA** Diseño de bloques completamente al azar
- **Ext.** Extractos
- **Conc.** Concentración
- **A** Absorbancia
- **Exp.** Experimental
- **PDA** Potato dextrose agar
- **Cepa 1** Hongo gris
- **Cepa 2** Hongo blanco

