

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ingeniería en Ciencias Naturales y Matemáticas

“Bioprospección de especies con actividad antimicrobiana In vitro contra patógenos de cacao y banano”

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Marcela Denisse Muzzio Villafuerte

Karen Maricela Segovia Loor

Tutor(a):

Patricia Manzano Santana, PhD.

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a nuestras familias, quienes han sido un pilar fundamental en nuestro desarrollo académico.

A nuestros profesores por compartir su conocimiento y a nuestros amigos de la carrera por apoyarnos en situaciones académicas y personales.

Finalmente, nos dedicamos este trabajo por el arduo compromiso y esfuerzo dedicado en cada etapa de su desarrollo.

Marcela Muzzio Villafuerte y Karen Segovia Loor

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradecemos a Dios por permitirnos culminar nuestra etapa universitaria, sin él, nada de esto hubiera sido posible.

A nuestros padres, quienes han sido una guía en nuestra vida desde siempre y hasta el día de hoy nos siguen acompañando y apoyando.

A nuestros abuelos, quienes, a pesar de la distancia siempre han creído en nosotras y están orgullosos de cada logro obtenido.

A nuestros amigos, con quienes hemos compartido increíbles anécdotas, juntos, apoyándonos entre nosotros.

A la música que nos acompañó durante largas jornadas de trabajo, y nos brindaban energía, motivación e incluso cálidas palabras cuando las necesitábamos.

A nuestra tutora Patricia Manzano y a Glenda Piloza por su apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo.

Finalmente, llegar hasta este punto no ha sido fácil pero tampoco imposible. Nos gustaría seguir recordando esta frase por mucho tiempo:

“Lo estás haciendo bien, sólo soporta las dificultades un poco más, tomarás tu tiempo, puedes hacerlo bien”.

Marcela Muzzio Villafuerte y Karen Segovia Loor

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me(nos) corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *(nombre de los participantes)* y doy(damos) mi(nuestro) consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Marcela Muzzio Villafuerte



Karen Segovia Loor

EVALUADORES

.....
Nadia Flores Manrique, M.Sc.

PROFESOR DE LA MATERIA

.....
Patricia Manzano Santana, PhD.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La finalidad de este estudio es buscar alternativas para la elaboración de futuros fungicidas naturales mediante la bioprospección de especies vegetales. El proyecto se enfocó en evaluar el potencial antifúngico de siete especies, siendo estas, *Origanum vulgare* (orégano) y *Plectranthus amboinicus* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Allium sativum* (ajo), *Theobroma cacao* (cáscaras de cacao) y *Vernonanthura Patens* (laritaco), contra los hongos *Fusarium verticillioides*, *Fusarium globosum* y *Moniliophthora roreri*. La propuesta se desarrolló a partir de una revisión bibliográfica para la selección de especies, luego, estas fueron recolectadas y secadas. Posteriormente, se obtuvieron los aceites esenciales de orégano y tomillo, empleando la destilación y los extractos de las especies restantes, por maceración. Para la identificación y cuantificación de los compuestos activos se realizó un análisis por CG-EM, mientras que, para la determinación cuantitativa de los compuestos fenólicos, se empleó una modificación del ensayo de Folin-Ciocalteu. El análisis cromatográfico mostró que los componentes mayoritarios en el aceite de tomillo fueron timol (31.8%) y p-cimeno (27.6%), para el aceite de orégano (*O. vulgare*), γ -terpineno (26.9%), mientras que para el aceite de orégano (*P. amboinicus*), carvacrol-timol (47.1%). En cuanto a la cuantificación de compuestos fenólicos, las especies con mayor concentración fueron las cáscaras de cacao y la albahaca con 8477 ppm y 5069 ppm, respectivamente. Finalmente, se realizó una evaluación in vitro de los aceites y extractos con los patógenos, siendo el ajo la especie que presentó mayor inhibición contra *F. verticillioides* a partir de 6000 ppm.

Palabras claves: Bioprospección, aceite esencial, extracto, patógenos, potencial antifúngico.

ABSTRACT

*In this study, the purpose is to search for alternatives to develop future natural fungicides through the bioprospecting of plant species. This project was focused on evaluating the antifungal potential of seven species, such as *Origanum vulgare* (oregano) and *Plectranthus amboinicus* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Ocimum basilicum* (basil), *Allium sativum* (garlic), *Theobroma cacao* (cocoa pods) and *Vernonanthura Patens* (laritaco), against *Fusarium verticillioides*, *Fusarium globosum* and *Moniliophthora roreri*. In order to select the species, a bibliographic review was done. Plants were recollected and dried. Then, the essential oils of oregano and thyme were obtained by distillation while the extracts of the other species were prepared by maceration. For the identification and quantification of the active compounds, a GC-MS analysis was performed and for the quantitative determination of the phenolic compounds, a modification of the Folin-Ciocalteu assay was used. Chromatographic analysis showed the major components in thyme oil were thymol (31.8%) and p-cymene (27.6%), for oregano oil (*O. vulgare*), γ -terpinene (26.9%), while for oregano oil (*P. amboinicus*), carvacrol-thymol (47.1%). For the quantification of phenolic compounds, the species with the highest concentration were cocoa pods and basil with 8477 ppm and 5069 ppm, respectively. Finally, an *in vitro* evaluation of the oils and extracts with the pathogens was carried out, results showed garlic was the most inhibitor against *F. verticillioides* above 6000 ppm.*

Keywords: Bioprospecting, essential oil, extract, pathogens, antifungal potential.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ABREVIATURAS	VII
SIMBOLOGÍA.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE APÉNDICE B.....	X
ÍNDICE DE APÉNDICE C	X
ÍNDICE DE TABLAS	XI
1 Introducción	1
1.1 Descripción del problema	1
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos.....	4
1.4 Marco Teórico	5
1.4.1 Bioprospección	5
1.4.2 Actividad antimicrobiana	5
1.4.3 Metabolitos primarios.....	5
1.4.4 Metabolitos secundarios	6
1.4.5 Hongos	6
1.4.6 Tratamientos de control para género <i>Fusarium</i>	10
1.4.7 Tratamientos de control para género <i>Moniliophthora</i>	11
1.4.8 Aceites esenciales y extractos vegetales	11
1.4.9 Secado	13
1.4.10 Orégano	13
1.4.11 Tomillo.....	15

1.4.12	Albahaca	16
1.4.13	Ajo	17
1.4.14	Cáscaras de cacao	17
1.4.15	Laritaco.....	18
1.4.16	Restricciones legales.....	21
2	Metodología	22
2.1	Diseño experimental.....	22
2.2	Revisión bibliográfica	22
2.3	Selección de especies.....	23
2.4	Recolección de especies.....	23
2.5	Secado de especies	24
2.5.1	Orégano, albahaca y laritaco	25
2.5.2	Tomillo	25
2.5.3	Cáscaras de cacao	26
2.5.4	Ajo	27
2.6	Identificación de especies	27
2.7	Obtención de aceites esenciales y extractos	28
2.7.1	Aceites esenciales	28
2.7.2	Aceite esencial de Orégano S*	28
2.7.3	Aceite esencial de Orégano C*	29
2.7.4	Aceite esencial de tomillo	29
2.7.5	Extractos naturales	30
2.7.6	Extracto de albahaca	30
2.7.7	Extracto de ajo.....	30
2.7.8	Extracto de cáscaras de cacao	31
2.7.9	Extracto de laritaco	32
2.8	CG-EM.....	32

2.9	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	33
2.10	Evaluación en patógenos.....	33
2.10.1	Cepas.....	33
2.10.2	Ensayos de inhibición de aceites esenciales.....	34
2.10.3	Ensayos de inhibición de extractos vegetales.....	34
2.11	Elaboración del flyer Informativo.....	34
3	Resultados y análisis.....	35
3.1	Obtención de Aceites esenciales e hidrolatos.....	35
3.2	Obtención de extractos.....	37
3.3	Cuantificación de compuestos fenólicos.....	38
3.4	Aceite esencial e hidrolato de Orégano S*.....	46
3.5	Aceite esencial de Orégano C*.....	48
3.6	Aceite esencial de tomillo.....	51
3.7	Extracto de albahaca.....	53
3.8	Extracto de ajo.....	54
3.9	Extracto de cáscaras de cacao.....	56
3.10	Extracto de laritaco.....	57
3.11	Análisis económico de producción.....	58
3.11.1	Producción de aceite esencial.....	58
3.11.2	Producción de extractos.....	60
4	Conclusiones y Recomendaciones.....	62
4.1	Conclusiones.....	62
4.2	Recomendaciones.....	63
APÉNDICE A	74
A.1	Ecuaciones para rendimiento de aceites esenciales.....	74
A.2	Ecuaciones para rendimiento de extractos naturales.....	74
APÉNDICE B	75

APÉNDICE C77

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
FCNM	Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas
CIBE	Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador
ONU	Organización de las Naciones Unidas
MAAE	Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica

SIMBOLOGÍA

m	Metro
g	Gramo
mg	Miligramo
Lb	Libra
min	Minutos
h	Hora
msnm	Metros sobre el nivel del mar
pH	Potencial de Hidrógeno
L	Litro
mL	Mililitro
µL	Microlitro
ppm	Partes por millón
°C	Grados Celsius
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
APD	Agar de Papa y Dextrosa
DMSO	Dimetilsulfóxido
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
Orégano S*	Orégano proveniente de la Sierra
Orégano C*	Orégano proveniente de la Costa
AE	Aceite Esencial
E	Extracto
H	Hidrolato
AEOS*	Aceite Esencial de Orégano S*
AEOC*	Aceite Esencial de Orégano C*
AET	Aceite Esencial de Tomillo
HOS*	Hidrolato de Orégano S*
HOC*	Hidrolato de Orégano C*
HT	Hidrolato de Tomillo

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Síntomas por <i>Fusarium</i>	7
Figura 1.2 Síntomas de moniliasis.....	10
Figura 1.3 Tipos de orégano.	13
Figura 1.4 Estructura química de los principales componentes en óregano	14
Figura 1.5 Tomillo (<i>Thymus vulgaris</i>)	15
Figura 1.6 Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>).....	16
Figura 1.7 Ajo (<i>Allium sativum</i>).....	17
Figura 1.8 Cáscaras de cacao (<i>Theobroma cacao</i>).....	18
Figura 1.9 Laritaco (<i>Vernonanthura patens</i>)	19
Figura 1.10 Compuestos activos con actividad antifúngica en <i>V. patens</i>	20
Figura 2.1 Secado de orégano y albahaca al ambiente.....	25
Figura 2.2 Secado de tomillo al ambiente.....	26
Figura 2.3 Secado de cáscaras de cacao al ambiente	26
Figura 2.4 Muestras secadas y prensadas para herbario	27
Figura 2.5 Montaje del sistema de destilación	28
Figura 2.6 Elaboración del extracto acuoso de albahaca	30
Figura 2.7 Elaboración del extracto acuoso de ajo	31
Figura 2.8 Elaboración del extracto de cáscaras de cacao.....	31
Figura 2.9 Elaboración del extracto etanólico de Laritaco	32
Figura 3.1 Cromatograma analítico gaseoso de AEOS* y HOS*	40
Figura 3.2 Cromatograma analítico gaseoso de AEOC* y HOC*	41
Figura 3.3 Cromatograma analítico gaseoso de AET y HT.....	42

ÍNDICE DE APÉNDICE B

Apéndice B. 1 Absorbancia a distintas concentraciones del reactivo estándar para la curva de calibración	75
Apéndice B. 2 Curva de calibración.....	75
Apéndice B. 3 Absorbancia de las muestras con el reactivo de Folin-Ciaocalteu	76
Apéndice B. 4 Concentraciones de compuestos fenólicos de las muestras expresadas en equivalentes de ácido gálico	76

ÍNDICE DE APÉNDICE C

Apéndice C. 1 Certificado de identificación de especies.....	77
Apéndice C. 2 Flyer informativo de especies con potencial actividad antifúngica	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Especies de <i>Fusarium</i> , huésped y distribución geográfica.....	8
Tabla 2.1 Especies seleccionadas	23
Tabla 2.2 Información de recolección de especies	24
Tabla 2.3 Cantidad empleada de orégano y tomillo por ciclo.....	29
Tabla 2.4 Temperaturas iniciales y finales de la columna.....	33
Tabla 3.1 Rendimiento de la obtención de aceite	35
Tabla 3.2 Propiedades organolépticas de los aceites esenciales	36
Tabla 3.3 Propiedades organolépticas de los hidrolatos obtenidos	37
Tabla 3.4 Rendimientos de los extractos obtenidos	38
Tabla 3.5 Propiedades organolépticas de los extractos obtenidos	38
Tabla 3.6 Concentración de compuestos fenólicos de aceites esenciales y extractos..	39
Tabla 3.7 Composición del AEOS*	43
Tabla 3.8 Composición del HOS*	43
Tabla 3.9 Composición del AEOC*	44
Tabla 3.10 Composición del HOC*	44
Tabla 3.11 Composición del AET	45
Tabla 3.12 Composición del HT	45
Tabla 3.13 Evaluación en patógenos con aceite esencial de Orégano S*	47
Tabla 3.14 Evaluación en patógenos con aceite esencial de Orégano C*	51
Tabla 3.15 Evaluación en patógenos con aceite esencial de tomillo	53
Tabla 3.16 Evaluación en patógenos con extracto de albahaca	54
Tabla 3.17 Evaluación en patógenos con extracto de ajo.....	55
Tabla 3.18 Evaluación en patógenos con extracto de cáscaras de cacao	56
Tabla 3.19 Evaluación en patógenos con extracto de laritaco	58
Tabla 3.20 Costos de equipos y materiales para aceite esencial de tomillo	59
Tabla 3.21 Costos de materia prima para aceite esencial de tomillo	59
Tabla 3.22 Costos de producción de extracto de ajo	61
Tabla 3.23 Costos de producción de extracto de albahaca	61

CAPÍTULO 1

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del problema

Ecuador forma parte de una de las regiones más ricas en producción agropecuaria por presentar la más diversa y compleja gama de sistemas agropecuarios del mundo debido a su clima tropical y tierras fértiles. En este sentido, la agricultura juega un importante papel en su economía, ya que la producción se enfoca en el consumo nacional y en su exportación (Fiallo Iturralde, 2017).

El banano corresponde a uno de los principales productos de exportación, representa más del 30% de la oferta mundial (León-Serrano, Matailo-Pinta, Romero-Ramón, & Portalanza-Chavarría, 2020). En cuanto al cacao, Ecuador es el primer exportador de sus granos en América y al mismo tiempo se posiciona en el 4to puesto en el mundo (Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador, 2021).

En este contexto, los altos niveles de exportación se deben a los altos estándares de calidad de estos productos, así como de sus características. Sin embargo, existen hongos que atacan de forma agresiva a estos cultivos como los del género *Fusarium* y *Moniliophthora*, causando enfermedades que representan hasta un 80% pérdida en el rendimiento de los cultivos (Bailey, Evans, Phillips-Mora, Ali, & Meinhardt, 2018).

En el caso del banano, los hongos del género *Fusarium* causa enfermedades relacionadas con la marchitez de las plantas, destruyendo totalmente la planta al atacar directamente su sistema vascular. Una vez que su sistema vascular es atacado, esta no recibe los nutrientes, ni agua, haciendo que se marchite. Este hongo se propaga fácilmente, puesto que sus esporas pueden sobrevivir en los suelos y pueden impregnarse en herramientas agrícolas (ONU, 2019).

Por otra parte, existe una enfermedad denominada Molinialisis, que resulta extremadamente peligrosa para los cultivos de cacao, causada por hongos del género *Moniliophthora*, que se presenta como manchas blancas en el exterior del fruto y produce su putrefacción interna y externa. Algunos frutos presentan un aspecto saludable, pero

en su interior, los granos y la pulpa forman una masa compacta rodeada de una sustancia acuosa, que es resultante de la putrefacción (Pérez-Vicente, 2018).

Ambas enfermedades son irreversibles, por este motivo se busca eliminar parcial o completamente estos hongos. En la actualidad, el método de control más utilizado es el empleo de plaguicidas sintéticos, sin embargo, a pesar de ser casi efectivos, el uso de estos plaguicidas puede traer consigo problemas que afectan al medio ambiente, así como a la salud del ser humano (Moutassem, Belabid, Bellik, Ziouche, & Baali, 2019).

Los residuos tóxicos encontrados en la cadena alimenticia, la resistencia y resurgimiento por parte de las plagas y la destrucción de la fauna benéfica encargada de su control, son algunas consecuencias dañinas, por lo que existe la necesidad de reducir el uso de químicos en la agricultura, optando por la aplicación de aceites esenciales y extractos vegetales, para lo cual es necesaria la bioprospección.

Estudios demuestran que gran parte de las especies vegetales como plantas medicinales y aromáticas poseen compuestos activos con propiedades antibacterianas y antifúngicas como flavonoides y compuestos fenólicos. A partir de esto, se realizan pruebas in vitro para determinar el grado de inhibición de estas especies con los patógenos a estudiar (Moutassem, Belabid, Bellik, Ziouche, & Baali, 2019).

Para la selección de especies vegetales a evaluar en los diferentes hongos existen requerimientos y restricciones que deben tomarse en cuenta. Los factores involucran la ubicación de colecta y cuál parte de la planta será utilizada, debido a que de esto depende la cantidad de metabolitos que actuarán para inhibir al patógeno. Así mismo, las especies recolectadas no deben contener residuos tóxicos provenientes de pesticidas, puesto que esto puede arrojar falsos positivos al momento de evaluar la actividad microbiana de dichas especies.

Las restricciones legales involucradas corresponden al Permiso de acceso a recursos genéticos requerido por el Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAAE), así como la respectiva identificación de las especies por medio de la herborización de las mismas.

1.2 Justificación del problema

El cacao y el banano son unos de los cultivos más importantes en el Ecuador, de tal manera que son parte de los productos primarios de exportación junto con el petróleo. Sin embargo, existen patógenos como los hongos del género *Moniliophthora* y *Fusarium* que afectan drásticamente a estos cultivos en sus diferentes estados, provocando altibajos en la producción y pérdidas en el rendimiento del cultivo (Leandro Muñoz, et al., 2017).

Existen algunos tratamientos para el control de estos patógenos, entre ellos se encuentra el manejo integrado del cultivo con el control de malezas, remoción y eliminación semanal de frutos enfermos. Otras opciones son el control genético mediante el uso de genotipos tolerantes a la enfermedad y el control químico con el uso de fungicidas que involucra un alto riesgo ambiental (Gómez-López, et al., 2020). Cabe recalcar que ninguno de estos tratamientos logra erradicar por completo a dichos patógenos y no se obtienen resultados efectivos.

Con respecto al control químico con fungicidas, estos han desempeñado un papel clave en la protección de cultivos, pero con el paso del tiempo dichos hongos han adquirido resistencia a estos plaguicidas sintéticos, lo que ocasiona su resurgimiento (Lucas, Hawkins, & Fraaije, 2015). Por ello, es importante el estudio de nuevas alternativas de control efectivas con un menor impacto ambiental, puesto que el uso de los plaguicidas sintéticos genera residuos tóxicos que alteran la calidad del cultivo y el ambiente.

Se realiza una bioprospección de un grupo de especies vegetales, con antecedentes reportadas en la literatura de actividad antimicrobiana por la presencia de compuestos volátiles, que ayudan a la inhibición contra patógenos presentes en cultivos de cacao y banano. Algunas de las especies vegetales que se mencionan son: *Thymus vulgaris* (tomillo), *Origanum vulgare* y *Plectranthus amboinicus* (orégano), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Allium sativum* (ajo) y *Vernonanthura Patens* (Laritaco), las mismas que han sido evaluadas de forma in vitro con altos porcentajes de inhibición (Gómez-López, et. al, 2020; Singh J. K., Kumar, Kumar, Kumar, & Mehta, 2017).

Finalmente, también es de gran interés el empleo de residuos, por ello se incluyen las cáscaras de cacao (*Theobroma cacao*), puesto que han sido estudiadas con fines antimicrobianos contra el hongo *Fusarium oxysporum*, obteniendo resultados favorecedores en la inhibición del patógeno (Rachmawaty, et al., 2018).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Evaluar la actividad antimicrobiana de especies vegetales in vitro contra patógenos de cultivos de cacao y banano y su potencial uso como fungicida natural.

1.3.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos obtenidos a partir de las especies *Origanum vulgare*, *Plectranthus amboinicus*, *Thymus vulgaris*, *Ocimum basilicum*, *Allium sativum*, *Theobroma cacao* y *Vernonanthura Patens* contra los hongos pertenecientes al género *Fusarium* y *Moniliophthora*.
2. Analizar la cantidad de polifenoles de los aceites esenciales y extractos obtenidos para el estudio de su relación con el potencial inhibitorio de cada especie.
3. Elaborar un Flyer informativo de especies vegetales con una efectiva actividad antimicrobiana para la inhibición contra los patógenos estudiados.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Bioprospección

La biodiversidad corresponde a la variedad de organismos vivos de cualquier ecosistema, siendo resultado de los procesos naturales y culturales de un país. Muchos recursos que ofrece la naturaleza son destinados a la actividad productiva. Actualmente, la industria es lo que mueve al mundo, y el excesivo uso de químicos suele traer consecuencias tanto para el ser humano como para el medio ambiente, por lo que la elaboración de productos naturales ha sido considerada como una gran alternativa (Velásquez, 2019).

La Bioprospección permite evaluar propiedades de las especies vegetales ya que estas, poseen compuestos activos antimicrobianos, antifúngicos y antioxidantes que resultan de gran interés para la elaboración de medicinas, aceites, fibras, bebidas naturales, fungicidas, entre otros productos (Dwivedy, et al., 2019).

1.4.2 Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana engloba a todos los principios o agentes activos que se encargan de inhibir el crecimiento de bacterias, prevenir la formación de colonias microbianas y destruir microorganismos. Cabe recalcar que, la actividad puede hacer referencia al campo antibacteriano, bactericida, bacteriostático, fungicida, fungistático, biocida y biostático (Elmogahzy, 2020).

1.4.3 Metabolitos primarios

Los metabolitos primarios están involucrados en el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo. Los metabolitos primarios normalmente se forman durante la fase de crecimiento como resultado del metabolismo energético y se consideran esenciales para un crecimiento adecuado. Estos metabolitos primarios son relativamente uniformes en su estructura y entre estos, se incluye a los carbohidratos, aminoácidos, lípidos, entre otros. En las plantas, son los genes los que controlan la materia prima para su producción y dan las instrucciones para la formación de catalizadores (enzimas) que intervienen en su síntesis y descomposición (Rosales Torres, 2019).

1.4.4 Metabolitos secundarios

En las plantas, los metabolitos secundarios son varios compuestos químicos producidos por la célula vegetal a través de vías metabólicas derivadas de las vías metabólicas primarias (Vijayakumar & Raja, 2018), entre las que citamos: terpenos, alcaloides, fenoles simples, ácidos fenólicos, taninos, cumarinas, lignanos, quinonas y flavonoides (Rosales Torres, 2019). Los cuales han demostrado in vitro que poseen varios efectos biológicos como antibióticos, antifúngicos y antivirales, que protegen a las plantas de los patógenos. Por otro lado, para la síntesis de metabolitos secundarios es importante considerar la variación de las condiciones ambientales y de las interacciones bióticas (Hussein & El-Anssary, 2019).

1.4.4.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios comunes en el reino vegetal. Estos compuestos se caracterizan por llevar uno o más grupos hidroxilo. Los más comunes en la naturaleza con una amplia gama de actividades biológicas son las chalconas, las xantonas y los flavonoides (Valencia-Avilés, et. al, 2017).

Una forma de cuantificar los compuestos fenólicos es por medio del método de la reacción Folin-Ciocalteu (F-C), este es un ensayo antioxidante basado en la transferencia de electrones, que mide la capacidad reductora de un antioxidante. Se ha aplicado ampliamente en la determinación del contenido total de polifenoles de muestras biológicas y de alimentos de origen vegetal. Este método del reactivo F – C está disponible comercialmente para utilizarlo en la cuantificación de compuestos fenólicos en extractos derivados de plantas, así como en alimentos y bebidas (Lamuela-Raventós, 2017).

1.4.5 Hongos

1.4.5.1 Hongo género *Fusarium*

El género *Fusarium* se caracteriza por ser resistente por su capacidad de sobrevivir en ausencia de un huésped y su rápida proliferación debido a sus tres tipos de esporas: microconidios, macroconidios y clamidosporas durante su ciclo de vida (Bonelo Chavarro & Sánchez Leal, 2018).

Las enfermedades causadas por este género están relacionadas con el marchitamiento de las plantas. Una vez que las raíces de las plantas se infecten, el hongo crece en dirección al rizoma y al pseudotallo, empezando a destruir su sistema vascular, ahí es cuando se empiezan a tornar de color rojizo (García-Velasco, Portal-González, Santos-Bermúdez, Rodríguez-García, & Companioni-González, 2021).



Figura 1.1 Síntomas externos e internos de la enfermedad de la Marchitez por *Fusarium* causado por *Fusarium spp.* (A) Síntomas externos (B-C) Síntomas internos. (Secretaría General de la Comunidad Andina, 2020)

Estos hongos son filamentosos y suelen crecer a 37°C y liberan toxinas que pueden ser peligrosas para el hombre y los animales (Tapia & Amaro, 2014). A continuación, se muestran las especies del género *Fusarium* con el huésped típico y la distribución geográfica.

Tabla 1.1 Especies de *Fusarium*, huésped y distribución geográfica (SENASICA, 2015)

Especies de <i>Fusarium</i>	Plantas hospederas	Distribución geográfica
<i>F. acuminatum</i>	Legumbres	Regiones templadas
<i>F. andiyazi</i>	Sorgo	África, Australia, EE. UU.
<i>F. anthophilum</i>	Muchas especies de plantas	Regiones templadas
<i>F. avenaceum</i>	Regiones templadas	Regiones templadas
<i>F. aywerte</i>	Pastos	Australia
<i>F. babinda</i>	Suelo	Australia
<i>F. begoniae</i>	Begonia	Alemania
<i>F. brevicatenulatum</i>	Striga asiatica	África
<i>F. bulbicola</i>	Especies de plantas de bulbo	Europa
<i>F. camptoceras</i>	Plátano, cacao	Regiones tropicales y subtropicales
<i>F. circinatum</i>	Coníferas	Chile, Japón, México, Sudáfrica, EE. UU.
<i>F. concéntrico</i>	Especies de Musa	Centroamérica
<i>F. crookwellense</i>	Papa, cereales	Regiones templadas
<i>F. culmorum</i>	Cereales	Regiones templadas
<i>F. decemcellulare</i>	Árboles	Regiones templadas
<i>F. denticulatum</i>	Camote	Brasil, Cuba, Indonesia, Estados Unidos, Zambia
<i>F. foetens</i>	Especies de Begonia	Alemania, Holanda
<i>F. fujikuroi</i>	Arroz	Zonas de cultivo de arroz
<i>F. globosum</i>	Maíz, trigo	África, Japón
<i>F. graminearum</i>	Cebada, Maíz, Trigo	En todo el mundo
<i>F. guttiforme</i>	Piña	Cuba, Sudamérica
<i>F. heterosporum</i>	Mijo, otras hierbas	África
<i>F. hostae</i>	Especies de Hosta	Sudáfrica, EE. UU.
<i>F. konzum</i>	Pastos	EE. UU.
<i>F. lactis</i>	Higo	EE. UU.
<i>F. lateritium</i>	Plantas leñosas	En todo el mundo
<i>F. mangiferae</i>	Mango	África, Asia, EE. UU.
<i>F. musarum</i>	Plátano	Panamá
<i>F. napiforme</i>	Mijo, sorgo	África, Argentina, Australia
<i>F. nelsonii</i>	Alfalfa, sorgo	Sudáfrica

<i>F. nisikadoi</i>	Bambú, trigo	Japón
<i>F. nygamai</i>	Sorgo	Regiones áridas
<i>F. oxysporum</i>	Diversas especies de plantas	En todo el mundo
<i>F. phyllophilum</i>	Especies Dracaena y Sansevieria	Europa, Japón
<i>F. poae</i>	Cereal	En todo el mundo
<i>F. polyphialidicum</i>	Grano de sorgo	Australia, Italia, Sudáfrica
<i>F. proliferatum</i>	Espárragos, maíz, mango, sorgo	En todo el mundo
<i>F. pseudoanthophilum</i>	Maíz	África del Sur
<i>F. pseudograminearum</i>	Cebada, trigo	Zonas más secas en todo el mundo
<i>F. pseudonygamai</i>	Mijo	África, EE. UU.
<i>F. ramigenum</i>	Ficus carica	EE. UU.
<i>F. redolens</i>	Diversos anfitriones	Regiones templadas
<i>F. sacchari</i>	Maíz, caña de azúcar	México, Filipinas
<i>F. semitectum</i>	Plátano	Regiones subtropicales
<i>F. solani</i>	Diversas especies de plantas	En todo el mundo
<i>F. sterilihyphosum</i>	Mango	Sudáfrica
<i>F. subglutinans</i>	Maíz	Zonas frías de cultivo de maíz
<i>F. succisae</i>	Succisa pratensis	Europa
<i>F. thapsinum</i>	Sorgo	Todas las zonas de cultivo de sorgo.
<i>F. torulosum</i>	Varias especies de plantas	Regiones templadas
<i>F. udum</i>	Arveja	Asia meridional, África subsahariana
<i>F. venenatum</i>	Varias especies de plantas	Europa
<i>F. verticillioides</i>	Maíz	En todo el mundo

1.4.5.2 Hongo género *Moniliophthora*

Para el género *Moniliophthora*, las especies son *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa*. Estos hongos se ubican en la clase Agaricomycetes y pertenecen a la familia Marasmiaceae, son similares estilos de vida pero que presentan dos fases de colonización distintas. La fase biotrófica caracterizada por la colonización del espacio

intercelular, y la fase necrótica, en la cual se provoca la necrosis interna y externa de los tejidos infectados (Barbosa, et. al, 2018).

La presencia de este tipo de hongos se ha reportado en países como Ecuador, Colombia, Venezuela, Costa Rica, Honduras y Guatemala. La *Moniliophthora roreri* causa la moniliasis en el cacao por lo cual se considera como una enfermedad de alta importancia económica (Tirado-Gallego, Lopera-Álvarez, & Ríos-Osorio, 2016).

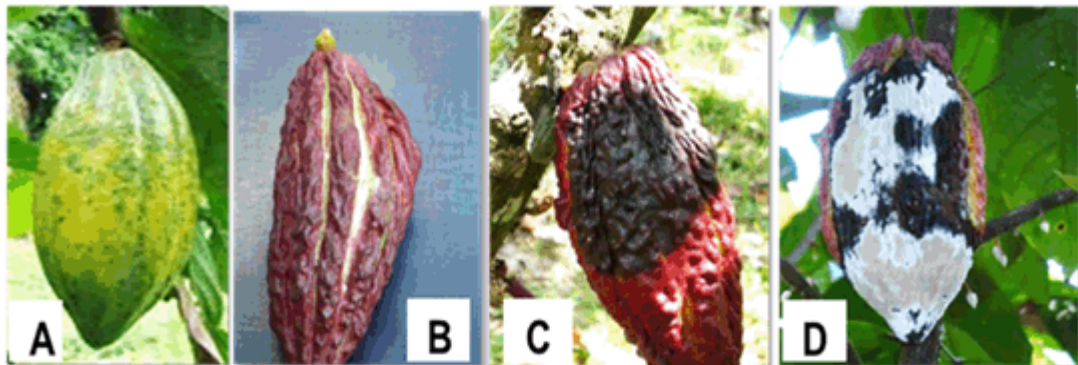


Figura 1.2 Síntomas de moniliasis (A) primeros síntomas acuosos (hidrólisis); (B) Tumefacción; (C) mancha parda; (D) fruto con esporulación (Pérez-Vicente, 2018)

1.4.6 Tratamientos de control para género *Fusarium*

1.4.6.1 Control cultural

El control cultural se enfoca en las prácticas agronómicas y condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de la especie vegetal. Entre estas prácticas, se encuentra la eliminación de un anillo simple o doble alrededor de las plantas enfermas. Sin embargo, esta técnica necesita complementarse con otras estrategias debido a que no se garantiza el control efectivo por la resistencia del patógeno (López-Zapata & Castaño-Zapato, 2019).

1.4.6.2 Control biológico

En el control biológico, se incluyen a inductores de producción de enzimas involucradas en la defensa de las plantas de banano con *Serratia marcescens*, se conoce que esta estrategia disminuye la incidencia de la enfermedad. Por otro lado, se tiene a *Streptomyces griseus* que inhibe la formación de esporas y degradando la pared celular del hongo. Se conoce que estos microorganismos vivos son benéficos sobre cepas

patogénicas, sin embargo, se requiere su producción masiva y años de investigación para garantizar su efectividad (López-Zapata & Castaño-Zapato, 2019).

1.4.6.3 Control químico

El control químico involucra el uso de fungicidas como carbendazim al 2%, este es inyectado en los rizomas de banano y presenta resultados eficientes. Por otro lado, se aplican fungicidas como Bromuro de metil, Cloropicrina, Tiofanato–metil y Prodione. A pesar de que esta estrategia es rápida y fácil, los fungicidas causan efectos negativos sobre la salud humana, la vida silvestre y el ambiente, además se conoce de mutaciones y que el hongo ha adquirido resistencia a estos productos (López-Zapata & Castaño-Zapato, 2019).

1.4.7 Tratamientos de control para género *Moniliophthora*

1.4.7.1 Prácticas agronómicas

Dentro de las prácticas agronómicas se encuentran las adecuaciones al drenaje del suelo; control de malezas; remoción y eliminación semanal de frutos enfermos, y la poda de ramas cada seis meses o después de la cosecha principal (Gómez-López, et al., 2020).

1.4.7.2 Control genético

Se emplean genotipos tolerantes a la enfermedad, como los clones ICS-95, UF-273, los clones Regalo de Dios, entre otros (Gómez-López, et al., 2020).

1.4.7.3 Control químico

Entre los fungicidas más utilizados están los derivados de cobre y los fungicidas sistémicos de los grupos estrobirulinas, y triazoles (Gómez-López, et al., 2020).

1.4.8 Aceites esenciales y extractos vegetales

Los aceites esenciales son sustancias químicas en forma de fracciones líquidas volátiles sintetizadas por las plantas, brindando así, características aromáticas y propiedades a las distintas especies vegetales.

Estos compuestos se encuentran en la epidermis de las plantas, específicamente en los tricomas glandulares, los cuales son finos pelos que suelen recubrir hojas y pétalos (Acero-Godoy, Guzmán-Hernández, & Muñoz-Ruíz, 2019).

La forma más habitual de extraer los aceites esenciales es empleando la destilación por arrastre de vapor, la cual consiste en colocar materia vegetal y agua en un recipiente. Posteriormente, la mezcla se somete a ebullición, para que el vapor de agua arrastre los componentes volátiles y finalmente sean condensados. La composición de estos aceites involucra una variedad de compuestos orgánicos como aldehídos, hidrocarburos terpénicos, compuestos fenólicos, entre otros (Aziz, et. al, 2018).

Por otra parte, los extractos vegetales se obtienen por maceración, método que implica que la materia vegetal entre en contacto con un solvente durante un determinado tiempo, por lo general se utiliza agua o alguna otra sustancia de carácter orgánico como alcoholes o cetonas. Los componentes extraídos son únicamente aquellos que presentan afinidad química con el solvente (Duarte Trujillo, Jiménez Forero, Pineda Insuasti, González Trujillo, & García Juárez, 2020).

Los aceites esenciales y extractos naturales han sido de gran interés para la industria debido a que las moléculas extraídas pueden llegar a presentar actividad antiviral, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e insecticida. Sin embargo, los compuestos a obtener dependen de varios factores como la parte empleada de la planta, la forma en la que fue cultivada, y el tipo de extracción que se realice (Acero-Godoy, Guzmán-Hernández, & Muñoz-Ruíz, 2019).

Existen otros factores que influyen en los procesos metabólicos al redirigir las rutas biosintéticas de las plantas haciendo que el contenido de componentes activos varíe en distintos ejemplares de la misma especie como el clima, ubicación geográfica, época de recolección, temperatura, cantidad de agua recibida y radiación (Acero-Godoy, Guzmán-Hernández, & Muñoz-Ruíz, 2019).

1.4.9 Secado

La operación de secado elimina el exceso de agua de la superficie tratada, los métodos típicos de secado son: natural, con aire comprimido, al vacío, con aire caliente, entre otros (Rudawska, 2019). La selección de secado depende del material, por lo general el material vegetal contiene un gran porcentaje de humedad y para mantener su calidad y sus componentes volátiles se recomienda el secado natural. En el caso de emplear un secado mecánico, se debe controlar la temperatura para no afectar a las propiedades fisicoquímicas del material vegetal.

1.4.10 Orégano

El orégano tiene varias especies entre ellas *Origanum vulgare* y *Plectranthus amboinicus*. esta especie vegetal pertenece a las Lamiaceae y es originaria de la región mediterránea y Eurasia occidental. Por lo general, *Origanum vulgare* es muy utilizada como especia y planta medicinal con propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas (Pezzani, Vitalini, & Iriti, 2017).



Figura 1.3 Tipos de orégano. (A) *Origanum vulgare* (Herbarium, 2020); (B) *Plectranthus amboinicus* (Iplantz, 2019)

Se conoce que *Plectranthus amboinicus* tiene varias propiedades terapéuticas contra enfermedades como asma bronquial. Esta especie es también conocida como el orégano francés y también es usada como un condimento típico (Nuñez Figueredo, Tillán Capó, Carrillo Domínguez, Menéndez Castillo, & León, 2006).

Esta especie herbácea aromática alcanza aproximadamente un metro de altura y se caracteriza por sus hojas verdes grisáceas con flores que pueden ser blancas o purpuras. En cuanto al clima, puede desarrollarse en climas templados y cálidos con una baja humedad relativa, así como también puede cultivarse adecuadamente en una amplia variedad de suelos, considerando su sensibilidad a la asfixia radicular (Vendramini Marini, 2019).

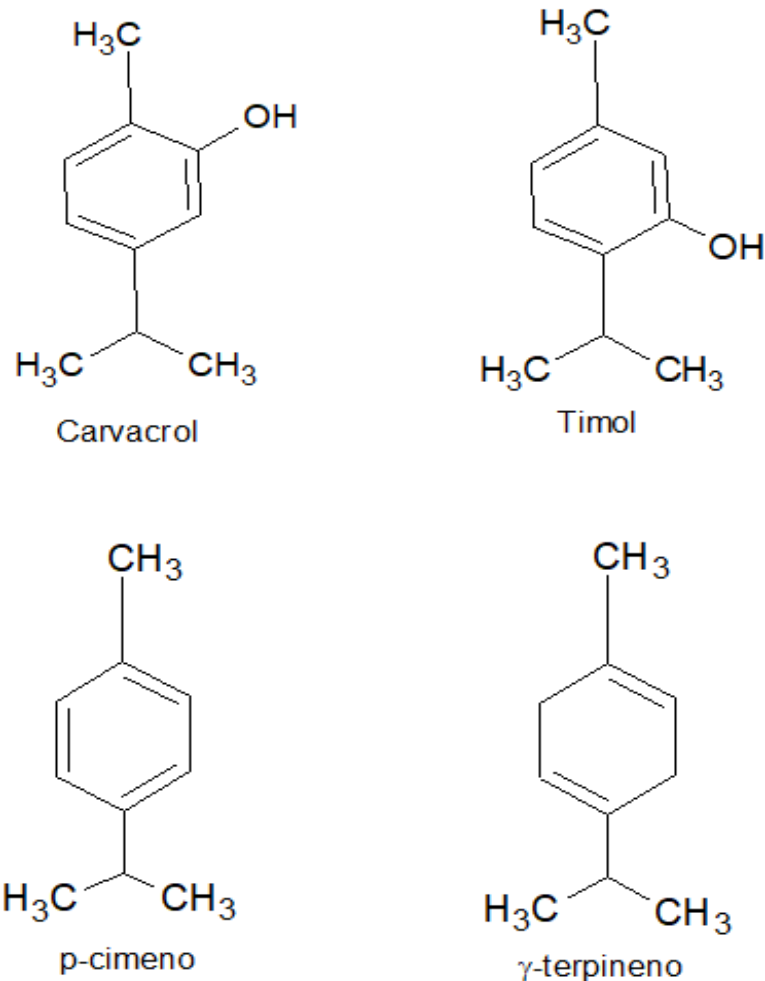


Figura 1.4 Estructura química de los principales componentes en óregano

De forma in vitro, el aceite de orégano obtenido de hojas secas ha sido evaluado en hongos como *Colletotrichum gloeosporioides* a 2000 ppm obteniendo una inhibición del 100% (Sanit, 2020).

1.4.11 Tomillo

El tomillo con nombre científico *Thymus vulgaris* es una especie de planta perteneciente a la familia de la menta Lamiaceae. Su apariencia es en forma de arbusto de base leñosa, con hojas muy aromáticas de color verde grisáceo y racimos de flores púrpuras o rosadas. Esta especie se desarrolla en un clima templado a cálido, seco y soleado en condiciones de suelos ásperos por lo que no resiste el encharcamiento ni exceso de humedad ambiente (Hosseinzadeh, Jafarikukhdan, Hosseini, & Armand, 2015).



**Figura 1.5 Tomillo (*Thymus vulgaris*)
(Plantnet, 2020)**

Se conoce que el tomillo tiene propiedades antiespasmódicas, antiinflamatorias, antisépticas, antioxidantes, entre otras. Con respecto a la obtención de su aceite esencial, su rendimiento oscila entre el 1-3% y está constituido principalmente por fenoles monoterpénicos como timol, carvacrol y p-cimeno. El componente activo predominante es el timol, sin embargo, la composición varía con respecto a la época, lugar de la cosecha y por el quimiotipo (Flórez Chacón & Mojica Flórez, 2019).

El aceite esencial de tomillo ha sido evaluado por su actividad antimicrobiana en patógenos como *Moniliophthora roreri* y *Colletotrichum gloeosporioides*, presentando un porcentaje de inhibición del 100% a partir de una concentración de 5 µL/L y 500 µL/L, respectivamente. Cabe recalcar, que el aceite evaluado ha sido extraído de las hojas secas del tomillo principal (Gómez-López, et al., 2020; Perumal, Sellamuthu, Nambiar, & Sadiku, 2017).

1.4.12 Albahaca

La especie más común de albahaca es *Ocimum basilicum*, es una planta herbácea perteneciente a la familia Lamiceae, su distribución geográfica corresponde a climas subtropicales y tropicales, ya que se desarrolla en temperaturas cálidas. Gracias a sus metabolitos secundarios, esta planta posee propiedades antiinflamatorias, analgésicas, antisépticas, analgésicas y antioxidantes, por lo cual es de gran interés en las industrias dedicadas a la elaboración de cosméticos, fragancias, alimentos y medicina (Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Fores, 2017).



**Figura 1.6 Albahaca (*Ocimum basilicum*)
(elicriso, 2020)**

Esta especie vegetal suele contener entre 0.5% y 1.5% de aceite esencial cuya composición varía de acuerdo con las condiciones de cultivo de distintos ejemplares, también contiene aproximadamente 5% de taninos. Se ha demostrado que puede llegar a inhibir bacterias dañinas para los humanos como *E.coli* y *P. aeruginosa*, mientras que el extracto acuoso aplicado in vitro ha sido utilizado para inhibir el crecimiento de hongos (Cosio & Rodríguez, 2017).

1.4.13 Ajo

El ajo es una especie vegetal perteneciente a la familia Amaryllidaceae, se caracteriza por tener escasas flores verdes o blancas y la cabeza de ajo tiene forma de bulbo con envoltura blanca. Por lo general, alcanza una altura de 1,5 m de altura y su desarrollo ocurre en cualquier tipo de clima por la ventaja de ser una especie rústica y el tipo de suelo es tierra suelta sin encharcamientos por la poca tolerancia a la humedad excesiva (Ramírez Concepción, Castro Velasco, & Martínez Santiago, 2016).



**Figura 1.7 Ajo (*Allium sativum*)
(Mula, 2017)**

La alicina (tiosulfinato de dialilo) es el principal tiosulfinato del ajo y es responsable de los efectos antimicrobianos del ajo. Además, se demostró que las modificaciones o cambios cito-morfológicos, en particular la acumulación de cuerpos lipídicos y el engrosamiento de la pared celular, han sido inducidos por extractos de ajo (Singh J. , Kumar, Kumar, Kumar , & Mehta, 2017).

1.4.14 Cáscaras de cacao

El cacao, cuyo nombre científico es *Theobroma cacao*, es un árbol cuyo fruto lleva el mismo nombre utilizado como materia prima para la elaboración del chocolate, al fermentar sus semillas y triturarlas. También el cacao es utilizado para la elaboración de productos cosméticos e incluso otras partes del árbol son empleadas para fines medicinales (Andrade Almeida, Rivera García, Chire Fajardo, & Ureña Peralta, 2019).

A nivel industrial, la producción de chocolate genera un 60% de residuos, entre ellos las cáscaras, las cuales poseen gran variedad de compuestos orgánicos como taninas, flavonoides, saponinas, triterpenoides y compuestos fenólicos, estos últimos presentan gran actividad antimicrobiana, que su vez dependen del solvente empleado en su extracción. La composición de las cáscaras presenta 12.98% de agua, 33.9% de fibra, 32.52% de nitrógeno total, 9.65% de proteínas, 0.15% de grasas y 10.8% de cenizas. Se han realizado estudios que muestran que el extracto de compuestos fenólicos de las cáscaras de cacao utilizando una solución de acetona al 70% puede inhibir el hongo *Fusarium Oxysporum* a concentraciones 0.02%, 0.2% y 2% (m/v) (Rachmawaty, et. al, 2018).



Figura 1.8 Cáscaras de cacao (*Theobroma cacao*)
(Chávez, 2021)

1.4.15 Laritaco

Laritaco con nombre científico de *Vernonanthura patens* es una especie salvaje de América y puede encontrarse en países como Panamá, Brasil, Venezuela, Bolivia, Ecuador, México entre otros. Esta especie pertenece a la familia Asteraceae. Sus flores, hojas y ramas son utilizadas como medicina tradicional, particularmente las hojas tienen gran potencial para tratar dolores de estómago, diarreas, dolores pre y post parto, paludismo. También, se ha registrado actividades analgésicas y cicatrizantes (Manzano et al., 2012).

Se conoce que la especie contiene múltiples compuestos como aceites esenciales, alcaloides, fenoles, taninas y compuestos reductores. Por otra parte, al realizar extractos es posible obtener sesquiterpenos, que son compuestos que poseen actividad antimicrobiana, antioxidante y antitumoral.



**Figura 1.9 Laritaco (*Vernonanthura patens*)
(Manzano Santana, Silva Osorio, Sterner, & Peralta
García, 2012)**

Estudios realizados muestran que aquellos extractos acuosos y alcohólicos que únicamente utilizan las hojas presentan porcentajes de inhibición alrededor del 80% para los hongos *Fusarium oxysporum* y *Penicillium notatum*. A partir de los extractos, se aislaron 3 componentes activos: Lupeol, Acetil lupeol y Epi Lupeol (Manzano, Silva, Sterner, & Peralta, 2012).

Los compuestos en los que se observó mayor actividad antifúngica fueron Lupeol y Epi Lupeol. El compuesto Lupeol presentó una tasa de inhibición del 50 y el 90% a concentraciones de 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contra el patógeno *Penicillium notatum*. Mientras que, el compuesto Epi Lupeol inhibió en un 80 % y 100% a 100 y 200 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Con respecto al compuesto Acetil lupeol, este no presentó actividad antifúngica frente a ninguno de los patógenos evaluados (Manzano, et. al, 2013).

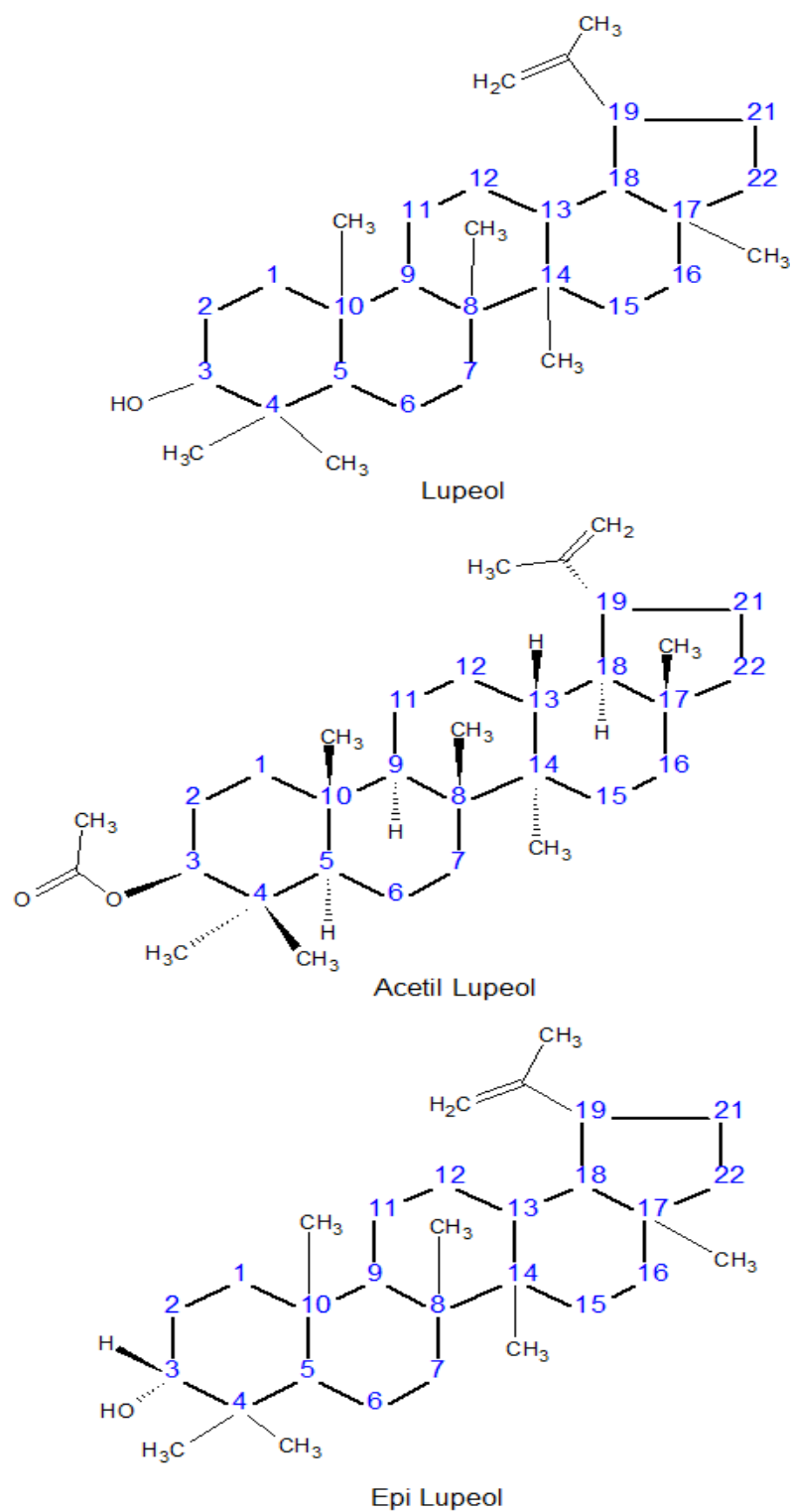


Figura 1.10 Compuestos activos con actividad antifúngica en *V. patens* (Manzano, et. al, 2013)

1.4.16 Restricciones legales

1.4.16.1 Permiso de acceso a recursos genéticos

El Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica (MAAE) requiere de un contrato de marco de acceso al recurso genético para investigaciones científicas, en el caso de realizar proyectos o estudios que involucren el componente genético de la biodiversidad del Ecuador.

Este permiso se establece acorde a lo estipulado en:

- NORMA PARA SUSCRIPCIÓN DE CONTRATOS DE ACCESO A RECURSOS GENÉTICOS - Art(s). Artículo 1 al Artículo 21.
- REGIMEN COMUN SOBRE ACCESO A LOS RECURSOS GENETICOS - Art(s). Artículo 1 - Artículo 51
- REGLAMENTO AL RÉGIMEN COMÚN SOBRE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS - art(s). Artículo 1- Artículo 47.

Con el fin de permitir el uso sostenible de los recursos biológicos y genéticos dentro del país (Ministerio de Telecomunicaciones y de la Sociedad de la Información, 2021).

1.4.16.2 Herbario certificación

Para la identificación de especies se requiere de su registro en un herbario, este consiste en una colección de especies vegetales, la cual se encuentra en una secuencia de clasificación aceptada, involucrando un muestrario representativo con características morfológica, historia filogenética y distribución geográfica, es necesario al realizar estudios ecológicos, florísticos y fitogeográficos para el aseguramiento de la identificación de especies.

CAPÍTULO 2

2 METODOLOGÍA

2.1 Diseño experimental

El principal objetivo del presente trabajo investigativo es evaluar la actividad antimicrobiana de especies vegetales in vitro contra hongos del género *Fusarium* y *Moniliophthora*, patógenos que atacan de forma severa a los cultivos de banano y cacao.

A partir de una revisión bibliográfica se procedió a seleccionar las especies vegetales que presentan gran actividad antifúngica contra los patógenos de estudio. Posteriormente, estas fueron recolectadas, secadas e identificadas antes de realizar la etapa experimental, la cual consistió en 3 partes: obtención de aceites esenciales y extractos, cuantificación de compuestos fenólicos y evaluación en patógenos. Finalmente, se elaboró un flyer informativo a partir de los resultados obtenidos.

2.2 Revisión bibliográfica

Se realizó una revisión bibliográfica aproximadamente de 80 artículos científicos acerca de la actividad antimicrobiana de distintas especies y residuos vegetales que inhiban parcial o totalmente el crecimiento de los antes mencionados. La investigación inició con especies comunes que pueden ser encontradas en Ecuador como orégano, canela, eucalipto, tomillo, laurel, entre otros.

Se tomó en consideración la identificación de la especie y condiciones de cultivo como temperatura, clima, época de año y lugar de colecta. En el caso de la producción de metabolitos secundarios, se tomó en cuenta la parte utilizada de la planta (hojas, flores, tallos, etc.) y qué compuestos activos poseen. Se revisaron las técnicas de extracción empleadas y relaciones entre la materia vegetal y solventes a utilizar en cada caso según el producto deseado, siendo este, un aceite esencial o extracto.

2.3 Selección de especies

La selección de especies se basó en el mayor porcentaje de inhibición contra los hongos de interés, la disponibilidad de recolección y rendimientos.

Tabla 2.1 Especies seleccionadas

Nombre Común	Nombre Científico	Parte por utilizar	Producto
Orégano	<i>Origanum vulgare</i>	Hojas	Aceite esencial e hidrolato
	<i>Plectranthus amboinicus</i>	Hojas y tallos	
Tomillo	<i>Thymus vulgaris</i>	Hojas y tallos	Aceite esencial e hidrolato
Albahaca	<i>Ocimum basilicum</i>	Hojas	Extracto
Ajo	<i>Allium sativum</i>	Bulbos	Extracto
Cacao	<i>Theobroma cacao</i>	Cáscara	Extracto
Laritaco	<i>Vernonanthura Patens</i>	Hojas	Extracto

2.4 Recolección de especies

Las especies se recolectaron en distintas regiones del Ecuador, registrando fechas de recolección y ubicaciones con sus respectivas coordenadas. El Orégano (*Plectranthus amboinicus*) fue recolectado en la parroquia Chongón en la ciudad de Guayaquil mientras que las especies, Orégano (*Origanum vulgare*), Albahaca, Tomillo y Ajo, provienen del Mercado Mayorista de Ambato, sin embargo, se obtuvo información de la ubicación de los cultivos por parte de proveedores. Finalmente, las cáscaras de cacao se recolectaron en el cantón “El triunfo” y el Laritaco en Marcabelí, El Oro.

La cantidad recolectada por cada especie fue aproximadamente de 15 lb y a continuación se detalla información de colecta:

Tabla 2.2 Información de recolección de especies

Especie	Fecha de Colecta	Región	Ubicación	Coordenadas
Orégano S*	10/11/2021	Sierra	Patate, Tungurahua, Ecuador.	-1.30914789, -78.504304
Orégano C*	11/11/2021	Costa	Chongón, Guayaquil, Ecuador	-2.2770532, -80.062952
Tomillo	10/11/2021	Sierra	Pasa, Tungurahua, Ecuador.	-1.26688784, -78.741139
Albahaca	10/11/2021	Sierra	Patate, Tungurahua, Ecuador.	-1.309102258, -78.505280
Ajo	10/11/2021	Sierra	Pilahuín, Tungurahua, Ecuador.	-1.3768625, 78.817156
Cacao	14/11/2021	Costa	El triunfo, Guayas, Ecuador	-2.3483678, -79.306548
Laritaco	14/12/2021	Costa	Marcabelí, El Oro, Ecuador	-3.791130, -79.91822

Nota: Existen 2 especies diferentes con el mismo nombre común, por lo que se usarán las siguientes etiquetas:

Orégano S* para *Origanum vulgare*

Orégano C*: para *Plectranthus amboinicus*

2.5 Secado de especies

Se empleó el secado natural a temperaturas entre 24°C y 28°C antes de iniciar el proceso de extracción (Gómez-López, et al., 2020). El secado también es fundamental para la identificación de especies mediante un herbario para verificar que los ejemplares recolectados coincidan con los mencionados en la literatura y así referenciar resultados obtenidos.

2.5.1 Orégano, albahaca y laritaco

Debido a que las ramas y tallos de estas plantas son de gran tamaño, se procedió a realizar atados para colgarlos bajo techo con la finalidad de que no reciban luz solar y evitar la pérdida de propiedades características de las especies. El secado duró aproximadamente 10 días. En el caso de las muestras de Laritaco, estas fueron proporcionadas secas.

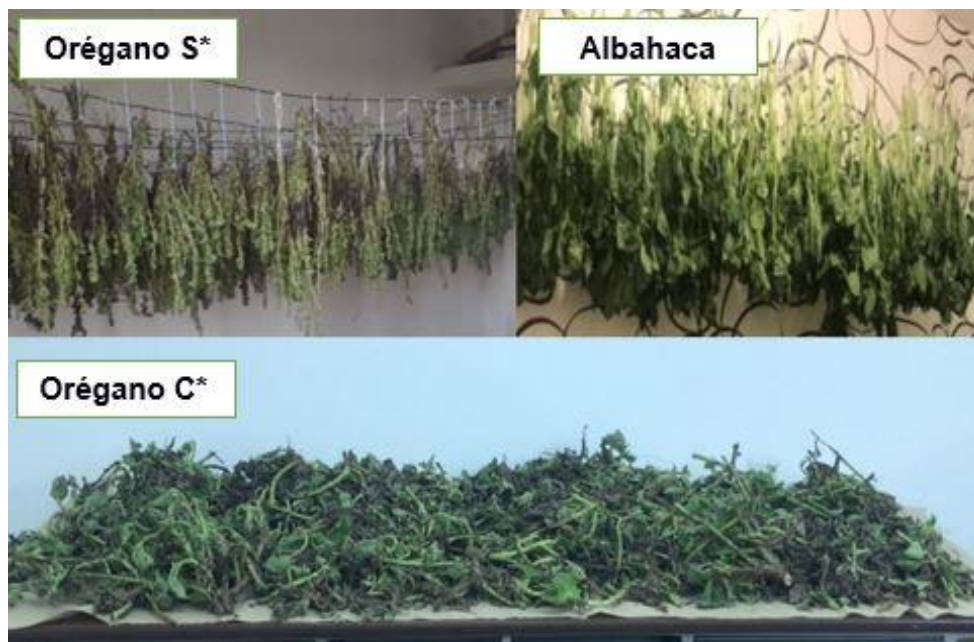


Figura 2.1 Secado de orégano y albahaca al ambiente

2.5.2 Tomillo

Una particularidad de la especie *Thymus vulgaris* es su pequeño tamaño y la facilidad con la que se desprenden sus hojas, por lo cual, se optó por colocar el material vegetal sobre una malla con marco para evitar pérdidas de material vegetal y al mismo tiempo para que el aire circule por los orificios permitiendo que el secado ocurra de forma uniforme (Ganoza López, 2018). De forma similar a las especies anteriores, este proceso duró 10 días.



Figura 2.2 Secado de tomillo al ambiente

2.5.3 Cáscaras de cacao

Las cáscaras de cacao, al ser recolectadas del suelo de una finca, fueron limpiadas con un paño húmedo para eliminar restos de tierra o insectos presentes, para luego ser extendidas en el suelo sobre una funda. El proceso de secado se dio en una terraza bajo techo durante 25 días (Rachmawaty, et. al, 2018).



Figura 2.3 Secado de cáscaras de cacao al ambiente

2.5.4 Ajo

Debido a que se realizó un extracto por maceración, este requirió el uso de dientes frescos, por lo tanto, no se realizó ningún procedimiento de secado y estos fueron conservados junto a sus cáscaras hasta su uso. (Singh J. K., Kumar, Kumar, Kumar, & Mehta, 2017).

2.6 Identificación de especies

Una vez recolectadas y secadas las especies, estas fueron prensadas entre hojas A4, con la finalidad de que conserven su forma original para la identificación. Se verificó la identificación de las especies *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* y *Ocimum basilicum* en el “Herbario Azuay” de la Universidad del Azuay, en Cuenca, mientras que para la especie *Plectranthus amboinicus* se verificó su identificación en el Herbario de la Universidad de Guayaquil. Finalmente, para *Vernonanthura Patens*, la muestra fue identificada en el Herbario Nacional del Ecuador QCNE, Quito. Debido a que para las especies *Allium sativum* y *Theobroma cacao* se utilizaron los dientes de ajo y las cáscaras de cacao respectivamente, se realizó una identificación no oficial con los registros internos.



Figura 2.4 Muestras secadas y prensadas para herbario

2.7 Obtención de aceites esenciales y extractos

2.7.1 Aceites esenciales

Para la obtención de aceites esenciales se empleó la técnica de destilación por arrastre de vapor utilizando un destilador de acero inoxidable de capacidad de 55 L, al cual se le adaptó un embudo de decantación o trampa de clewenger según el caso, con el fin de separar el hidrolato y el aceite (Moghaddam & Mehdizadeh, Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Grown in Iran against Some Plant Pathogenic Fungi, 2020).



Figura 2.5 Montaje del sistema de destilación

La cantidad de masa empleada por cada ciclo de destilación varió de acuerdo con la especie debido a sus características morfológicas, principalmente por el tamaño y grosor de tallos y hojas, ya que al colocar una excesiva cantidad de materia vegetal, esta puede llegar a obstruir el paso del vapor, lo cual haría que el rendimiento final disminuya de forma considerable. Cabe resaltar, que un ciclo involucra el encendido del sistema, el tiempo que tarda en aparecer la primera gota del destilado y el transcurso de una hora hasta el apagado del equipo.

2.7.2 Aceite esencial de Orégano S*

La destilación se realizó en un solo ciclo, en el cual se emplearon 408 g de hojas secas de orégano y aproximadamente 2.5 L de agua. Al equipo se le añadió un embudo de

decantación en la manguera de salida para separar el aceite esencial del hidrolato. La destilación duró una hora e inició 28 minutos después del arranque del sistema.

2.7.3 Aceite esencial de Orégano C*

Para esta destilación se utilizaron 6364.06 g de hojas y los tallos secos, es decir, 14 lb. Por otra parte, al equipo se le añadió una trampa de clevenger para separar fácilmente el aceite esencial del hidrolato. Considerando el gran tamaño y peso de los tallos, el proceso se realizó en 5 ciclos, empleando 2.5 L de agua en cada uno. La destilación empezó aproximadamente entre 37 y 48 minutos después de encender el equipo en cada ciclo. De forma similar a extracción anterior, estos duraron 1 hora.

2.7.4 Aceite esencial de tomillo

Para la obtención de este aceite, se emplearon 1667.88 g de hojas y tallos de tomillo seco, lo cual equivale a 3.68 lb. Al igual que en la extracción de la especie anterior, se le añadió una trampa de clevenger para la separación del aceite. Debido a que esta planta, a pesar de ser una especie liviana, ocupa un gran volumen, la destilación se realizó en 7 ciclos junto a 2.5 L de agua en cada uno de ellos. La destilación empezó 22 minutos aproximadamente, después de encender el sistema en cada ciclo. Tal como las extracciones anteriores, cada ciclo duró 1 hora. La cantidad empleada de orégano y tomillo en cada ciclo para la extracción de aceites esenciales se muestran en la tabla 2.3:

Tabla 2.3 Cantidad empleada de orégano y tomillo por ciclo

Ciclo	Materia seca (g)		
	Orégano S*	Orégano C*	Tomillo
1	408	1040.51	275.31
2	n/a	1285.68	219.62
3	n/a	1557.16	199.45
4	n/a	1146.48	222.70
5	n/a	1334.23	242.15
6	n/a	n/a	258.68
7	n/a	n/a	249.97
Total	408	6364.06	1667.88

2.7.5 Extractos naturales

Los extractos naturales se obtuvieron por maceración (Duarte-Trujillo, Jiménez-Forero, Pineda-Insuasti, González-Trujillo, & García-Juárez, 2020). Se emplearon metodologías distintas para cada especie tomando en consideración el tipo y proporción del solvente para la extracción de los compuestos de interés antifúngico reportados en la literatura contra los patógenos de estudio.

2.7.6 Extracto de albahaca

Se colocaron las hojas secas de albahaca en un molino y con el fin de obtener partículas de menor tamaño, este polvo se pasó por un tamiz de 65. Se colocaron 200 g del polvo fino en 1000 *mL* de agua destilada fría en 5 recipientes de vidrio, cada uno con 40 g de material seco y 200 *mL* de solvente para conservar la proporción original. La maceración se realizó durante 48 horas, posterior a esto, se realizó el filtrado empleando papel filtro en un embudo de vidrio. El extracto se almacenó a 4 °C (Isaac & Abu-Tahon, 2014).



Figura 2.6 Elaboración del extracto acuoso de albahaca

2.7.7 Extracto de ajo

Se trituraron 100 g de dientes de ajo, previamente lavados junto a 100 *mL* de agua destilada, posteriormente, se dejó macerar durante 24 horas (Singh J. K., Kumar, Kumar, Kumar, & Mehta, 2017). El macerado fue filtrado al vacío empleando un matraz Kitasato y un embudo buchner con papel filtro. Luego, el producto obtenido fue centrifugado a 4500 rpm por 20 minutos y nuevamente filtrado. Finalmente, el extracto se congeló a -20°C durante 24 horas antes de su uso.



Figura 2.7 Elaboración del extracto acuoso de ajo

2.7.8 Extracto de cáscaras de cacao

Las cáscaras secas se trituraron en un molino para granos para formar un polvo fino y pasaron por un tamiz de 80. Se colocaron 20 g de la muestra sólida en 200 mL de disolvente, el cual fue una mezcla de acetona y agua en proporción de 7:3, verificando que la proporción entre la muestra y el solvente sea de 1:10 (Rachmawaty, et. al, 2018). Se realizó la maceración durante 24 horas a temperatura ambiente en un lugar cerrado y protegido de la luz para luego realizar el filtrado, este se realizó únicamente utilizando papel filtro en un embudo de vidrio. Luego, el extracto fue concentrado mediante el uso de un evaporador rotatorio a una temperatura de 45°C hasta obtener una consistencia espesa.



Figura 2.8 Elaboración del extracto de cáscaras de cacao

2.7.9 Extracto de laritaco

Para la especie *Vernonanthura Patens*, se empleó la técnica de extracción Soxhlet empleando un calentador múltiple con dos equipos de extracción durante 3 horas. Se utilizaron 50 g de hojas secas pulverizadas y 450 mL de etanol al 99.95% para todo el sistema, ya que por equipo se colocó 25 g de muestra con 225 mL de solvente (Manzano, et. al, 2013).



Figura 2.9 Elaboración del extracto etanólico de Laritaco

2.8 CG-EM

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se realizó para los aceites esenciales e hidrolatos con el equipo 7890A GC System - 5975C inert MSD With Triple Axis-Detector, con dimensiones HP – 1 (19091Z-115) (50 m length x 0,320 mm Diam x 0,52 μ m Film), el gas utilizado fue Helio gas carrier con un flujo constante de 1,5 mL/min y a 12,847 psi de presión. Con respecto a la muestra, se empleó 1(μ L) modo Split 1:150 para los aceites, mientras que los hidrolatos se usó split e inyector por fibra spme. La configuración de escaneo fue de 35-550 uma de Biblioteca Digital de Espectros de Masas Wiley 9th Edition con 790 mil espectros + Biblioteca NIST 2011 con 243 mil espectros con nombres y estructuras químicas. La temperatura de inyección fue de 260°C, mientras que las temperaturas iniciales y finales de la columna se describen en la tabla 2.4:

Tabla 2.4 Temperaturas iniciales y finales de la columna

Especie	Temperatura inicial (°C)	Temperatura final (°C)	Tiempo (min)
Oregano C*	4	80	2
Oregano S*	4	220	0
Tomillo	10	245	2
Tiempo de corrida (min)		45	

Orégano S* para *Origanum vulgare*

Orégano C*: para *Plectranthus amboinicus*

2.9 Cuantificación de compuestos fenólicos

Se realizó mediante una modificación del método de Folin-Ciocalteu (Ortiz, Marín-Arroyo, Noriega-Domínguez, Navarro, & Arozarena, 2013). Para la elaboración de la curva de calibración se emplearon soluciones de ácido gálico a concentraciones de 100, 200, 300, 500 y 1000 ppm y sus respectivas absorbancias. Todas las muestras se prepararon en conjunto con el reactivo de Folin-Ciocalteu y se analizaron por triplicado. Para los aceites esenciales se realizaron diluciones de 1:1000.

A partir de la ecuación de la curva de calibración y de los valores de absorbancia que registraron los aceites esenciales y extractos, se procedió a determinar sus respectivas concentraciones de polifenoles. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico.

2.10 Evaluación en patógenos

2.10.1 Cepas

Se utilizaron tres cepas patógenas aisladas de la corona de banano: *Fusarium globosum*, *Fusarium verticillioides* y *Curvularia alcornii*, que se encontraban conservadas en la colección de microorganismos del CIBE-ESPOL.

Nota: La evaluación con *Curvularia alcornii* es un análisis adicional como parte de los patógenos que afectan al banano y el análisis con patógenos del género *Moniliophthora* se lo realizó mediante lo establecido en la bibliografía.

2.10.2 Ensayos de inhibición de aceites esenciales

Se evaluaron los aceites de orégano de la costa, orégano de la sierra y tomillo a las siguientes concentraciones: 100, 250, 500, 1000 y 2000 ppm y se disolvieron en dimetil-sulfóxido (DMSO). Los ensayos se realizaron en medio APD, se colocó un disco de agar de 5 mm del cultivo del patógeno en el centro de cada caja Petri y se incubaron a 28 °C por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó el ensayo de inhibición usando el método de difusión de disco (Diáñez, et. al, 2018). Se utilizó como control positivo el fungicida comercial Tern y como control negativo DMSO. Se incubaron las cajas Petri a 28 °C y se evaluaron a las 72 horas. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

2.10.3 Ensayos de inhibición de extractos vegetales

Los extractos vegetales de ajo, cascara de cacao, albahaca y *V. patens* se utilizaron en los ensayos de inhibición a diferentes concentraciones (2000, 4000, 6000, 8000 y 10000 ppm). Se emplearon las mismas cepas y metodología descrita anteriormente.

2.11 Elaboración del flyer Informativo

El flyer informativo se elaboró con la finalidad de resumir la bioprospección realizada y dar a conocer su potencial antifúngico contra los patógenos de estudio. El flyer muestra imágenes representativas de cada especie, así como su identificación (nombre científico y taxonomía). También se colocaron aquellos compuestos que suelen encontrarse de forma mayoritaria en la composición de los aceites esenciales y extractos y que presentan actividad antimicrobiana. Finalmente, se adjuntaron los porcentajes de inhibición revisados en la literatura para las especies: *Fusarium verticillioides*, *Moniliophthora roreri* y *Fusarium oxysporum*.

Nota: Los análisis de cuantificación de polifenoles, cromatografía de gases y evaluación de patógenos fueron realizados por el personal de CIBE cumpliendo con los protocolos internos.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Obtención de Aceites esenciales e hidrolatos

Se realizó la obtención de los aceites esenciales de 3 especies empleando la técnica de destilación por arrastre de vapor. En la tabla 3.1 se evidencia que el rendimiento y el tiempo de extracción varió de acuerdo con la especie, parte empleada de la planta y su lugar de cultivo. Cabe resaltar que el rendimiento se calculó a partir de la relación entre la cantidad producida de aceite y la materia vegetal utilizada.

Tabla 3.1 Rendimiento de la obtención de aceite

Especie	Materia vegetal utilizada (g)	Cantidad de aceite producida (mL)	Rendimiento %	Tiempo empleado en la destilación (h)
Orégano S*	408	3	0.76	1.2
Orégano C*	6364.06	3.2	0.05	9.3
Tomillo	1667.88	4.5	0.27	10.1


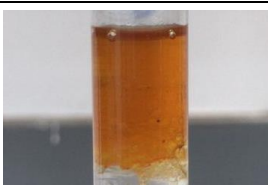

Se puede observar que ambos aceites esenciales de orégano, a pesar de pertenecer a la misma familia y ser extraídos bajo la misma metodología, presentan una diferencia significativa sus rendimientos. El aceite del orégano S* obtuvo un rendimiento del 0.76% y el tiempo de extracción fue aproximadamente de 1 hora, mientras que para el aceite del orégano C* el rendimiento fue de 0.05% y el tiempo, de 9 horas. Una posible causa sería la parte de la planta utilizada, ya que para el orégano S* se emplearon únicamente las hojas y para el orégano C* se añadieron los tallos, tomando en cuenta la mayor cantidad de metabolitos secundarios se encuentran en las hojas. Sin embargo, a escala industrial, el deshojado es una actividad de extensa duración para la poca cantidad de materia vegetal que se obtuvo y dependiendo de la mano de obra debería incluirse en un análisis de producción.

Por otra parte, estudios muestran que la altitud incide en la actividad biológica, composición química y en el rendimiento de los aceites esenciales debido al tipo y cantidad de nutrientes absorbidos por las especies vegetales (Türkmen, Kara, Maral, & Soyly, 2021). Esto puede ser corroborado debido a que ambos oréganos fueron

recolectados en diferentes regiones del país. En este caso, el orégano S* fue recolectado en la región Sierra del Ecuador, específicamente en la provincia de Tungurahua a 2237 msnm., mientras que el orégano C* fue recolectado en la parroquia Chongón, de la ciudad de Guayaquil (Región Costa) a 23 msnm.

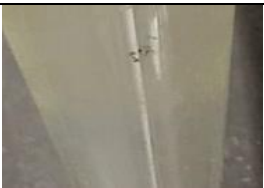
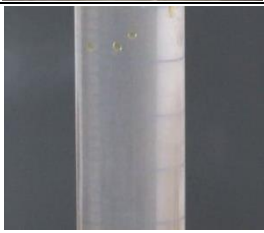
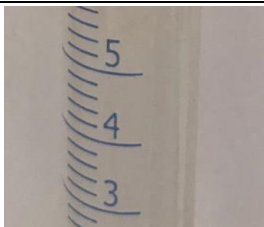
En cuanto al aceite esencial de tomillo, este tuvo el segundo mayor rendimiento al emplear tallos y hojas en un tiempo similar al del orégano C*. A continuación, se describen las características organolépticas de los aceites obtenidos en la tabla 3.2:

Tabla 3.2 Propiedades organolépticas de los aceites esenciales

Especie	Características	
Orégano S*	Consistencia ligeramente viscosa, de coloración amarilla y olor característico herbáceo y picante.	
Orégano C*	Consistencia viscosa, de coloración naranja y olor característico herbáceo.	
Tomillo	Consistencia ligeramente viscosa, de coloración amarilla parda y olor característico herbáceo.	

En cada extracción de aceite esencial, se generó una gran cantidad de hidrolato, (residuo del proceso de extracción), que, pese a que fueron especies diferentes, presentaron características similares: fuerte olor no herbáceo y tonalidad blanquecina.

Tabla 3.3 Propiedades organolépticas de los hidrolatos obtenidos

Especie	Características	
Orégano S*	Consistencia líquida, de tonalidad blanquecina con un una ligera coloración amarillenta y olor fuerte no herbáceo.	
Orégano C*	Consistencia líquida de carácter transparente con ligera tonalidad blanquecina y olor fuerte no herbáceo. Presentó gotas de aceite esencial.	
Tomillo	Consistencia líquida r transparente con ligera tonalidad blanquecina y olor fuerte no herbáceo.	

3.2 Obtención de extractos





Se obtuvieron los extractos de 4 especies empleando distintas metodologías referenciadas en la literatura con la finalidad de poder referenciar resultados obtenidos. La tabla 3.4 muestra los rendimientos de cada extracto, así como el tiempo de extracción. Los rendimientos más altos se obtuvieron en los extractos de albahaca y de ajo debido a que el solvente empleado fue agua y sólo se realizó filtrado y centrifugado, de tal manera que las pérdidas de solvente fueron mínimas. Por otra parte, para el extracto de cáscaras de cacao, el solvente utilizado contenía una gran parte de acetona, y fue sometido a rotoevaporación, por lo que presentaría el rendimiento más bajo, mientras que, para el de Laritaco se empleó etanol, el cual se volatiliza fácilmente, pero no generó pérdidas considerables en comparación al extracto anterior.

En cuanto a los tiempos de extracción, aquellos extractos obtenidos por maceración registran los mayores, a diferencia del Laritaco, que fue el único en el cual se utilizó la extracción soxhlet. Las propiedades organolépticas de los extractos se muestran a continuación en la tabla 3.5.

Tabla 3.4 Rendimientos de los extractos obtenidos

Especie	Materia vegetal utilizada (g)	Cantidad de solvente (mL)	Cantidad de extracto producido (mL)	Rendimiento %	Tiempo empleado en la extracción (h)
Albahaca	200	1000	751	75.1	48
Ajo	100	100	72	76	24
Cacao	20	200	98	49	24
Laritaco	50	450	316	70.2	3

Tabla 3.5 Propiedades organolépticas de los extractos obtenidos

Especies	Características	
Albahaca	Consistencia líquida de color verde oscuro y olor característico de la especie.	
Ajo	Consistencia ligeramente espesa de ligera tonalidad verdosa y olor característico de la especie.	
Cacao	Consistencia espesa de color café y olor similar al de la corteza de árbol.	
Laritaco	Consistencia líquida de color verde oscuro y olor herbáceo.	

3.3 Cuantificación de compuestos fenólicos

Se determinó la cantidad de compuestos fenólicos empleando una modificación del ensayo de Folin ciocalteu. En la tabla 3.6 se observa que el extracto de cáscaras de cacao obtuvo la mayor concentración de compuestos fenólicos expresados en equivalentes de ácido gálico.

Ordenados de forma decreciente, los aceites y extractos que presentaron las mayores concentraciones fueron: E. cacao, E. albahaca, AE. orégano C*, AE. tomillo, E. ajo, AE. orégano S* y E. laritaco.

Tabla 3.6 Concentración de compuestos fenólicos de aceites esenciales y extractos

Muestra	Concentración Promedio (ppm)
AE. Orégano S*	678
AE. Orégano C*	2713
AE. Tomillo	2641
E. Albahaca	5069
E. Ajo	1183
E. Cáscaras de cacao	8477
E. Laritaco	641

AE:Aceite Esencial, **E:** Extracto, **H:** Hidrolato.

Con esto, se han analizado los resultados obtenidos para aceites esenciales y extractos de forma general. A continuación, se procede a realizar un análisis para cada especie, el cual involucra el análisis de cromatogramas, composiciones, contenido de polifenoles y su evaluación en patógenos para aceites esenciales. En el caso de los extractos, sólo se realizará el análisis con respecto a los dos últimos criterios.

Los cromatogramas y compuestos químicos identificados por CGEM de los aceites esenciales e hidrolatos se presentan en las figuras 3.1, 3.2 y 3.3 y en las tablas 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11, 3.12.

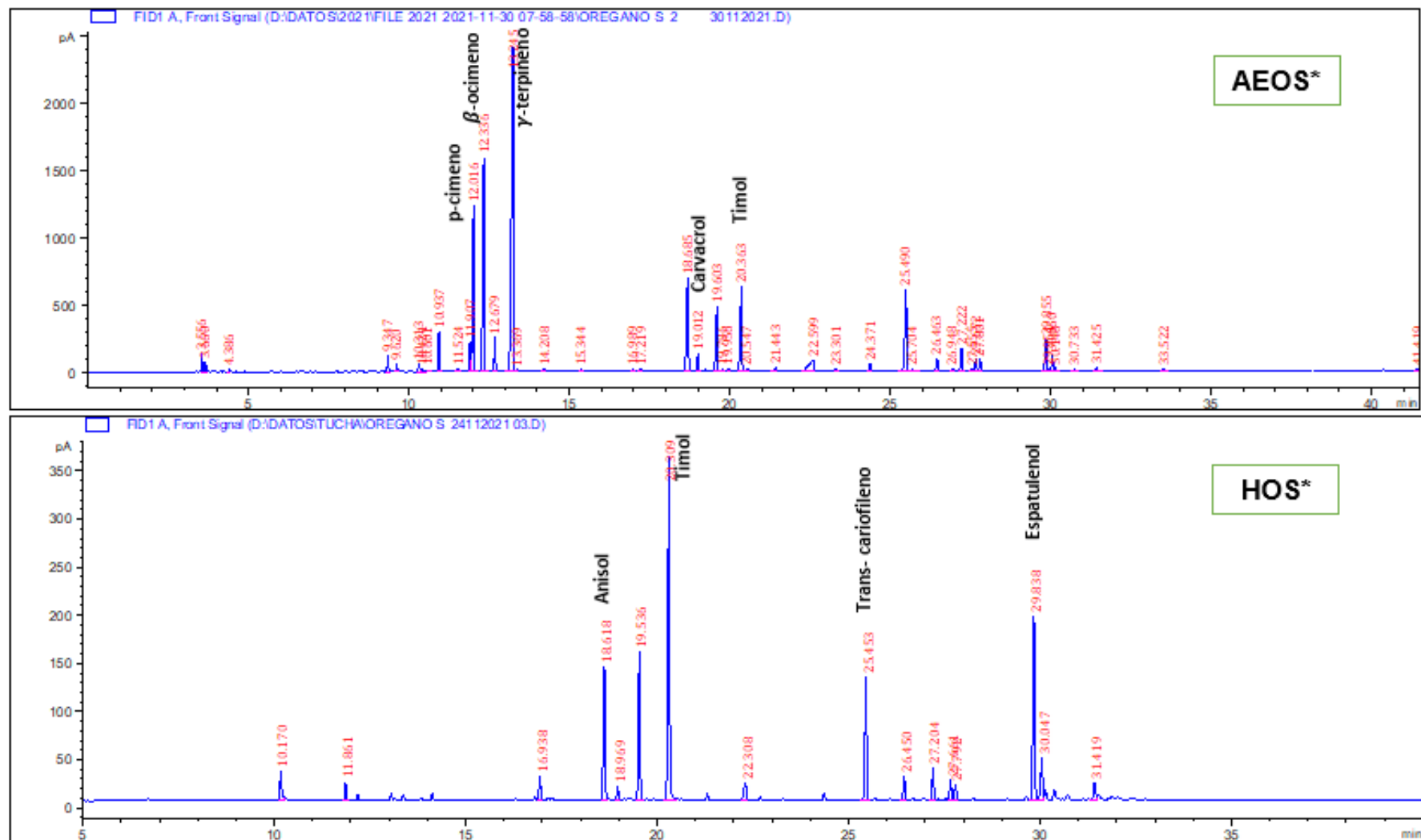


Figura 3.1 Cromatograma analítico gaseoso del aceite esencial e hidrolato de Orégano S*
 AEOS*: Aceite Esencial de Orégano S*, HOS*: Hidrolato de Orégano S*

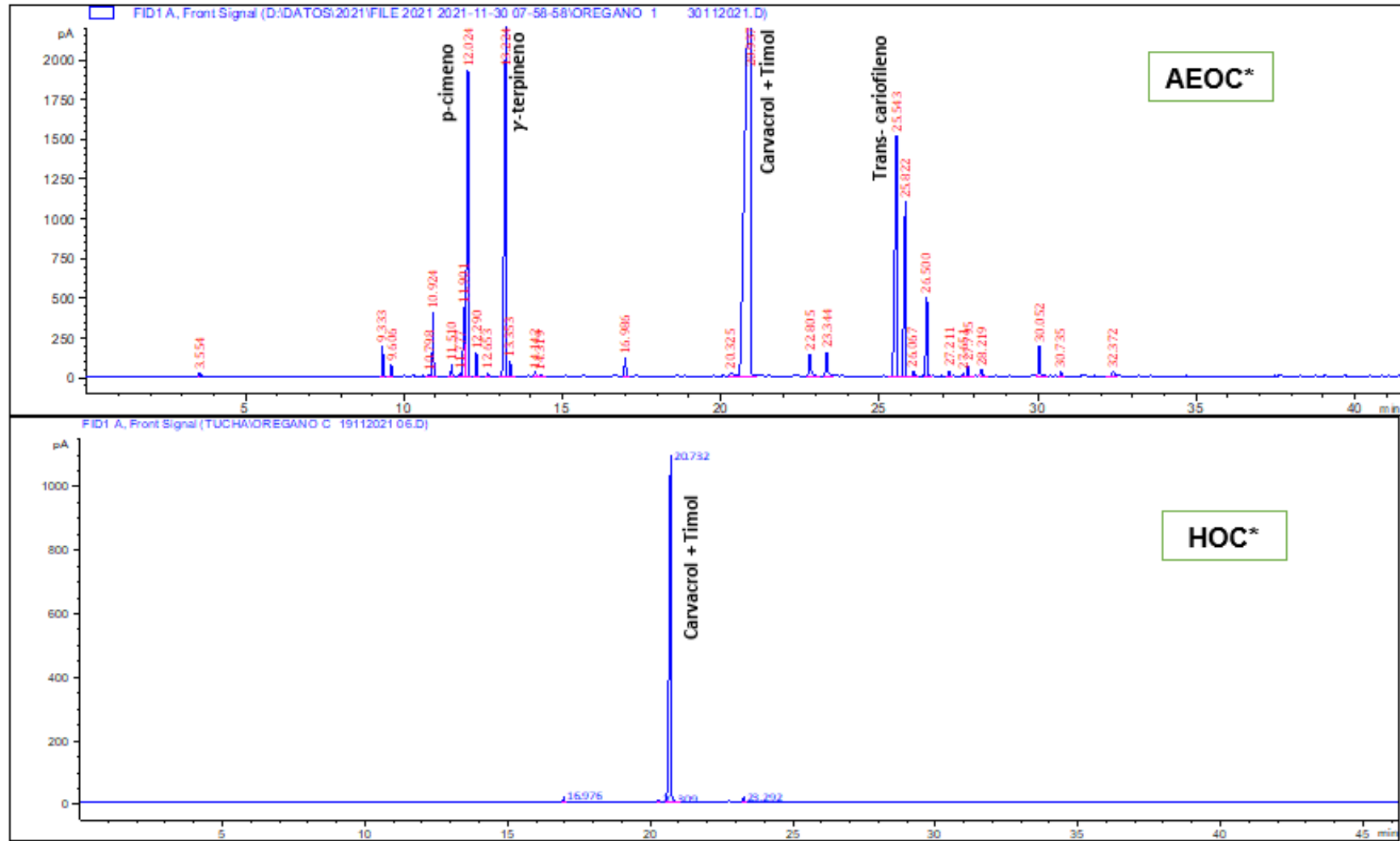


Figura 3.2 Cromatograma analítico gaseoso del aceite esencial e hidrolato de Orégano C*
 AEOC*: Aceite Esencial de Orégano C*, HOC*: Hidrolato de Orégano C*

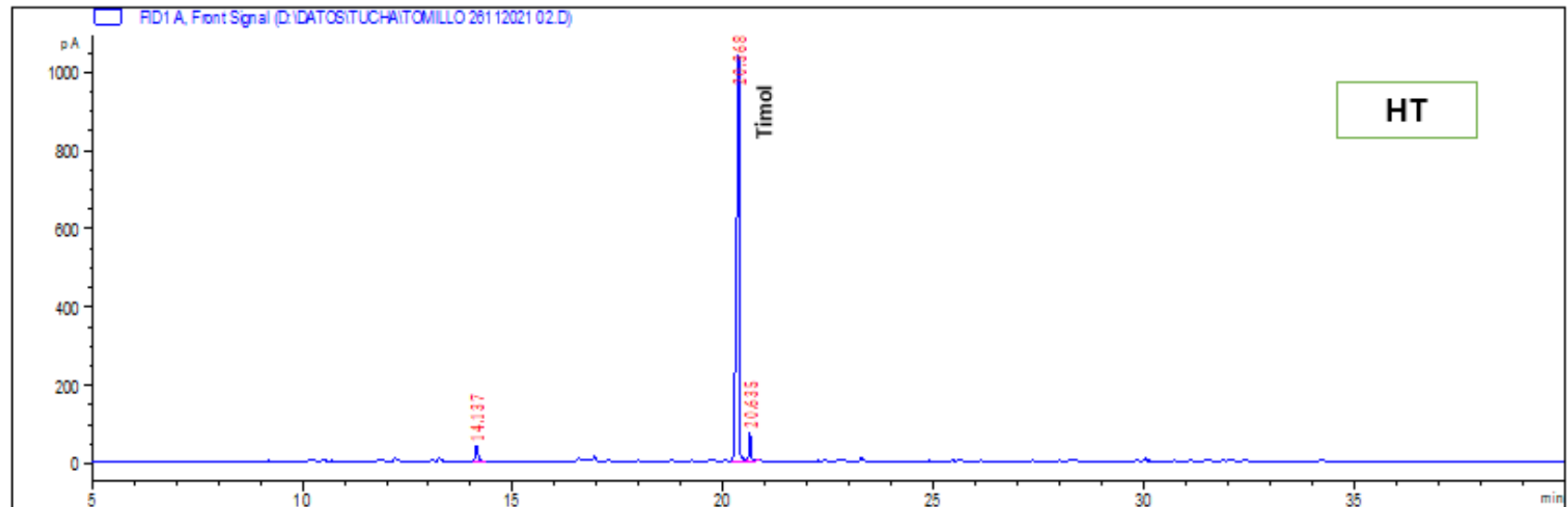
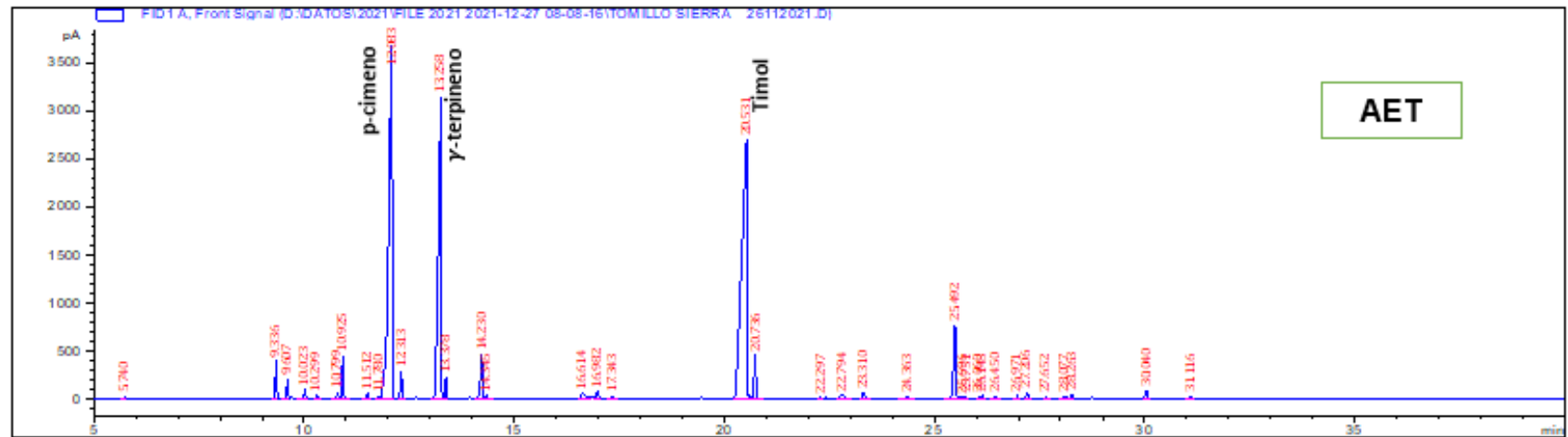


Figura 3.3 Cromatograma analítico gaseoso del aceite esencial e hidrolato de Tomillo
 AET: Aceite Esencial de Tomillo, HT: Hidrolato de To

Tabla 3.7 Composición del AEOS*

Aceite Esencial: <i>Origanum vulgare</i>		
Fecha de obtención:		19/11/2021
Índice de Refracción	1,4935	
Componente	T. retención	%
α -tujeno	9,35	0,8
α -pineno	9,62	0,4
β -mirceneno	10,94	2,0
α -terpineno	11,91	1,8
p-cimeno	12,02	10,0
β -ocimeno	12,34	14,1
γ -terpineno	13,25	26,9
Anisol	18,69	7,6
Carvacrol	19,01	1,1
Geranial	19,60	4,6
Timol	20,36	6,1
Ácido crotónico	22,60	2,7
Trans-cariofileno	25,49	5,8
α -humuleno	26,46	0,9
Germacreno D	26,95	1,5
Germacreno B	27,67	0,9
β -bisaboleno	27,80	0,8
Espatulenol	29,86	2,4
Óxido de cariofileno	30,06	1,1
Total	91,4	

Tabla 3.8 Composición del HOS*

Hidrolato: <i>Origanum vulgare</i>		
Fecha de obtención:		19/11/2021
Índice de Refracción	1,4935	
Componente	T. retención	%
β -mirceneno	10,17	2,2
α -terpineno	11,861	1,2
Anisol	18,618	10,5
Timol	20,309	25,9
Ácido crotónico	22,308	2,0
Trans-cariofileno	25,453	9,3
α -humuleno	26,45	1,9
Germacreno D	27,204	2,4
Germacreno B	27,661	1,6
β -bisaboleno	27,792	1,2
Espatulenol	29,838	15,4
Óxido de cariofileno	30,047	3,7
Total	77,4	

Tabla 3.9 Composición del AEOC*

Aceite Esencial: <i>Plectranthus amboinicus</i>			
Fecha de obtención:		24/11/2021	
		Especificaciones	
Índice de Refracción	1,50118 *	1,4959 a 1,4978	
Componente	T. retención	%	Especificaciones
α -tujeno	9,33	0,7	
α -pineno	9,61	0,3	
β -mirceno	10,92	1,5	
α -terpineno	11,90	2,1	
p-cimeno	12,02	9,4	14,7 a 25,1
β -ocimeno	12,29	0,6	
γ -terpineno	13,22	13,8	16,8 a 22,7
Terpinen-4-ol	16,99	0,6	
Carvacrol + Timol **	20,94	47,1	(28,6 a 44,6)(\leq 3,0)
Trans-cariofileno	25,54	9,7	
α -bergamoteno	25,82	5,9	
α -humuleno	26,50	2,3	
Óxido de cariofileno	30,05	1,0	
Total		95,0	
Observación1: * Índice de refracción elevado para la especie.			
Observación2: ** Compuestos coeluyen.			

Tabla 3.10 Composición del HOC*

Hidrolato: <i>Plectranthus amboinicus</i>		
Fecha de obtención:		24/11/2021
Índice de Refracción	1,50118 *	
Componente	T. retención	%
Terpinen-4-ol	16,98	1,0
Carvacrol + Timol **	20,73	97,5
Trans-cariofileno	23,29	0,9
Total		99,4
Observación1: * Índice de refracción elevado para la especie.		
Observación2: ** Compuestos coeluyen.		

Tabla 3.11 Composición del AET

Aceite Esencial: <i>Thymus vulgaris</i>		
Fecha de obtención:		26/11/2021
Índice de Refracción	1,4949	
Componente	T. retención	%
α -tujeno	9,336	1,3
α -pineno	9,607	0,7
β -mirceno	10,925	1,6
p-cimeno	12,083	27,6
β -ocimeno	12,313	1,1
γ -terpineno	13,258	21,2
4-tujanol	13,378	0,8
Linalool	14,23	2,0
Borneol	16,614	0,6
4-terpineol	16,986	0,4
Timol	20,531	31,8
Carvacrol	20,736	2,0
β -cariofileno	25,492	3,9
Total		95,1

Tabla 3.12 Composición del HT

Hidrolato: <i>Thymus vulgaris</i>		
Fecha de obtención:		26/11/2021
Índice de Refracción	1,4949	
Componente	T. retención	%
Linalool	14,132	3,1
Timol	20,368	88,1
Carvacrol	20,635	4,4
β -cariofileno	23,282	0,7
Total		96,3

3.4 Aceite esencial e hidrolato de Orégano S*

La caracterización del aceite esencial presentó 19 compuestos, entre ellos, al γ -terpineno (26.9%), β -ocimeno (14.1%) y p-cimeno (10.0%) como componentes mayoritarios (ver tabla 3.7). Es conocido que los principales componentes del aceite esencial de orégano son el carvacrol y el timol, sin embargo, estos registraron bajos porcentajes en su composición (1.1% y 6.1% respectivamente). Esto se evidencia con el cromatograma mostrado en la figura 3.1, donde se muestran 3 picos relativamente altos correspondientes a los componentes mayoritarios.

En cuanto a la caracterización de la parte orgánica del hidrolato, este presentó 12 compuestos de los 19 encontrados en el aceite. En este caso, los componentes mayoritarios fueron: timol (25.9%), espatulenol (15.4%) y anisol (10.5%) (ver tabla 3.8 y figura 3.1).

Se observa que los hidrolatos poseen parte de los mismos compuestos encontrados en los aceites esenciales debido a que este se conforma en su mayoría por el vapor condensado de la destilación, el cuál suele arrastrar una pequeña cantidad de aceite. Es posible que la ausencia de varios de sus componentes se deba a su degradación en presencia de luz ya que estos no se almacenaron en frascos ámbar en comparación a los aceites esenciales.

De los componentes encontrados, se han realizado estudios enfocados en la actividad antimicrobiana del γ -terpineno en el aceite esencial de Pistacho (*Pistacia Khinjuk*), cuya composición por lo general presenta un 80% de este compuesto y se ha corroborado su actividad antifúngica en *Candida Albicans* con una mínima concentración inhibitoria (CMI) de 0.003 mg/mL (Tahvilian, et. al, 2016). En cuanto al β -Ocimeno, este es un monoterpeno acíclico volátil que, debido a su fragancia de esencia floral, resulta atractivo para especies polinizadoras y posee propiedades antifúngicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Farré-Armengo, Filella, Llusà, & Peñuelas, 2017).

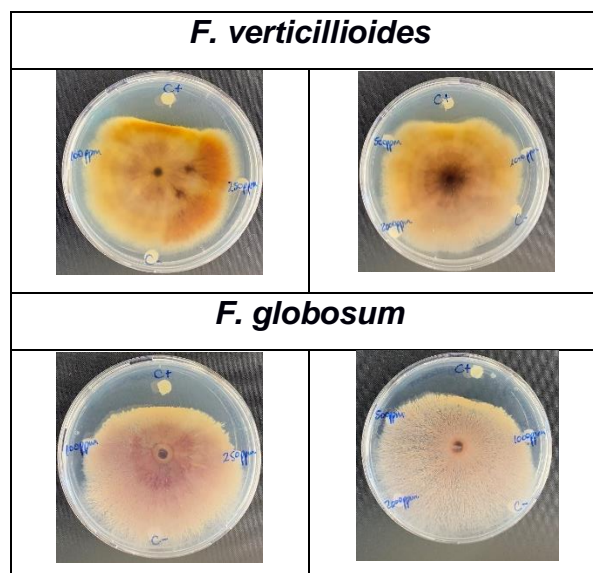
Otro monoterpeno encontrado, es el p-cimeno, presente en más de 100 especies vegetales pertenecientes a las familias *Lamiaceae*, *Mirtaceae*, *Burseraceae* y *Asteraceae*, que siendo otro de los componentes principales de extractos naturales, es

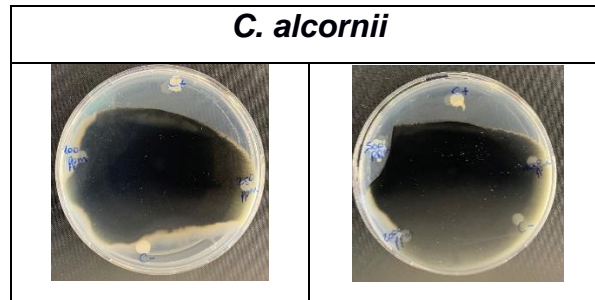
de gran interés debido a su actividad antifúngica, antibacteriana y antiviral. (Marchese, y otros, 2017). Por otra parte, el espatulenol encontrado mayoritariamente en el hidrolato, a diferencia del aceite, es un sesquiterpeno cíclico sobre el cual se han realizado estudios acerca evaluando el esencial de *Baccharis drunculifolia*, donde se ha registrado mayor actividad antimicrobiana en bacterias a en comparación a los hongos, principalmente en *S. aureus*, *B.cereus* y *P. aeruginosa* (Cazella, et. al, 2019).

Con respecto a la cuantificación de compuestos fenólicos, este obtuvo 678 ppm (ver tabla 3.6), el cual es un valor bajo en comparación a los otros aceites esenciales. Este valor coincide con la caracterización ya que los únicos compuestos fenólicos que se encontraron fueron timol y carvacrol, presentando bajos porcentajes, 6.1% y 1.1% respectivamente.

En cuanto a la evaluación de patógenos, se realizó la evaluación del aceite esencial de orégano S* en los tres hongos de interés: *F. verticillioides*, *F. globosum* y *M. roseri* (de forma Bibliográfica) a concentraciones de 100, 250, 500, 1000 y 2000 ppm. Como se mencionó anteriormente, de forma adicional, se evaluó a *C.alcornii*, hongo que también afecta a los cultivos de banano, con la finalidad de extender el análisis in vitro de las especies evaluadas (ver tabla 3.13).

Tabla 3.13 Evaluación en patógenos con aceite esencial de Orégano S*





Aparentemente, este aceite esencial no tuvo inhibición significativa en ninguno de los patógenos evaluados, sin embargo, se obtuvieron resultados ligeramente favorables para las dos especies de *Fusarium*. Esto se pudo dar debido a las concentraciones empleadas, ya que no se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) como en muchos estudios referenciados en la literatura.

Por ejemplo, se reportó la inhibición de *F. verticillioides* desde 500 a 1500 $\mu\text{L/L}$, evaluando un aceite cuya composición presentaba timol (21.2%) y terpineol (21.1%) como componentes mayoritarios (López, Theumer, Zygadlo, & Rubinstein, 2004), mientras que el aceite evaluado en el presente estudio presentó sólo un 6.1% de timol y la ausencia de terpineol en su composición (ver tabla 3.7).

De forma similar, se reportó que a partir de concentraciones a partir de 400 $\mu\text{g/mL}$ *F. oxysporum* es inhibido al evaluar un aceite con 67.67% de carvacrol (Gonçalves, et. al, 2021), mientras que, en este caso, el aceite evaluado presentó 1.1% de este compuesto (ver tabla 3.7). Cabe resaltar que, debido a que los estudios para este patógeno son escasos, se optó por referenciar estudios similares con *F. oxysporum*. Por otra parte, para *M. royeri*, al realizar ensayos con concentraciones de a 100, 500, 1000 y 5000 $\mu\text{L/L}$, se ha registrado inhibición a partir de 500 $\mu\text{L/L}$ (Gómez-López, et al., 2020).

Un factor determinante de la inhibición es el contenido de compuestos activos, en este caso, el aceite de Orégano S* presenta niveles muy bajos de carvacrol y timol, por lo que el efecto antifúngico no resultó significativo.

3.5 Aceite esencial de Orégano C*

Este aceite registró 13 componentes orgánicos en su composición, de los cuales resaltan el carvacrol y el timol, siendo estos mayoritarios con un 47.1% entre ambos, seguido del

γ -terpineno (13.8%), trans-cariofileno (9.7%) y p-cimeno (9.4%) (ver tabla 3.9). Esto se evidencia en el cromatograma mostrado en la figura 3.2, donde se observan 4 picos significativos correspondientes a los componentes mayoritarios, sin embargo, para el carvacrol y timol sólo existe uno, siendo este el más alto de todos debido a que ambos compuestos coeluyen representando el 47% de la composición.

En cuanto a la composición del hidrolato, de los 13 compuestos que se presentaron en el aceite, sólo 4 conforman su parte orgánica: terpinen-4-ol, carvacrol, timol y trans cariofileno, de los cuales el 97.5% es corresponde al carvacrol y timol. (ver tabla 3.10 y figura 3.2).

El timol y carvacrol son monoterpenos fenólicos, principales componentes de aceites esenciales provenientes de especies de la familia *Lamiaceae* (Kowalczyk, Przychodna, Sopata, Bodalska, & Fecka, 2020). Son sintetizados de forma natural a partir de la aromatización del γ - terpineno a p-cimeno, seguido de su hidroxilación (Tohidi, Rahimmalek, Arzani, & Trindade, 2020). Estudios demuestran que los aceites que poseen una elevada cantidad de monoterpenos fenólicos presentan una fuerte actividad antimicrobiana (Perez, et. al, 2019).

Si comparamos los resultados obtenidos de ambos aceites de orégano, estos también presentan una diferencia significativa en el contenido de carvacrol y timol. El aceite de Orégano S* muestra un 7.2% de estos dos compuestos mientras que el de Orégano C* presenta un 47% (ver tabla 3.7 y 3.9). Esto corrobora una vez más que la estructura del suelo, topografía, genotipo de la especie y condiciones ambientales y de cultivo inciden en la producción de metabolitos secundarios (Soltanbeigi & Sakartepe, 2020).

Con respecto a la concentración de compuestos fenólicos obtenida, esta fue de 2713 ppm (ver tabla 3.6), esto indica que, de los aceites esenciales, es el que presenta la mayor concentración. Este resultado coincide con las caracterizaciones realizadas, ya que el contenido de los únicos compuestos fenólicos encontrados (timol y carvacrol) es el más alto en este aceite, siendo estos 47.1%, 33.8% y 7.2% para Orégano C*, Tomillo y Orégano S* respectivamente (ver tabla 3.7, 3.9, 3.11).

Como se ha mencionado anteriormente, el aceite esencial de orégano posee dos compuestos fenólicos mayoritarios: Carvacrol y timol, cuya actividad antibacteriana se debe al grupo hidroxilo presente en ambas estructuras, este interactúa con la bicapa lipídica de la membrana citoplasmática gracias a su naturaleza hidrofóbica que le permite alinearse entre las cadenas de ácidos grasos aumentando así, su fluidez y alterando su permeabilidad para iones y protones hasta desestabilizarla. Esto se corroboró en estudios realizados en *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* empleando aceites esenciales de orégano y tomillo (Siroli, Patrignani, Gardini, & Lanciotti, 2015), así mismo otros estudios verifican el efecto del carvacrol en las membranas de *Staphylococcus aureus* (Wang, et. al, 2016).

Del mismo modo, la actividad antifúngica de estos compuestos involucra el deterioro de la membrana plasmática al interrumpir la biosíntesis de ergosterol, compuesto similar al colesterol en las células animales encargado de proporcionar la fluidez de la membrana y permitir sus interacciones con el medio para regular las actividades celulares, estudios realizados contra *Cryptococcus neoformans* lo corroboran (Nóbrega, Teixeira, Oliveira, Lima, & Lima, 2016).

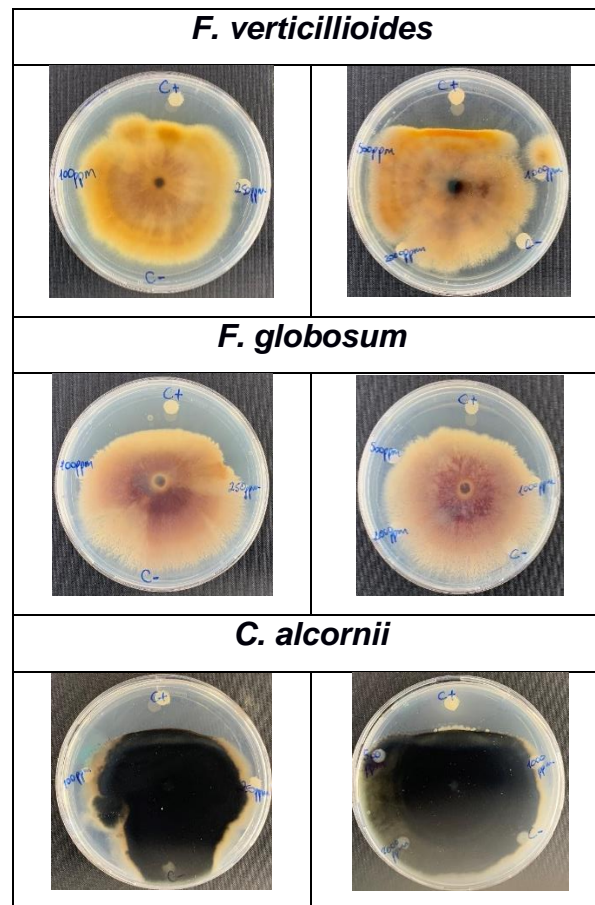
Con respecto a la evaluación realizada, el aceite esencial de Orégano C* no mostró inhibición significativa en ninguno de los patógenos de estudio a las concentraciones establecidas (ver tabla 3.14).

Sin embargo, estudios demuestran que el aceite esencial de *Plectranthus amboinicus* logra inhibir el crecimiento de *Fusarium sp.* en un 93.19% empleando una concentración de 0.03% v/v evaluando un aceite con un gran contenido de carvacrol (66.12%) (Ly, Ngoc, Van, & Trang, 2016). Para *M. roreri*, no se han realizado estudios de la evaluación de este aceite. No obstante, se ha evaluado esta especie como infusión y como extracto acuoso obtenido por maceración, presentando porcentajes de inhibición del 79.70% y 55.33% respectivamente (Freire & Quintana, 2017).

Volviendo a los resultados de inhibición, es necesario recordar que la composición de cada aceite es diferente, debido a que las condiciones geográficas y de cultivo también

lo son. Otra posible causa, es la falta de realización de pruebas preliminares donde se evalúa una pequeña cantidad de aceite esencial puro y no haber determinado la CMI.

Tabla 3.14 Evaluación en patógenos con aceite esencial de Orégano C*



3.6 Aceite esencial de tomillo

De forma similar al aceite anterior, la caracterización registró 13 componentes orgánicos en su composición. Los componentes mayoritarios fueron timol (31.8%), p-cimeno (27.6%) y γ -terpineno (21.1%) (ver tabla 3.11). La composición registrada corrobora los estudios de (Marchese, et. al, 2017), que establece que en los aceites esenciales de tomillo el p-cimeno suele predominar y es de gran interés debido a sus propiedades mencionadas anteriormente. Por otra parte, el cromatograma mostrado en la figura 3.3, muestra 3 picos predominantes, los cuales corresponden a los componentes mayoritarios.

Al igual que el hidrolato de Orégano C*, de los 13 compuestos encontrados en el aceite, sólo se presentaron 4 en la parte orgánica, que en este caso fueron: linalool, timol,

carvacrol y β -cariofileno. El componente mayoritario fue el timol con un 88.1% en su composición (ver tabla 3.12 y figura 3.3).

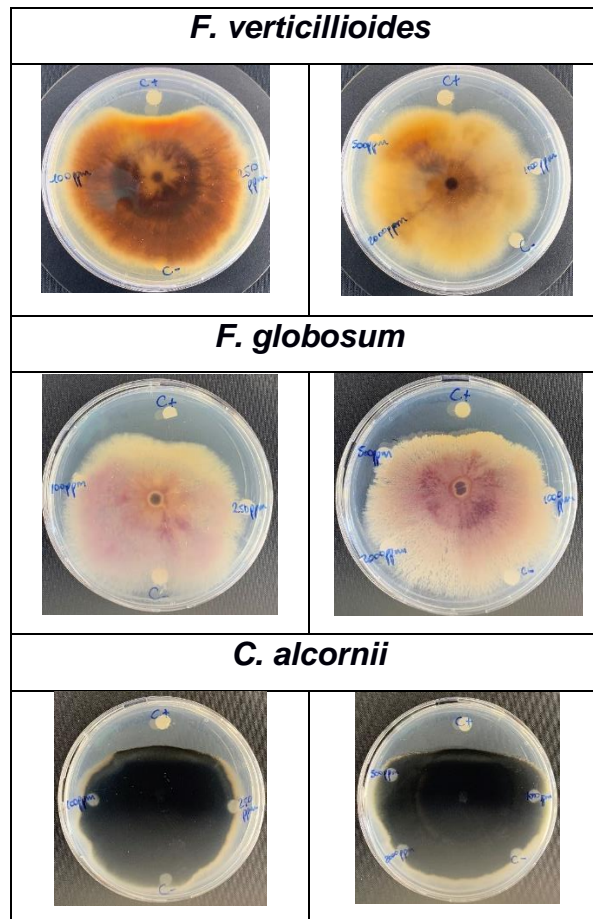
En cuanto a la concentración de compuestos fenólicos, en el aceite esencial de tomillo se obtuvo 2641 ppm, valor cercano al de Orégano C*, esto coincide con niveles de carvacrol y timol registrados en el cromatograma (ver tabla 3.6).

Si bien es cierto, la actividad antimicrobiana de este aceite se debe principalmente a la presencia de timol, compuesto con potencial antifúngico muy similar al del carvacrol, no obstante, el p-cimeno también presenta actividad antimicrobiana por lo que la bibliografía registra estudios comparativos entre el carvacrol y el p-cimeno. Al ser evaluados en *Bacillus cereus*, se evidenció para ambos casos la expansión de la membrana citoplasmática y la reducción del potencial de membrana. Individualmente, el p-cimeno no alteró el gradiente de pH mientras que el carvacrol registró reducción en los niveles de ATP, demostrando que el carvacrol resulta más efectivo en comparación al p-cimeno, dando a entender que la actividad antimicrobiana se ve más afectada por la presencia o ausencia del grupo hidroxilo que por la posición del anillo de benceno (Marchese, et. al, 2017).

La literatura menciona que se ha evaluado aceites esenciales de tomillo con timol, carvacrol y p-cimeno como componentes mayoritarios, en *F. verticillioides*, donde la inhibición se dio a partir de 250 $\mu\text{L/L}$ (Villaplana, Pérez-Revelo, & Valencia-Chamorro, 2018). En cuanto a *M. roreri*, evaluaron el aceite de esta especie presentando inhibición a partir de 500 $\mu\text{L/L}$ (Gómez-López, et al., 2020). También se ha evaluado el efecto antifúngico en *Fusarium oxysporum* con un CMI de 400 $\mu\text{L/L}$ empleando un aceite que contenía 36.81% de timol y 30.90% de p-cimeno (Moghaddam & Mehdizadeh, Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Grown in Iran against Some Plant Pathogenic Fungi, 2020).

Al evaluar el aceite esencial de tomillo en los tres hongos de interés no se presentó inhibición a las concentraciones establecidas (ver tabla 3.15), tal como ocurrió con los aceites esenciales de Orégano S* y Orégano C*. Lo cual, puede ser justificado al no realizar pruebas preliminares de inhibición o la determinación del CMI.

Tabla 3.15 Evaluación en patógenos con aceite esencial de tomillo



3.7 Extracto de albahaca

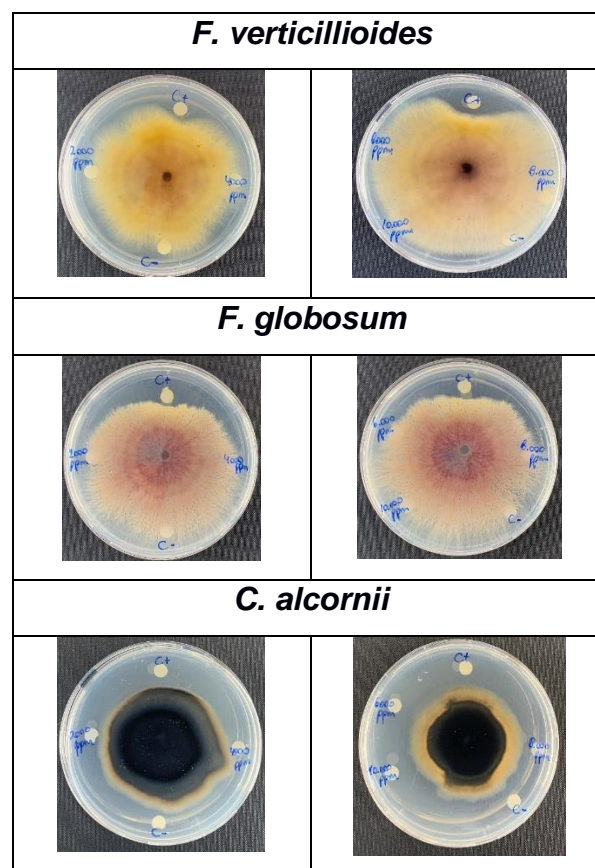
El segundo extracto con mayor concentración de polifenoles resultó ser el de albahaca con 5069 ppm (ver tabla 3.6). Estudios muestran que los extractos acuosos de esta especie contienen saponinas, taninos y glucósidos, siendo estos dos últimos compuestos fenólicos (Ahmed, Ikram, & Khair-ul-Bariyah, 2012).

En cuanto a la actividad antimicrobiana de esta especie referenciada en bibliografía, se han evaluado extractos de albahaca comercial, con 86.72% de estragol en su composición, en *Fusarium verticillioides* indicando, que a una concentración de 1.50% v/v, se puede inhibir completamente el crecimiento de este hongo y que entre 0.35% y 0.70% v/v se producen cambios a escala micro y macro en su morfología (Kocić-Tanackov, Dimić, Lević, Tanackov, & Tuco, 2011). Por otra parte, se ha evaluado el extracto acuoso a concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 2% (v/v) en *Fusarium Oxysporum*,

presentando porcentajes de inhibición de 82.2%, 85.5%, 93.3% y 96.6%, donde se menciona que el porcentaje de inhibición puede llegar al 100% empleando solventes orgánicos como n-butanol, etanol y acetona (Isaac & Abu-Tahon, 2014).

Al realizar la evaluación de patógenos, este extracto inhibió a *C. alcornii* en todas las concentraciones empleadas, ya que al transcurrir las primeras 72 horas, el crecimiento micelial se detuvo. Existen varias razones por las cuales no se pudo dar la inhibición en los otros hongos, como no realizar análisis preliminares de inhibición, así como la determinación del CMI (ver tabla 3.6).

Tabla 3.16 Evaluación en patógenos con extracto de albahaca



3.8 Extracto de ajo

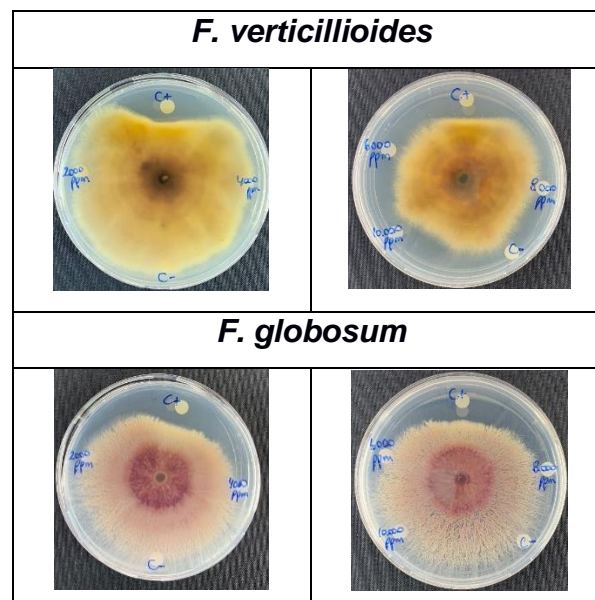
El extracto acuoso de ajo presentó una concentración de compuestos fenólicos de 1183 ppm (ver tabla 3.6), el cual es bajo en comparación a otras especies como el cacao y las pertenecientes a la familia lamiaceae debido a que se conoce que el ajo presenta una gran cantidad de compuestos sulfurados en su composición, uno de ellos es la alicina

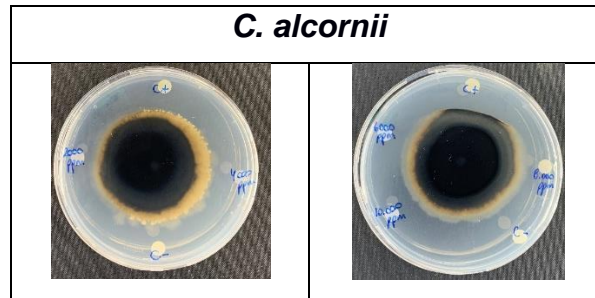
que se considera, presente de forma mayoritaria con propiedades antifúngicas (Singh J. K., Kumar, Kumar, Kumar, & Mehta, 2017).

En cuanto a la actividad antifúngica registrada en la bibliografía, se ha evaluado su extracto acuoso en *Fusarium verticillioides*, y se demostró que la inhibición del crecimiento micelial aumenta con la concentración del extracto, donde el mayor porcentaje de inhibición fue de 76.29% empleando una concentración al 80% (v/v) (Ajayi, 2020). Por otra parte, No se han realizado estudios de la evaluación de extractos acuosos de *Allium sativum* en *Moniliphthora roreri*, pero sí de extractos etanólicos. Los resultados muestran que empleando concentraciones entre 2% y 3% (v/v) se puede inhibir su crecimiento micelial debido a la actividad de los metabolitos secundarios de la especie, ya que a concentraciones mayores el etanol empieza a incidir en los resultados (Mora Correa, 2021). Finalmente, al evaluar este extracto acuoso en *Fusarium oxysporum*, empleando concentraciones del 1, 2, 5 y 10% (m/v), donde a partir del 5% se inhibe el hongo completamente (Singh J. K., Kumar, Kumar, Kumar, & Mehta, 2017).

Al realizar la evaluación en los patógenos de estudio se evidenció inhibición para *C. alcornii* a todas las concentraciones (2000-10000 ppm), ya que al transcurrir 72 horas el crecimiento micelial se detuvo. En cambio, para *F. verticillioides*, la inhibición inició a partir de 6000 ppm (ver tabla 3.17). De forma general, estos resultados corroboran la actividad antifúngica reportada.

Tabla 3.17 Evaluación en patógenos con extracto de ajo





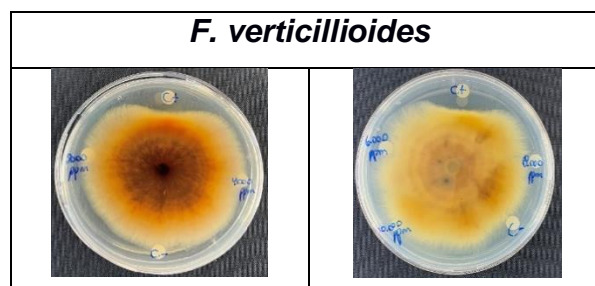
3.9 Extracto de cáscaras de cacao

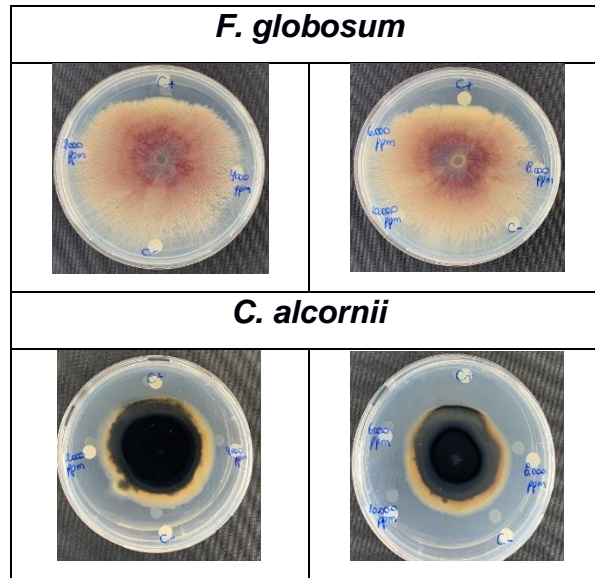
Este extracto obtuvo la mayor cantidad de compuestos fenólicos en comparación a todas las especies con una concentración de 8477 ppm (ver tabla n), esto coincide en parte con estudios realizados que han evaluado su actividad antifúngica en *Fusarium oxysporum*, los cuales corroboran que al emplear acetona al 70% como solvente se obtiene una mayor concentración de compuestos fenólicos (94.92 mg Eq Ac. Gálico/mg extracto) en comparación a otros extractos que utilizan otros solventes como etanol (49.92 mg Eq Ac. Gálico/mg extracto) (Rachmawaty, et. al, 2018).

En el mismo estudio, se ha evidenciado la inhibición de *Fusarium Oxysporum* empleando este extracto a concentraciones 0.02%, 0.2% y 2% (m/v) gracias al alto contenido de polifenoles en su composición. Cabe resaltar que los estudios relacionados a la evaluación antifúngica de estos residuos son escasos.

Al evaluar el extracto obtenido, este presentó inhibición en *C. alcornii*, ya que al transcurrir 72 horas el crecimiento micelial se detuvo (ver tabla 3.18). Se muestra que en la mayoría de las concentraciones existe cierto grado de inhibición, principalmente a partir de 6000 ppm.

Tabla 3.18 Evaluación en patógenos con extracto de cáscaras de cacao





3.10 Extracto de laritaco

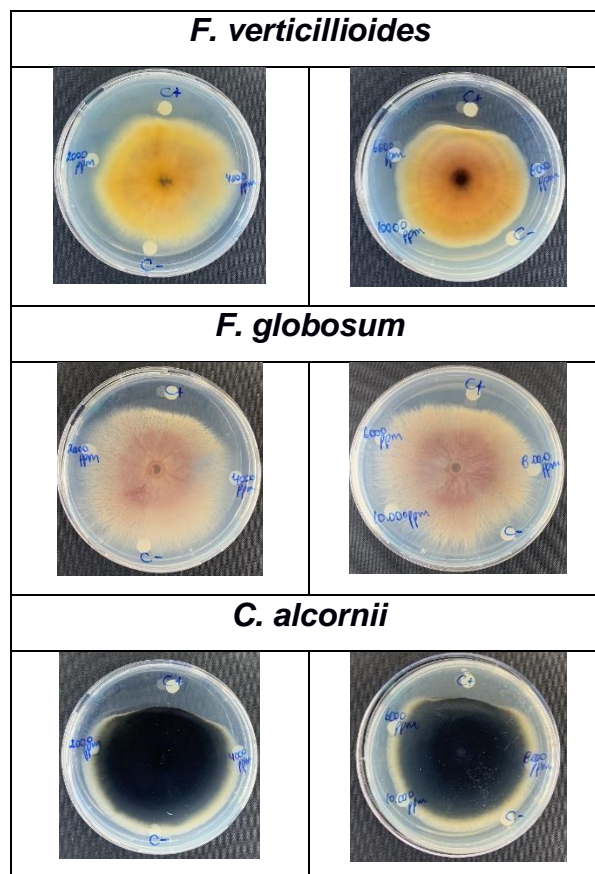
El extracto etanólico presentó la concentración más baja de compuestos fenólicos con 641 ppm (ver tabla 3.6). El bajo contenido de estos compuestos pudo haber sido causado por presencia mayoritaria de otros componentes como alcaloides, quinonas, saponinas, terpenos y triterpenos en comparación a los fenoles y taninos presentes, ya que estudios que han realizado el tamizaje fitoquímico de varios fraccionamientos de extractos de Laritaco corroboran la presencia de estos compuestos (Manzano, Silva, Sterner, & Peralta, 2012).

Existen pocos estudios relacionados a esta especie, no obstante, se ha demostrado que a partir del fraccionamiento del extracto etanólico de Laritaco, empleando hexano y acetato de etilo, se pueden aislar 2 componentes activos con gran actividad antifúngica: Lupeol, y Epi Lupeol (Manzano, Silva, Sterner, & Peralta, 2012). Se ha evidenciado que el Lupeol presenta una tasa de inhibición del 50 y el 90% a concentraciones de 100 y 200 µg/mL, respectivamente, contra el patógeno *P. notatum*. Mientras que, el compuesto Epi Lupeol inhibe a *F. oxysporum* en un 80 y 100% a 100 y 200 µg/mL, respectivamente (Manzano, et. al, 2013).

Debido a que el extracto evaluado es etanólico y no se realizó el fraccionamiento para aislar los componentes activos, este no presentó inhibición significativa ante los patógenos de estudio. Sin embargo, se puede notar una leve inhibición en *F.*

verticillioides, pero no es uniforme, lo cual pudo haber sido causado por actividad propia del solvente (ver tabla 3.19).

Tabla 3.19 Evaluación en patógenos con extracto de laritaco



3.11 Análisis económico de producción

3.11.1 Producción de aceite esencial

Considerando los factores de rendimiento, tiempo promedio de destilación y composición se puede determinar la opción más factible entre las tres especies de las que se obtuvo aceite esencial.

Haciendo referencia a los rendimientos descritos en la tabla 3.1, el Orégano S* presentó el porcentaje más alto (0.76%). Sin embargo, su composición presenta bajos niveles de timol y carvacrol, con 1.1% y 6,1%, respectivamente, lo que no garantizaría un alto nivel de inhibición. Por otro lado, un tiempo de extracción promedio de 1.2 horas involucra aproximadamente 9 horas de deshojado. En el caso de Orégano C*, este posee niveles favorecedores de compuestos activos, no obstante, su rendimiento es muy bajo (0.05%).

Por lo tanto, estas especies no serían las mejores candidatas para elaborar futuros bioproductos. La opción más factible con respecto a los criterios anteriormente mencionados es el tomillo, puesto que presenta porcentajes altos de timol (31.8%), p-cimeno (27.6%) y γ -terpineno (21.2%).

Los costos de producción para el aceite de tomillo se muestran en la tabla 3.20 y 3.21, tomando en cuenta el costo de materia prima, equipos y materiales. Por lo tanto, para producir el aceite de tomillo se necesitaría aproximadamente \$180 como inversión inicial, considerando la reutilización de los equipos y materiales, por lo que solo se invertiría en la compra de materia prima.

Tabla 3.20 Costos de equipos y materiales para aceite esencial de tomillo

Descripción	Precio
Olla de destilación	\$57.00
Mangueras PVC (2m)	\$12.19
Bomba de pecera	\$20.00
Cocineta a gas (2 puestos)	\$26.00
Gas	\$2.6.00
Trampa Clevenger	\$12.00
Juego de Soporte (anillo, pinza, nueces)	\$34.89
Total	\$164.68

Tabla 3.21 Costos de materia prima para aceite esencial de tomillo

Costo de Producción para 4,5 ml de Aceite Esencial	
Materia Prima	Precio
Especie vegetal (15 lb)	\$12.00
Agua	\$0.48
Total	\$12.48
Costo de producción para 5 mL	Precio de venta (Ganancia del 30%)
\$13.87	\$18.03
Precio Comercial (5 mL)	
\$21.06	

Como se puede observar en la tabla 3.21, el costo de producción de 4.5 mL de aceite de tomillo sería \$12.48 y para 5 mL, que es la cantidad que se comercializa, tendría un costo de \$13.7. Sin embargo, para obtener como mínimo una ganancia del 30%, este aceite debería venderse a \$18.03. En el mercado, el precio de la misma cantidad es \$21.06 (Young Living, 2022), por lo que la producción de este aceite bajo la metodología aplicada es rentable. Es importante mencionar que, si este producto es utilizado para elaborar un fungicida natural, se necesitaría concentraciones efectivas contra los patógenos, además de que su producción involucra el hidrolato, que puede ser usado como un solvente económico para este tipo de bioproductos.

3.11.2 Producción de extractos

En cuanto a la producción de extractos, de las 4 especies empleadas, las opciones más factibles corresponden al ajo y a la albahaca, debido a que utilizan el agua como solvente, por otra parte, los rendimientos que presentan son altos, 76% y 75.1% ya que se emplean métodos de separación sólido-líquido como la filtración. En cuanto a los tiempos de producción, estos principalmente recaen en el tiempo de maceración, 24 horas para el ajo y 48 horas para la albahaca. Considerando el potencial antifúngico como un factor determinante en la selección de la especie, el extracto acuoso de ajo logró inhibir a *C. alcornii* desde 2000 ppm y a *F. verticillioides* a partir de 6000 ppm, siendo esta la especie más efectiva.

En la tabla 3.22, se muestran los costos de producción de 72 mL de extracto de ajo con un valor de \$3.31, mientras que el costo para producir 30 mL (cantidad comercial) es de \$1.29 y para tener una ganancia mínima del 30%, el costo sería de \$1.68. En el mercado, esta cantidad se vende a \$10.99 (Herb Pharm, 2022), por lo que producir este extracto bajo los métodos empleados en este estudio es factible.

En la tabla 3.23 se muestran los costos del extracto de albahaca, el costo para producir 30 mL con una ganancia del 30% es \$0.29, mientras que esta cantidad se comercializa a \$17.90 (Ruth's, 2021). Por lo que, esta especie también se considera como un buen candidato para la elaboración de fungicidas.

Tabla 3.22 Costos de producción de extracto de ajo

Costo de Producción para 72 mL de Extracto de Ajo	
Materia Prima	Precio
Especie vegetal (100 g)	\$0.60
Agua Destilada (gal)	\$2.50
Total	\$3.10
Costo de producción para 30 mL	Precio de venta (Ganancia del 30%)
\$1.29	\$1.68
Precio Comercial (30 mL)	
\$10.99	

Tabla 3.23 Costos de producción de extracto de albahaca

Costo de Producción para 751 mL de Extracto de Albahaca	
Materia Prima	Precio
Especie vegetal (15 lb)	\$3
Agua Destilada (gal)	\$2.5
Total	\$5.5
Costo de producción para 30 mL	Precio de venta (Ganancia del 30%)
\$0.22	\$0.29
Precio Comercial (30 mL)	
\$17.95	

Si comparamos la producción de aceites esenciales y extractos, resulta más factible optar por la segunda opción, debido a que los extractos representan costos de producción menores ya que los materiales a emplear en la maceración por lo general son recipientes de vidrio, y para la filtración se pueden utilizar embudos y papel filtro al no contar con una bomba de vacío. A nivel industrial, es posible contar con equipos industrializados como centrífugas que permiten obtener mejor calidad de extracto.

CAPÍTULO 4

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

Con la finalidad de proponer diferentes alternativas para la elaboración de futuros fungicidas naturales, se realizó una bioprospección para evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de varias especies vegetales como *Origanum vulgare* (orégano), *Plectranthus amboinicus* (orégano), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Ocimum basilicum* (albahaca), *Allium sativum* (ajo), *Theobroma cacao* (cacao) y *Vernonanthura Patens* (laritaco) contra patógenos que afectan a los cultivos de banano y cacao, como los hongos *Fusarium verticillioides*, *Fusarium globosum* y *Monilophthora roreri*. Adicionalmente, se evaluó en el hongo *Curvularia alcornii* para extender el estudio, concluyendo que:

- Los extractos presentaron mayor actividad antifúngica en comparación a los aceites esenciales, siendo los extractos de cáscaras de cacao, albahaca y ajo los que inhibieron el crecimiento micelial de *C.alcornii* después de las primeras 72 horas a partir de 2000 ppm. Además, el ajo presentó la mejor inhibición contra *F.verticillioides* desde 6000 ppm. Estos resultados difieren de los estudios mencionados en la bibliografía debido a que la evaluación antimicrobiana depende de varios factores como las concentraciones empleadas y la composición de los aceites esenciales y extractos. Cabe recalcar que, la composición varía con respecto a las interacciones bióticas, condiciones ambientales, topografía, genotipo de la especie y condiciones de cultivo.
- Los extractos de cáscaras de cacao y albahaca presentaron las mayores concentraciones de polifenoles con 8477 y 5069 ppm, respectivamente. Sin embargo, la actividad antimicrobiana no depende únicamente de la concentración de estos compuestos, sino del tipo de metabolito secundario que posea la especie vegetal. Un ejemplo que evidencia esto es el ajo, puesto que posee compuestos sulfurados con fuertes propiedades antimicrobianas que potenciaron la inhibición contra *C.alcornii* y *F.verticillioides*, a pesar de tener una baja concentración de polifenoles (1183 ppm) en comparación a los extractos de cáscaras de cacao y albahaca que solo inhibieron a *C.alcornii*.

- A partir de los resultados obtenidos se realizó un análisis económico, determinando que los extractos acuosos de ajo y albahaca son potenciales candidatos para la elaboración de fungicidas naturales, debido a sus bajos costos de producción y efectiva actividad antifúngica. Además, se elaboró un flyer informativo mostrando las 7 especies vegetales con potencial antifúngico.

4.2 Recomendaciones

- Debido a que sólo se realizó la caracterización para aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), se recomienda realizar un tamizaje fitoquímico para los extractos con la finalidad de caracterizarlos de forma cualitativa para indicar la presencia de varios grupos químicos como alcaloides, flavonoides, saponinas, triterpenos, entre otros.
- En cuanto a la evaluación en patógenos, se recomienda realizar el análisis de CMI con los aceites esenciales y extractos naturales para detectar la concentración mínima a la que se presenta inhibición. De esta manera, se pueden descartar aquellas especies vegetales que no muestren inhibición contra los patógenos estudiados.
- Por otro lado, se recomienda aislar los componentes activos con propiedades antimicrobianas de las especies vegetales debido a que se puede aumentar el porcentaje de inhibición en comparación a la evaluación de los aceites y extractos puros, ya que estos contienen varios compuestos con propiedades que no aportan al potencial antimicrobiano.
- Se recomienda realizar combinaciones entre los aceites y extractos obtenidos para aumentar la concentración de compuestos activos con el fin de potenciar la actividad antifúngica.

BIBLIOGRAFÍA

- Acero-Godoy, J., Guzmán-Hernández, T., & Muñoz-Ruíz, C. (2019). Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (Verbenaceae), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Revista Tecnología en Marcha*, 3-11.
- Ahmed, D., Ikram, M., & Khair-ul-Bariyah, S. (2012). Ocimum Basilicum: A Review on Phytochemical and Pharmacological Studies. *Pak. J. Chem* 2,, 78-85.
- Ajayi, A. M. (2020). Seed Dressing With Aqueous Allium Sativum L. Extracts Enhanced The Tolerance Of Maize Plant To Stalk And Ear Rot Disease Caused By Fusarium Verticillioides (Sacc.) Nirenberg. *Canadian Journal of Agriculture and Crops*, 5(2), 160-173.
- Andrade Almeida, J., Rivera García, J., Chire Fajardo, G., & Ureña Peralta, M. (2019). Propiedades físicas y químicas de cultivares de cacao Theobroma cacao L. de Ecuador y Perú. *Enfoque UTE*, 10(4), 1-12.
- Asociación Cubana de Técnicos Agrícolas y Fores. (3 de agosto de 2017). *Ingoagro*. Obtenido de <http://www.actaf.co.cu/revistas/condimentos/Albahaca.pdf>
- Aziz, Z., Ahmad, A., Setapar, S., Karakucuk, A., Azim, M., Lokhat, D., & Ashraf, G. (2018). Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential-a review. *Current drug metabolism*, 1100-1110.
- Bailey, B., Evans, H., Phillips-Mora, W., Ali, S., & Meinhardt, L. (2018). Moniliophthora roreri, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular plant pathology*, 19(7), 1580-1594.
- Barbosa, C., Da Fonseca, R., Batista, T., Barreto, M., Argolo, C., de Carvalho, M., & Gramacho, K. (2018). Genome sequence and effectorome of Moniliophthora pernicioso and Moniliophthora roreri subpopulations. *BMC genomics*, 1-12.
- Bonelo Chavarro, L. Y., & Sánchez Leal, L. C. (2018). Control biorracional de hongos del género Fusarium. *Biociencias*, 2(1), 1-19.
- Cazella, L. N., Glamoclija, J., Soković, M., Gonçalves, J. E., Linde, G. A., Barros Colauto, N., & Gazim, Z. C. (2019). Antimicrobial Activity of Essential Oil of Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae) Aerial Parts at Flowering Period. *Frontiers in plant science*, 27, 1-7.

- Chávez, J. A. (23 de agosto de 2021). *SCIENTIA*. Obtenido de <https://www.journalscientia.com/divulgacion-cientifica/estrategias-de-valorizacion-para-la-cascara-de-la-mazorca-del-cacao/>
- Cosio, H., & Rodríguez, H. (2017). Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de albahaca (*Ocimum basilicum*) sobre el crecimiento de *Actinomyces viscosus* (In vitro effect of the hydroalcoholic extract of basil (*Ocimum basilicum*) on the growth of *Actinomyces viscosus*). *Ciencia y Desarrollo*, 65-73.
- Diáñez, F., Santos, M., Parra, C., Navarro, M., Blanco, R., & Gea, F. (2018). Screening of antifungal activity of 12 essential oils against eight pathogenic fungi of vegetables and mushroom. *Letters in applied microbiology*, 400-410.
- Duarte Trujillo, A. S., Jiménez Forero, J. A., Pineda Insuasti, J., González Trujillo, C. A., & García Juárez, M. (2020). Extracción de sustancias bioactivas de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) por maceración dinámica. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1), 61-74. doi:<https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.72409>
- Dwivedy, A. K., Singh, V. K., Das, S., Chaudhari, A. K., Upadhyay, N., Singh, A., . . . Dubey, N. K. (2019). Biodiversity Bioprospection with Respect to Medicinal Plants. En *Ethnopharmacology and Biodiversity of Medicinal Plants* (págs. 3-30). Apple Academic Press.
- elicriso. (10 de junio de 2020). *Plantas medicinales*. Obtenido de https://www.elicriso.it/es/plantas_medicinales/albahaca/
- Elmogahzy, Y. E. (2020). Finished fibrous assemblies. *Engineering Textiles*, 275-298. doi:10.1016/b978-0-08-102488-1.00011-3
- Farré-Armengo, G., Filella, I., Llusà, J., & Peñuelas, J. (2017). β -Ocimene, a Key Floral and Foliar Volatile Involved in Multiple Interactions between Plants and Other Organisms. *Molecules* 22(7), 1148.
- Fiallo Iturralde, J. I. (2017). *Importancia del sector agrícola en una economía dolarizada*. Quito: Bachelor's thesis.
- Flórez Chacón, C. V., & Mojica Flórez, J. S. (2019). *Determinación de la composición química de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) y su posible uso como antifúngico contra microorganismos fitopatógenos en productos agrícolas*. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud.

- Freire, K. S., & Quintana, J. G. (2017). Uso de dos métodos de extracción fitoquímicos a base de Jengibre (*Zingiber officinale* L.), Oreganón (*Plectranthus amboinicus*) y Ortiga (*Urtica dioica*), para el control in vitro de la monilla (*Moniliophthora roreri* Cif & Par). (*Bachelor's thesis, Quevedo: UTEQ*).
- Ganoza López, D. W. (2018). Propuesta para la implementación de una cadena de valor en la producción de orégano deshidratado en la provincia de Chupaca. 47.
- García-Velasco, R., Portal-González, N., Santos-Bermúdez, R., Rodríguez-García, A., & Companioni-González, B. (2021). Genetic improvement for resistance to Fusarium wilt in banana. *Revista mexicana de fitopatología*, 122-146.
- Gómez López, A., Martínez, B. L., Ortiz Gil, G., Martínez Bolaños, M., Avendaño Arrazate, C. H., & Hernández Meneses, E. (2020). Bioaceites esenciales inhiben a *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al., causante de la moniliasis en el cultivo del cacao. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 6(1), 1-12.
- Gonçalves, D. C., de Queiroz, V. T., Costa, A. V., Lima, W. P., Belan, L. L., Moraes, W. B., . . . Correa Póvoa, H. C. (2021). Reduction of Fusarium wilt symptoms in tomato seedlings following seed treatment with *Origanum vulgare* L. essential oil and carvacrol. *Crop Protection*, 141, 105487.
- Herb Pharm. (2 de enero de 2022). *Garlic extract*. Obtenido de <https://www.herb-pharm.com/product/garlic/>
- Herbarium. (2 de mayo de 2020). *Plantas y Hongos*. Obtenido de https://www.plantasyhongos.es/herbarium/htm/Origanum_vulgare.htm
- Hosseinzadeh, S., Jafarikukhdan, A., Hosseini, A., & Armand, R. (2015). The application of medicinal plantas in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. *International Journal of Clinical Medicine*, 635.
- Hussein, R., & El-Anssary, A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, 1-13.
- Información, M. d. (21 de octubre de 2021). Obtenido de <https://www.gob.ec/maae/tramites/suscripcion-contratos-marco-acceso-al-recurso-genetico>
- Iplantz. (3 de febrero de 2019). *Plectranthus amboinicus*. Obtenido de <https://www.iplantz.com/plant/1251/plectranthus-amboinicus/>

- Isaac, G. S., & Abu-Tahon, M. A. (2014). In vitro antifungal activity of medicinal plant extract against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 the causal agent of tomato wilt. *Acta Biologica Hungarica*, *65*(1), 107-118.
- Isaac, G., & Abu-Tahon, M. (2014). In vitro antifungal activity of medicinal plant extract against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 the causal agent of tomato wilt. *Acta Biologica Hungarica Volume 65*(1), 107-118.
- Kowalczyk, A., Przychodna, M., Sopata, S., Bodalska, A., & Fecka, I. (2020). Thymol and Thyme Essential Oil—New Insights into Selected Therapeutic Applications. *Molecules*, *25*(18), 4125.
- Lamuela-Raventós, R. M. (2017). Folin–Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. *Measurement of Antioxidant Activity & Capacity Recent Trends and Applications*, 107'117.
- Leandro Muñoz, M. E., Tixier, F., Germón, A., Rakotobe, V., Phillips Mora, W., Maximova, S., & Avelino, J. (2017). Efectos de variables microclimáticas en la aparición de síntomas y signos de *Moniliophthora roreri*, agente causal de la pudrición de la vaina por *Moniliophthora* en cacao. *PloS uno*, *12*(10), 3-18.
- León-Serrano, L. A., Matailo-Pinta, A. M., Romero-Ramón, A. A., & Portalanza-Chavarría, C. A. (2020). Ecuador: producción de banano, café y cacao por zonas y su impacto económico. *Revista Científica UISRAEL*, *7*(3), 97-114.
- López, A., Theumer, M., Zygadlo, J., & Rubinstein, H. (2004). Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B1 production in corn grain. *Mycopathologia*, *158*(3), 343-349.
- López-Zapata, S., & Castaño-Zapato, J. (2019). Manejo integrado del mal de Panamá [*Fusarium oxysporum* Schlechtend.: Fr. sp. *cubense* (EF SM.) WC Snyder & HN Hansen]. *Revista UDCA Actualidad & divulgación científica*, 6-8.
- Lucas, J. A., Hawkins, N. J., & Fraaije, B. A. (2015). The evolution of fungicide resistance. *Advances in applied microbiology*, *90*, 29-92.
- Ly, N. H., Ngoc, L. S., Van, P. T., & Trang, N. T. (2016). Application of the essential oil extracting from leaves of *Plectranthus amboinicus* L. for preserving *Cucumis melo* L. after harvesting. *Journal of Technical Education Science*, (39), 1-12.
- Manzano Santana, P. I., Silva Osorio, M., Sterner, O., & Peralta García, E. L. (2012). Phytochemical Studies of Fractions and Compounds Present in *Vernonanthura Patens* with Antifungal Bioactivity and Potential as Antineoplastic. *IntechOpen*, 5.

- Manzano, P. I., Miranda, M., Abreu-Payrol, J., Silva, M., Sterner, O., & Peralta, E. L. (2013). Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 539-543.
- Manzano, P. I., Silva, M., Sterner, O., & Peralta, E. L. (2012). Phytochemical studies of fractions and compounds present in *Vernonanthura patens* with antifungal bioactivity and potential as antineoplastic. *Phytochemicals - A Global Perspective of Their Role in Nutrition and*, 503-518.
- Marchese, A., Arciola, C. R., Barbieri, R., Sanches Silva, A., Nabavi, S. F., Tsetegho Sokeng, A. J., . . . Nabavi, S. M. (2017). Update on Monoterpenes as Antimicrobial Agents: A Particular Focus on p-Cymene. *Materials*, 10(8), 947.
- Martin, G. (2000). *Etnobotánica. Manual de métodos*. Montevideo: Editorial NORDAN-Comunidad.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador. (2021). Obtenido de Ecuador es el primer exportador de cacao en grano de América: <https://www.agricultura.gob.ec/ecuador-es-el-primer-exportador-de-cacao-en-grano-de-america/>
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2020). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Grown in Iran against Some Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(5), 1072-1083.
- Moghaddam, M., & Mehdizadeh, L. (2020). Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil of *Thymus vulgaris* Grown in Iran against Some Plant Pathogenic Fungi. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23:5, 1073.
- Mora Correa, A. H. (2021). Uso de diferentes dosis de extractos etanólicos de ajo para control de Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao. *UTMACH, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Carrera de Ingeniería Agronómica*, 53-56.
- Moses, L., Marasas, W., Vismer, H., De Vos, L., Rheeder, J., Proctor, R., & Wingfield, B. (2010). Molecular characterization of *Fusarium globosum* strains from South African maize and Japanese wheat. *Mycopathologia*, 170(4), 237'249.
- Moutassem, D., Belabid, L., Bellik, Y., Ziouche, S., & Baali, F. (2019). Efficacy of essential oils of various aromatic plants in the biocontrol of *Fusarium* wilt and inducing systemic resistance in chickpea seedlings. *Plant Protection Science*, 55(3), 202-217.

- Mu'nisa, A., Rachmawaty, Hasri, Pagarra, H., Hartati, & Maulana, Z. (2018). Active Compounds Extraction of Cocoa Pod Husk (Thebroma Cacao L.) and Potential as Fungicides. *In Journal of physics: Conference series*, (Vol. 1028, No. 1, p. 012013).
- Mula, J. A. (5 de enero de 2017). *Agromática*. Obtenido de <https://www.agromatica.es/cultivo-del-ajo/>
- Nóbrega, R. d., Teixeira, A. P., Oliveira, W. A., Lima, E. D., & Lima, I. O. (2016). Investigation of the antifungal activity of carvacrol against strains of *Cryptococcus neoformans*. *Pharmaceutical biology*, *54*(11), 2591-2596.
- Nuñez Figueredo, Y., Tillán Capó, J., Carrillo Domínguez, C., Menéndez Castillo, R., & León, R. (2006). Efecto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. tabletas sobre la anafilaxia pasiva cutánea, transmisión histaminérgica y adrenérgica. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 3-4.
- ONU. (9 de octubre de 2019). Obtenido de Fácil de propagar y difícil de eliminar, la nueva plaga que amenaza el banano y el plátano en América Latina: <https://news.un.org/es/story/2019/10/1463601>
- Ortiz, J., Marín-Arroyo, M., Noriega-Domínguez, M., Navarro, M., & Arozarena, I. (2013). Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador. *Journal of food science*, *78*(7), C985-C993.
- Perez, A. P., Perez, N., Suligoy Lozano, C. M., Altube, M. J., De Farias, M. A., Villares Portugal, R., . . . Romero, E. L. (2019). The anti MRSA biofilm activity of *Thymus vulgaris* essential oil in nanovesicles. *Phytomedicine Volume 57*, 339-351.
- Pérez-Vicente, L. (2018). *Moniliophthora roreri* HC Evans et al. y *Moniliophthora perniciosa* (Stahel) Aime: impacto, síntomas, diagnóstico, epidemiología y manejo. *Revista de protección vegetal*, *33*(1), 7.
- Perumal, A., Sellamuthu, P., Nambiar, R., & Sadiku, E. (2017). Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defence responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Food and Bioprocess Technology*, 1131-1141.
- Pezzani, R., Vitalini, S., & Iriti, M. (2017). Bioactivities of *Origanum vulgare* L.: an update. *Phytochemistry reviews*, 1253-1268.

- Plantnet. (9 de agosto de 2020). *Thymus vulgaris* . Obtenido de <https://identify.plantnet.org/es/prosea/observations/1008254553>
- Rachmawaty, Hasri, Mu'nisa, A., Pagarra, H., Hartati, & Maulana, Z. (2018). Extracción de compuestos activos de la cáscara de la mazorca de cacao (*Thebroma Cacao* l.) y potencial como fungicidas. *In Journal of physics: Conference series*, 2-9.
- Ramírez Concepción, H. R., Castro Velasco, L. N., & Martínez Santiago, E. (2016). Efectos Terapéuticos del Ajo (*Allium sativum*). *Revista Salud y Administración*, 3(8), 39-47.
- Rosales Torres, J. D. (2019). *Extracción de metabolitos secundarios y el estudio de su actividad biológica*. Bachelor's thesis, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Rudawska, A. (2019). *Surface Treatment in Bonding Technology*. Lublin: Academic Press.
- Ruth's, M. (5 de diciembre de 2021). *Basil extract*. Obtenido de https://www.maryruthorganics.com/collections/spread-the-love/products/holy-basil-leaf-1-oz?_pos=1&_sid=8e5dfc97b&_ss=r
- Sanit, S. (2020). In Vitro Effects of Some Ethanolic Crude Extracts of Medicinal Plants against *Colletotrichum gloeosporioides*, The Pathogen of Anthracnose Disease in Chilli. *International Journal of Sciences*, 17-24.
- Secretaría General de la Comunidad Andina. (Junio de 2020). *Comunidad Andina*. Obtenido de <https://www.comunidadandina.org/biblioteca-andinoteca/guia-andina-para-el-diagnostico-de-fusarium/>
- SENASICA. (2015). *Fusarium spp. (Hypocreales : Nectriaceae) Podredumbre de raíces*. . *Dirección General De Sanidad Vegetal, Dirección Del Centro Nacional De Referencia Fitosanitaria*, 1-18.
- Singh, J. K., Kumar, M., Kumar, S., Kumar, A., & Mehta, N. (2017). Inhibitory effect of botanicals on growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* inciting wilt of Chilli (*Capsicum annum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 2199-2204.
- Singh, J., Kumar, M., Kumar, S., Kumar , A., & Mehta, N. (2017). Inhibitory effect of botanicals on growth and sporulation of *Fusarium oxysporum* inciting wilt of Chilli (*Capsicum annum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 2199-2204.

- Siroli, L., Patrignani, F., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2015). Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. *Food Chemistry*, 182, 185-192.
- Soltanbeigi, A., & Sakartepe, E. (2020). Chemical specification of Wild *Salvia tomentosa* Mill. collected From Inner Aegean Region of Turkey. *ZEITSCHRIFT FUR ARZNEI- & GEWURZPFLANZEN*, 25(1), 31-35.
- Tahvilian, R., Moradi, R., Zhale, H., Mahdi, M. Z., Zangeneh, A., Yazdani, H., & Majid, H. (2016). Ethnomedicinal Plants: Study on Antifungal Activity of Essential Oil. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8(10), 1369-1373.
- Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*. 31(1), 85-86.
- Taroco, R., Seija, V., & Vignoli, R. (2006). Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de Bacteriología y Virología Médica. Oficina del libro FEFMUR*, 36(1), 665-668.
- Tirado-Gallego, P., Lopera-Álvarez, A., & Ríos-Osorio, L. (2016). Estrategias de control de *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* en *Theobroma cacao* L.: revisión sistemática TT - Strategies for Control of *Moniliophthora roreri* and *Moniliophthora perniciosa* in *Theobroma cacao* L.: A Systematic Review TT - Es. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 417-430.
- Tohidi, B., Rahimmalek, M., Arzani, A., & Trindade, H. (2020). Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene. *Phytochemistry* 169, 112126.
- Türkmen, M., Kara, M., Maral, H., & Soylu, S. (2021). Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Food Processing and Preservation*, e15787.
- Valencia-Avilés, E., Ignacio-Figueroa, I., Sosa-Martínez, E., Bartolomé-Camacho, M., Martínez-Flores, H., & García-Pérez, M. (2017). Polifenoles: propiedades antioxidantes y toxicológicas. *Revista de la Facultad de Ciencias Químicas*, 15-29.
- Velásquez, E. B. (2019). *Biodiversidad en el Ecuador*. Cuenca: Editorial Universitaria Abya-Yala.

- Vendramini Marini, G. A. (2019). Caracteres morfológicos y dinámica microbiana en la propagación vegetativa orgánica de orégano cv. Don Bastías. *Departamento de Agronomía. Universidad Nacional del Sur.*, 15-30.
- Villaplana, R., Pérez-Revelo, K., & Valencia- Chamorro, S. (2018). Essential oils as an alternative postharvest treatment to control fusariosis, caused by *Fusarium verticillioides*, in fresh pineapples (*Ananas comosus*). *Scientia Horticulturae*, 238, 255-263.
- Vijayakumar, R., & Raja, S. (2018). *Secondary Metabolites: Sources and Applications*. Londres: BoD–Books on Demand.
- Wang, L. H., Wang, M. S., Zeng, X. A., Zhang, Z. H., Gong, D. M., & Huang, Y. B. (2016). Membrane Destruction and DNA Binding of *Staphylococcus aureus* Cells Induced by Carvacrol and Its Combined Effect with a Pulsed Electric Field. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(32), 6355-6363.
- Young Living. (31 de enero de 2022). *Aceite de Tomillo*. Obtenido de https://www.youngliving.com/es_ec/products/aceite-esencial-de-tomillo-thyme

APÉNDICE

APÉNDICE A

A.1 Ecuaciones para rendimiento de aceites esenciales

$\%R$: Rendimiento porcentual

C_{aep} : Cantidad de aceite esencial producido

C_{mv} : Cantidad de material vegetal utilizada

$$\%R = \frac{C_{aep}}{C_{mv}} \times 100\%$$

A.2 Ecuaciones para rendimiento de extractos naturales

$\%R$: Rendimiento porcentual

C_{aep} : Cantidad de extracto producido

C_{mv} : Cantidad de solvente utilizado

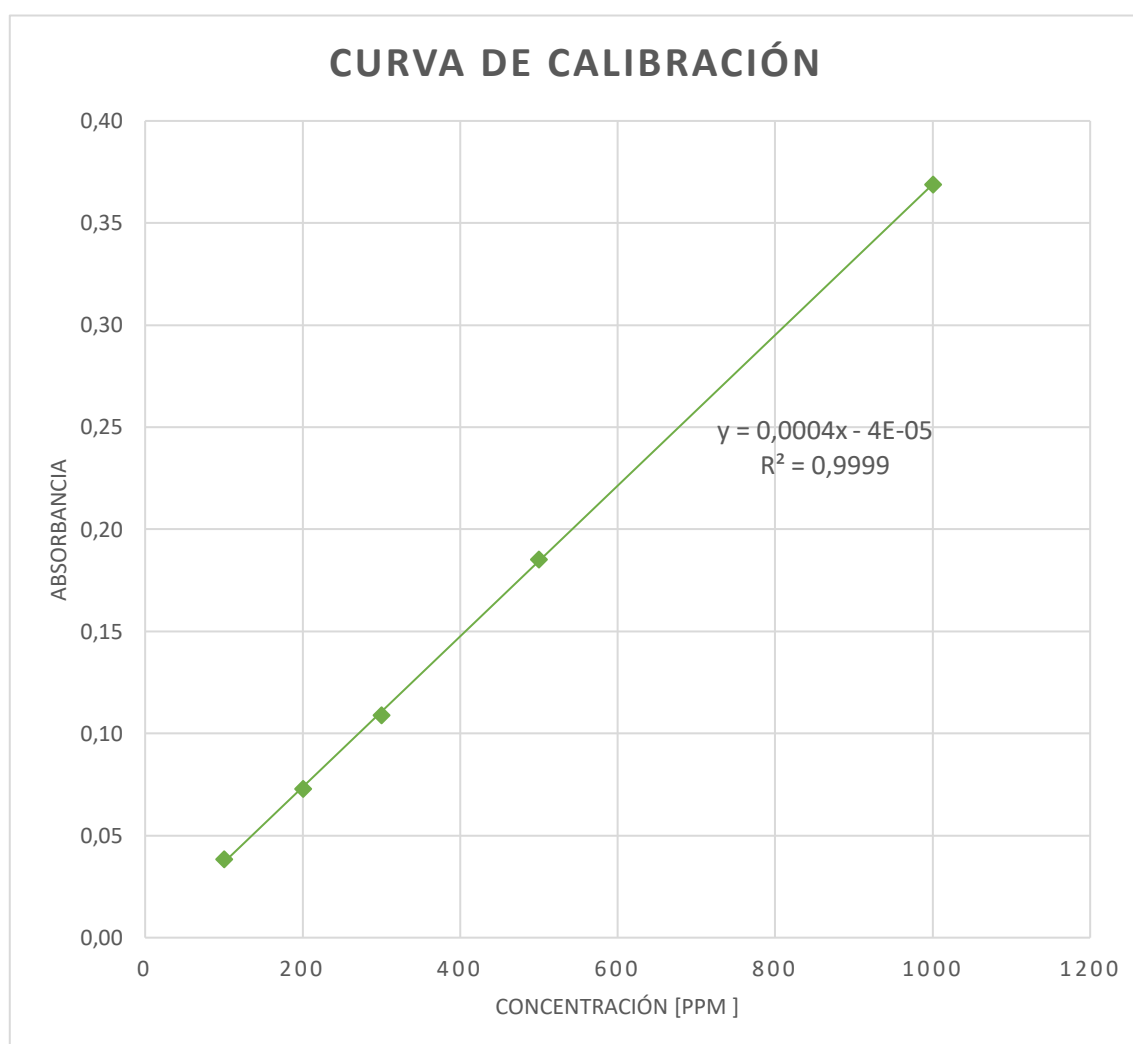
$$\%R = \frac{C_{ep}}{C_s} \times 100\%$$

APÉNDICE B

Apéndice B. 1 Absorbancia a distintas concentraciones del reactivo estándar para la curva de calibración

Concentración de soluciones de ácido gálico (ppm)	Absorbancia			
	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Promedio
100	0,036	0,04	0,039	0,04
200	0,072	0,073	0,074	0,07
300	0,112	0,107	0,108	0,11
500	0,18	0,187	0,189	0,19
1000	0,359	0,377	0,371	0,37

Apéndice B. 2 Curva de calibración



Apéndice B. 3 Absorbancia de las muestras con el reactivo de Folin-Ciocalteu

Muestra	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia 3
Aceite esencial de Orégano S*	0,272	0,271	0,270
Aceite esencial de Orégano C*	1,088	1,088	1,079
Aceite esencial de Tomillo	1,061	1,049	1,059
Extracto de Albahaca	2,037	2,034	2,013
Extracto de ajo	0,476	0,469	0,476
Extracto de cáscaras de cacao	3,379	3,399	3,395
Extracto de Laritaco	0,267	0,258	0,245

Apéndice B. 4 Concentraciones de compuestos fenólicos de las muestras expresadas en equivalentes de ácido gálico

Muestra	Concentración 1 (ppm)	Concentración 2 (ppm)	Concentración 3 (ppm)
Aceite esencial de Orégano S*	680	678	675
Aceite esencial de Orégano C*	2720	2720	2698
Aceite esencial de Tomillo	2653	2623	2648
Extracto de Albahaca	5092	5084	5032
Extracto de ajo	1189	1172	1189
Extracto de cáscaras de cacao	8447	8497	8487
Extracto de Laritaco	667	644	612

APÉNDICE C

Apéndice C. 1 Certificado de identificación de especies



Cuenca, 5 de enero de 2022

La suscrita, Raffaella Ansaloni, directora del Herbario Azuay de la Universidad del Azuay, por petición de las interesadas

CERTIFICA

Que, luego de la respectiva revisión, las plantas empleadas para la Tesis de Grado de las señoritas **Karen Maricela Segovia Loor y Marcela Denisse Muzzio Villafuerte**, titulada "*Bioprospección de especies con actividad antimicrobiana In vitro contra patógenos de cacao y banano*" se han identificado de la siguiente manera.

Nombre común: Albahaca

***Ocimum basilicum* L.** de la familia botánica Lamiaceae

Nombre común: Tomillo

***Thymus vulgaris* L.** de la familia botánica Lamiaceae

Nombre común: Orégano

***Origanum vulgare* L.** de la familia botánica Lamiaceae

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Raffaella Ansaloni'.

Raffaella Ansaloni, PhD.
Directora del Herbario Azuay
Universidad del Azuay
Email: ransaloni@uazuay.edu.ec
<https://herbario.uazuay.edu.ec/>

