



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

**SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**POTENCIAL BIOFUNGICIDA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE  
*COMMELINA DIFFUSA* CONTRA *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS*, AGENTE  
CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN EL CULTIVO DE BANANO**

*Trabajo de titulación previo a la  
obtención del título de Ingeniera en Biotecnología*

**AUTORES:**

NICOLE ALEXANDRA NAVAS SANCÁN

PAULA DOMÉNICA JARRÍN RODRÍGUEZ

**TUTORES:**

MSc. NELLY LORENA PULGAR OLEAS

PhD. JOAN RAMÓN VERA VILLALOBOS

**GUAYAQUIL – ECUADOR**

**2024**

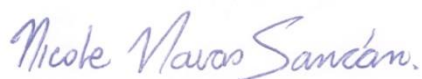
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Nosotros, **Nicole Alexandra Navas Sancán** con documento de identificación N° 0930614508 y **Paula Doménica Jarrín Rodríguez** con documento de identificación N° 0924668197; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024

Atentamente,



---

Nicole Alexandra Navas Sancán

CI: 0930614508



---

Paula Doménica Jarrín Rodríguez

CI: 0924668197

## **CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, **Nicole Alexandra Navas Sancán** con documento de identificación N° 0930614508 y **Paula Doménica Jarrín Rodríguez** con documento de identificación N° 0924668197, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **“POTENCIAL BIOFUNGICIDA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *COMMELINA DIFFUSA* CONTRA *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN EL CULTIVO DE BANANO”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024

Atentamente,

---

Nicole Alexandra Navas Sancán

CI: 0930614508

---

Paula Doménica Jarrín Rodríguez

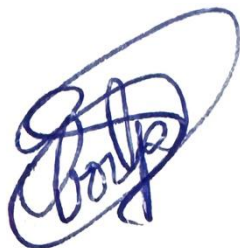
CI: 0924668197

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Nelly Lorena Pulgar Oleas** con documento de identificación N° 0602420911, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“POTENCIAL BIOFUNGICIDA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *COMMELINA DIFFUSA* CONTRA *MYCOSPHAERELLA FIJENSIS*, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN EL CULTIVO DE BANANO”**, realizado por **Nicole Alexandra Navas Sancán** con documento de identificación N° 0930614508 y **Paula Doménica Jarrín Rodríguez** con documento de identificación N° 0924668197, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024

Atentamente,



---

Ing. Nelly Lorena Pulgar Oleas MSc.


CI: 0602420911

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Joan Ramón Vera Villalobos** con documento de identificación N° 0961323763, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“POTENCIAL BIOFUNGICIDA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE *COMMELINA DIFFUSA* CONTRA *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS*, AGENTE CAUSAL DE LA SIGATOKA NEGRA EN EL CULTIVO DE BANANO”**, realizado por **Nicole Alexandra Navas Sancán** con documento de identificación N° 0930614508 y **Paula Doménica Jarrín Rodríguez** con documento de identificación N° 0924668197, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 30 de agosto del año 2024

Atentamente,



---

Ing. Joan Ramón Vera Villalobos PhD.

CI: 0961323763

## **DEDICATORIA NICOLE**

Antes de nada, quiero expresar mi gratitud a Dios, a él debo la serenidad y la sabiduría que me han permitido llegar hasta aquí.

A mis padres, quienes han sido los pilares fundamentales sobre los que he construido mis sueños, y fortalezas.

A mi papá, le debo no solo el ejemplo de su incansable trabajo, sino también la certeza de su amor constante.

A mí mamita y su fe en mí, por amarme, enseñarme y apoyarme incluso en los momentos en que yo misma dudaba. Ella ha sido mi más grande admiración y el ancla que me ha mantenido firme en medio del caos.

Que, aunque ya no estén físicamente conmigo, siguen presente en mi vida con un amor que trasciende lo material.

A mi madre, a quien le debo la vida y más, que siempre ha confiado en mí desde el principio, brindándome un amor incondicional que ha sido fundamental en mi vida. Su fe, disposición y trabajo ha sido lo que me ha permitido llegar tan lejos. Les debo mucho más de lo que las palabras puedan expresar.

Finalmente, a todas las personas que he tenido el privilegio de conocer a lo largo de estos años, ya sea al comenzar este viaje o al finalizarlo, les agradezco sinceramente. Cada uno de ustedes ha contribuido de distintas maneras a esta experiencia invaluable. Aunque algunos ya no estén presentes en mi vida, su influencia y apoyo dejaron una huella. Les deseo una vida plena y llena de amor, mis mejores éxitos y triunfos para el futuro.

## **DEDICATORIA PAULA**

Esta tesis va dedicada a mis seres queridos y amigos, los cuales me han ayudado siempre a seguir adelante.

Agradezco a mi padre, con su constante aliento para que siga adelante y no me desanime por nada. Su apoyo y sacrificio han hecho posible mi educación universitaria.

A mi abuela Nelly, mi compañera de vida, agradezco por todo su amor brindado y preocupación por mí.

A mi madre, por darme ánimos y presumirme con sus compañeros de que tendrá una hija Ingeniera.

A mi hermana chiquita, Aylén, por ser motivo de mi felicidad, su amor y ocurrencias hacen que me olvide de los malos momentos.

A Miguel Castillo, mi mejor amigo, el que me escribe todos los días para saber cómo estoy, el que contándole mis problemas y miedos me da consejos o trata de hacer algo para animarme, su aliento me ha motivado a continuar este proceso.

A mis amigas Valita y Mapa, quienes con sus locuras me sacan una sonrisa, ellas, que me ayudan a despejarme del estrés.

A Valeria Vélez, mi amiga incondicional, la única que ha sido capaz de escucharme mis 10 minutos de audio por WhatsApp, a pesar de no vernos seguido, ella siempre está.

A mis mejores amigas Jenny, Isabel, y Sofia, gracias por darme felicidad, en los pocos momentos del año que nos vemos son mi motivo para vivir.

A Nicole, mi compañera de tesis, por ser esa amiga que te escucha y trata de dar los mejores consejos. A pesar de que a veces le quiero jalar las orejas y ella las mías, nunca falta su preocupación por mí.

Agradezco a mis amigos que he conocido por la vida, Jonathan, Mapusa, Saul, Peñaflu, Robert, Cesar, Roger, Juan, Emilio, María, Johannes, Jordan, Ámbar, Oscar, gracias por darme su cariño y regalarme momentos inolvidables.

Por último, pero no menos importante a Víctor, por darme la fuerza que necesito todos los días, por estar ahí en mis peores momentos, por darme la atención que necesito, por sus cariños y sobre todo su comprensión.



## AGRADECIMIENTO

Quisiéramos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas las personas e instituciones que han contribuido al desarrollo de esta tesis.

En primer lugar, agradecemos profundamente a la MSc. Nelly Pulgar, cuyo apoyo, orientación y conocimientos han sido fundamentales durante todo el proceso de investigación.

También quisiéramos expresar nuestra gratitud al MSc. Kevin Cedeño, porque además de ser nuestro profesor, es nuestro amigo...

Al PhD. Joan Vera, por su valiosa colaboración y por compartir su experiencia y sabiduría, lo cual ha enriquecido significativamente este trabajo. Su dedicación y entusiasmo por la ciencia han sido una fuente constante de inspiración.

Nuestros agradecimientos se extienden a la Universidad Politécnica Salesiana y a la Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL), por proporcionar un entorno académico excepcional y los recursos necesarios para llevar a cabo esta investigación.

Asimismo, agradecemos el apoyo recibido a través del proyecto de fitoquímica, el cual ha sido crucial para el desarrollo de esta tesis, y por último, pero no menos importante al MSc. Jaime Naranjo por su paciencia y siempre buena disposición.

Finalmente, agradecemos a nuestras familias y amigos por su comprensión y apoyo incondicional a lo largo de esta experiencia.

## RESUMEN

Ecuador cuenta con su gran diversidad biológica, una amplia gama de tipos de animales y plantas. Entre ellas, *Commelina diffusa* Burm. f., perteneciente a la familia Commelinaceae se destaca por sus posibles propiedades beneficiosas. *Mycosphaerella fijiensis*, el patógeno responsable de la Sigatoka Negra, que daña gravemente las plantaciones de banano en Ecuador y otros lugares del mundo, causa pérdidas significativas anualmente. La enfermedad provoca rayas necróticas en las hojas, reduciendo la capacidad fotosintética y disminuyendo el rendimiento de los cultivos. El banano ecuatoriano representa gran consumo a escala mundial, impactando directamente a millones de personas. Bajo los antecedentes *Commelina diffusa* ha sido estudiada por sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, analgésicas y nutracéuticas. La finalidad del estudio es determinar si el extracto de *C. Diffusa* posee propiedades antimicrobianas y antifúngicas suficientes para desarrollar un bioproducto eficaz contra la Sigatoka Negra, ofreciendo una solución natural y sostenible para el control del patógeno. Se comenzó con la identificación de la planta, herborización y obtención del extracto vegetal, además se realizaron análisis fitoquímicos para evaluar los componentes presentes en el extracto orgánico de *C. diffusa*, los ensayos de Mayer y Wagner detectaron alcaloides, mientras que Dragendorff y Hager resultaron negativos, para flavonoides las pruebas de Shinoda y Ácido Sulfúrico confirmaron la presencia de flavonas y flavononas, validando resultados de investigaciones anteriores, se evaluó también la capacidad inhibitoria del extracto orgánico de *C. diffusa* frente a *Mycosphaerella fijiensis* mediante la técnica de microdilución *in vitro* en placa multipocillos, su implementación sigue las estandarizaciones El Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI) y El Comité Europeo sobre Pruebas de Susceptibilidad a los Antimicrobianos (EUCAST), la cual mostró ciertas limitaciones para este tipo de microorganismos, sin embargo se seguirá investigando al respecto.

**Palabras Clave:** *Commelina diffusa*, *Mycosphaerella fijiensis*, tamizaje fitoquímico, microdilución *in vitro* en placa multipocillo.

## ABSTRACT

Ecuador is known for its rich biological diversity, encompassing a wide range of animal and plant species. Among these, *Commelina diffusa* Burm. f., a member of the Commelinaceae family, stands out for its potential beneficial properties. *Mycosphaerella fijiensis*, the pathogen responsible for Black Sigatoka, severely damages banana plantations in Ecuador and other parts of the world, causing significant annual losses. The disease induces necrotic streaks on leaves, reducing photosynthetic capacity and decreasing crop yield. Ecuadorian bananas are widely consumed on a global scale, directly impacting millions of people. Given this background, *Commelina diffusa* has been studied for its antioxidant, antibacterial, analgesic, and nutraceutical properties. The aim of this study is to determine whether the extract of *C. diffusa* possesses sufficient antimicrobial and antifungal properties to develop an effective bioproduct against Black Sigatoka, offering a natural and sustainable solution for controlling the pathogen. The study began with the identification of the plant, herbarium preparation, and extraction of the plant material. Phytochemical analyses were also conducted to assess the components present in the organic extract of *C. diffusa*. Mayer and Wagner assays detected alkaloids, while Dragendorff and Hager tests were negative. For flavonoids, the Shinoda and Sulfuric Acid tests confirmed the presence of flavones and flavanones, validating previous research findings. The inhibitory capacity of the organic extract of *C. diffusa* against *Mycosphaerella fijiensis* was evaluated using the *in vitro* microdilution technique in multi-well plates, following the standards of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Although the method showed certain limitations for this type of microorganism, further research will be conducted.

**Keywords:** *Commelina diffusa*, *Mycosphaerella fijiensis*, phytochemical screening, *in vitro* microdilution in multi-well plate.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Planteamiento del problema.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Justificación .....</b>	<b>4</b>
<b>1.4 Objetivos .....</b>	<b>5</b>
1.4.1 Objetivo General .....	5
1.4.2 Objetivos Específicos.....	5
<b>1.5 Hipótesis .....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO II. ....</b>	<b>6</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Género Commelina.....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Commelina diffusa Burm.f.....	8
2.1.2 Taxonomía Commelina diffusa Burm.f. ....	11
2.1.3 Propiedades Commelina diffusa Burm. f.....	11
<b>2.2 Banano (Musa paradisiaca L.).....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Taxonomía del Banano .....	17
2.2.2 Fases fenológicas del banano.....	18
2.2.3 Producción bananera .....	19
<b>2.3 Sigatoka negra .....</b>	<b>21</b>
2.3.1 Clasificación taxonómica de la Sigatoka negra .....	22

2.3.2 <i>Afectación en los cultivos a nivel mundial</i> .....	23
2.3.3 <i>Afectación en los cultivos a nivel nacional</i> .....	24
<b>2.4 <i>Sintomatología de la enfermedad</i></b> .....	<b>26</b>
<b>2.5 <i>Reproducción del patógeno</i></b> .....	<b>27</b>
<b>2.6 <i>Actividad antifúngica</i></b> .....	<b>28</b>
<b>2.7 <i>Controles biológicos contra la Sigatoka negra</i></b> .....	<b>30</b>
2.7.1 <i>Extractos vegetales</i> .....	32
2.7.2 <i>Obtención de extractos vegetales</i> .....	33
<b>CAPÍTULO III.</b> .....	<b>35</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>3.1 <i>Diseño experimental</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.2 <i>Búsqueda bibliográfica</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.3 <i>Zona de estudio</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.4 <i>Herborización e identificación</i></b> .....	<b>37</b>
<b>3.5 <i>Secado y molienda</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.6 <i>Extracción y filtrado</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.7 <i>Extracción de solventes</i></b> .....	<b>39</b>
<b>3.8 <i>Purificación del extracto orgánico</i></b> .....	<b>40</b>
<b>3.9 <i>Liofilización</i></b> .....	<b>41</b>
<b>3.10 <i>Tamizaje fitoquímico</i></b> .....	<b>42</b>
3.10.1 <i>Prueba de alcaloides</i> .....	42
3.10.2 <i>Prueba de saponinas</i> .....	43

3.10.3 Prueba de lactonas sesquiterpénicas .....	43
3.10.4 Prueba de flavonoides .....	44
3.10.5 Prueba de cumarinas .....	45
3.10.6 Prueba de carbohidratos .....	45
<b>3.11 Microdilución in vitro en placa multipocillo .....</b>	<b>46</b>
3.11.1 Preparación del medio TSB.....	46
3.11.2 Inoculación del hongo .....	46
3.11.3 Preparación de Controles .....	47
3.11.4 Preparación del colorante TTC.....	47
3.11.5 Estandarización del inóculo .....	47
3.11.6 Inoculación en placa multipocillo .....	48
3.11.7 Lectura de microplaca.....	49
<b>CAPÍTULO IV. ....</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 Resultados .....</b>	<b>51</b>
4.1.1 Tamizaje fitoquímico .....	51
4.1.2 Microdilución in vitro en placa multipocillos .....	56
<b>4.2 Discusiones .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>60</b>
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1 Conclusiones .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 Recomendaciones .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO VI. ....</b>	<b>62</b>

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 62**

***ANEXOS* ..... 73**

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Ciclo del cultivo de banano.....	18
<b>Figura 2</b> Estádíos de desarrollo de la Sigatoka negra ( <i>Mycosphaerella fijiensis</i> ) .....	27
<b>Figura 3.</b> Coordenadas de la especie vegetal recolectada.....	36
<b>Figura 5.</b> Herborización de la especie vegetal <i>Commelina diffusa</i> .....	37
<b>Figura 4.</b> Recolección de la especie vegetal <i>Commelina diffusa</i> .....	37
<b>Figura 6.</b> Extracción de extracto orgánico.....	40
<b>Figura 7.</b> Protocolo de microdilución en placa multipocillos.....	48
<b>Figura 8.</b> Diseño experimental para la maquina multiskan FC .....	49
<b>Figura 9.</b> Resultados de alcaloides .....	52
<b>Figura 10.</b> Resultados de saponinas.....	52
<b>Figura 11.</b> Resultados de lactonas sesquiterpénicas .....	53
<b>Figura 12.</b> Resultados de flavonoides.....	54
<b>Figura 13.</b> Resultados de cumarinas .....	55
<b>Figura 14.</b> Resultados de carbohidratos.....	55
<b>Figura 15.</b> Resultados de microdilución <i>in vitro</i> en placa multipocillo .....	56



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica de <i>Commelina diffusa</i> Burm. f.....	11
<b>Tabla 2.</b> Clasificación científica de <i>Musa paradisiaca</i> L. ....	17
<b>Tabla 3.</b> Clasificación taxonómica de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	22
<b>Tabla 4.</b> Clasificación del metabolito secundario flavonoides con prueba Shinoda ....	44
<b>Tabla 5.</b> Clasificación del metabolito secundario flavonoides con prueba de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ...	44
<b>Tabla 6.</b> Clasificación del metabolito secundario flavonoides con prueba de Zinc .....	45
<b>Tabla 7.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito alcaloide realizado al extracto orgánico de las hojas de <i>Commelina diffusa</i> .....	51
<b>Tabla 8.</b> Resultados tamizaje fitoquímico del metabolito saponina realizado al extracto orgánico de la hoja de <i>Commelina diffusa</i> .....	52
<b>Tabla 9.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico para lactonas sesquiterpénicas y aglicona esteroideal del extracto orgánico de las hojas de <i>Commelina diffusa</i> .....	53
<b>Tabla 10.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito flavonoide realizado al extracto orgánico de las hojas de <i>Commelina diffusa</i> .....	53
<b>Tabla 11.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito cumarina realizado al extracto orgánico de las hojas de <i>Commelina diffusa</i> .....	54
<b>Tabla 12.</b> Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito carbohidrato realizado al extracto orgánico de las hojas de <i>Commelina diffusa</i> .....	55

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Recolección y herborización de <i>Commelina diffusa</i> .....	<b>73</b>
<b>Anexo 2.</b> Secado y molienda de <i>Commelina diffusa</i> .....	<b>73</b>
<b>Anexo 3.</b> Filtración al vacío de la especie vegetal .....	<b>73</b>
<b>Anexo 4.</b> Limpieza de rotavapor y extracción de solventes.....	<b>74</b>
<b>Anexo 5.</b> Montaje de columna VLC para cromatografía líquida al vacío .....	<b>74</b>
<b>Anexo 6.</b> Liofilización de la especie <i>Commelina diffusa</i> .....	<b>75</b>
<b>Anexo 7.</b> Tamizaje fitoquímico.....	<b>75</b>
<b>Anexo 8.</b> Observación macroscópica del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....	<b>76</b>
<b>Anexo 9.</b> Preparación de materiales para microdilución en pocillos .....	<b>76</b>

# CAPÍTULO I.

## ANTECEDENTES

### ***1.1 Introducción***

Ecuador es un país reconocido por su amplia variedad de especies vegetales y animales, tiene una notable diversidad de plantas vasculares endémicas, aproximadamente el 26 % (Ulloa et al., 2017). En el presente estudio, nos concentramos en su flora, para ser más específicos en la especie vegetal *Commelina diffusa* Burm. f. perteneciente a la familia de las Commelinaceae. Como se mencionó anteriormente, tenemos un país el cual debería ser explorado por la ciencia, la naturaleza nos brinda una infinidad de especies que no han sido investigadas del todo, es ahí donde entra nuestra labor de indagar acerca del género *Commelina*, sus propiedades, metabolitos, etc., con el fin de analizar si su extracto orgánico presenta acción antifúngica contra el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis* conocido por su nombre común Sigatoka Negra.

Asimismo, Ecuador es un país productor cuya gran parte de su economía siempre ha dependido de la exportación de distintos productos, como el café, flores, cacao y banano. Alrededor de una quinta parte de la producción mundial de banano está destinada a los mercados globales. En Ecuador, las provincias costeras de El Oro, Guayas y Los Ríos son las más importantes en la producción de banano, con una participación del 41%, 34%, 16%, respectivamente. El 42% de los pequeños productores de banano del país se encuentran en la provincia de El Oro, mientras que los grandes productores se encuentran principalmente en las provincias de Guayas y Los Ríos (COMEX, 2017).

La producción de musáceas es el primer rubro no petrolero de importancia económica para el país. Alrededor de 268.410 hectáreas de plantaciones de musáceas se encuentran en Ecuador, de las cuales el 95% se exporta y se distribuye en 43 mercados globales. Por lo tanto, el banano ecuatoriano representa aproximadamente el 30% del consumo mundial. Esta actividad tiene un impacto directo e indirecto en alrededor de 2,5 millones de personas (Agrocalidad, 2018).

Nuestro objetivo es analizar las hojas de la especie vegetal *Commelina diffusa* Burm. f. de la familia de las Commelinaceae, y verificar que esta especie tenga potencial para combatir la Sigatoka Negra de una forma natural y no perjudicial para la salud de los agricultores y consumidores. La especie vegetal *C. diffusa* Burm. f. ha sido estudiada previamente para analizar sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, nutracéuticas, analgésicas, entre otros.

En un estudio realizado acerca de las actividades antioxidantes, analgésicas y depresoras del sistema nervioso central de la planta *Commelina diffusa*, Islam et al. (2021) indicaron la presencia de varios metabolitos secundarios mediante screening fitoquímico, se detectaron flavonoides, flobataninos y esteroides en todas las fracciones. Asimismo, en este estudio se determinó que el extracto etanólico crudo, así como las fracciones mencionadas, exhibieron una actividad antioxidante que varió de leve a moderada en el ensayo de eliminación de radicales libres DPPH. La mayoría de las fracciones, junto con los extractos crudos, también mostraron una notable actividad depresora del sistema nervioso central (Islam et al., 2021).

Por otro lado, en una evaluación de las propiedades fitoquímicas y antimicrobianas de *Commelina diffusa* se concluyó que los extractos de partes aéreas de la planta pueden ser útiles como agentes antimicrobianos como medicina natural para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas (M. A. A. Khan et al., 2011). De la misma forma, según estudios previos; *C. diffusa* mostró una buena actividad antimicrobiana contra una variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como contra hongos (M. A. A. Khan et al., 2011).

No obstante, investigaciones nutracéuticas de *Commelina diffusa* revelan que sus hojas representan valiosas fuentes de nutrientes, incluyendo diversos macro y micronutrientes esenciales para la salud humana, se sabe la importancia de estos nutrientes para un metabolismo óptimo y el mantenimiento de un buen estado fisiológico tanto en seres humanos como en animales (Kamble, 2019).

## ***1.2 Planteamiento del problema***

Sabemos que existen diversos fitopatógenos, que causan daños y grandes pérdidas en las plantaciones de banano, y por consiguiente se perjudica la economía del país. En este caso se trabajará con el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, cuyo nombre común es Sigatoka Negra. Este fitopatógeno ha causado pérdidas en plantaciones de banano, no solo del Ecuador sino alrededor del mundo (Ploetz, 2001). Esta enfermedad produce rayas necróticas en las hojas, pérdida de la capacidad fotosintética y reducción del rendimiento (Churchill, 2010). El patógeno se reproduce tanto sexual como asexualmente, actualmente está controlado por un régimen intenso de fungicidas que es motivo de preocupación tanto por razones económicas como ambientales (Noar et al., 2022).

Por consiguiente, se necesita del uso de pesticidas para combatir el desarrollo de distintos fitopatógenos, sin embargo, los pesticidas son sustancias orgánicas e inorgánicas dañinas que se utilizan para eliminar o restringir la proliferación de organismos dañinos. Como lo mencionan B. A. Khan et al. (2023) en un principio, los plaguicidas se utilizaron para mejorar la vida humana, aumentar la producción agrícola e intentar prevenir las infecciones bacterianas, pero ahora sus efectos negativos superan los positivos. Se ha producido un aumento de plagas y enfermedades resistentes, una pérdida de criaturas beneficiosas para el ecosistema, cambios en la diversidad microbiana del suelo, polinizadores, lombrices de tierra y contaminación de ecosistemas acuáticos y aéreos (B. A. Khan et al., 2023).

En consecuencia, a esto, se han buscado soluciones más sostenibles para el medio ambiente y menos dañinas para la salud humana; los biopesticidas son una de estas alternativas. Los objetivos de los bioplaguicidas pueden ser plantas, microbios, vertebrados o invertebrados, aunque se emplean muchos agentes activos, el fundamento del término bioplaguicida radica en que el agente activo es de origen biológico y no sintético. Un bioplaguicida es una formulación que emplea la capacidad plaguicida de un agente natural. Debido a que abordan simultáneamente los intereses de la silvicultura, la agricultura y el sector industrial, los biopesticidas ofrecen un gran potencial para su uso

en la agricultura sostenible; son un excelente sustituto de la protección química de los cultivos (Nollet & Mir, 2023).

Nuestro objetivo es analizar las hojas de la especie vegetal *Commelina diffusa* Burm. f. de la familia de las Commelinaceae, y verificar que esta especie tenga potencial para combatir la Sigatoka Negra de una forma natural y no perjudicial para la salud de los agricultores y consumidores. La especie vegetal *C. diffusa* Burm. f. ha sido estudiada previamente para analizar sus propiedades antioxidantes, antibacterianas, nutraceuticas, analgésicas, entre otros.

### **1.3 Justificación**

Actualmente los cultivos de banano son afectados por distintos patógenos, entre ellos *Mycosphaerella fijiensis*, el cual causa necrosis en las hojas de las plantas, debido a esto se usan pesticidas con el fin de erradicar la presencia del patógeno, sin embargo, estos patógenos al pasar el tiempo han desarrollado resistencia frente a distintos pesticidas que habitualmente son de origen químico.

Los patógenos afectan la economía del país, al igual que la calidad de sus plantaciones y productos, el uso desmedido de estos pesticidas afecta directamente a quienes trabajan en las plantaciones y a quienes habitan a sus alrededores y consumen el producto.

Se estudiará la especie vegetal *Commelina diffusa* con el propósito de encontrar entre sus propiedades metabolitos secundarios que mitigue el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*, para ello hemos realizado una búsqueda bibliográfica donde se ha evidenciado que las hojas de la especie vegetal *Commelina diffusa* cuenta con distintas propiedades como antibacterianas y antifúngicos a diferencia de otros órganos de la planta.

Una vez obtenido el extracto de nuestra planta pasará por distintos procesos para determinar sus propiedades y si evidenciar su actividad biológica frente a este patógeno, de ser así este podría ser el compuesto principal para un futuro biopesticida contra la Sigatoka Negra que afecta en su gran mayoría a plantaciones de banano, no solo en el país, sino a nivel mundial. De forma que tendríamos un producto amigable y biodegradable.

## **1.4 Objetivos**

### *1.4.1 Objetivo General*

- Evaluar la actividad biológica del extracto orgánico de la especie vegetal *Commelina Diffusa* sobre el microorganismo *Mycosphaerella fijiensis*.

### *1.4.2 Objetivos Específicos*

- Obtener el extracto orgánico a través de cromatografía líquida al vacío de las hojas de la especie *Commelina diffusa*.
- Caracterizar el perfil fitoquímico del extracto orgánico de las hojas de la especie vegetal *Commelina diffusa*.
- Evaluar la actividad biológica del extracto orgánico de las hojas de la especie vegetal *Commelina diffusa* sobre *Mycosphaerella fijiensis* mediante la técnica de microdilución en placa *in vitro*.

## **1.5 Hipótesis**

Ho: El extracto orgánico de la especie vegetal *Commelina diffusa* no presenta acción antifúngica contra el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*.

Ha: El extracto orgánico de la especie vegetal *Commelina diffusa* presenta acción antifúngica contra el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*.

## CAPÍTULO II.

### MARCO TEÓRICO

#### *2.1 Género Commelina*

El género *Commelina* tiene más de 200 especies perteneciente a la familia Commelinaceae. Dicho género se conoce comúnmente como flores de día y flores de araña debido a la secreción filiforme que surge cuando se corta el tallo y al breve periodo de floración. Se encuentran en zonas templadas cálidas, subtropicales y tropicales de África y Asia, asimismo, ha sido naturalizado en América del Norte y América del Sur (Tadege et al., 2023).

México, el sur de América Central, África tropical, Tailandia y el suroeste de China son los principales centros de diversidad de la familia Commelinaceae. La familia Commelinaceae es diversa desde un punto de vista ecológico. Se encuentran principalmente en ambientes húmedos y ácidos, como bosques y praderas (Gajurel & Shrestha, 2009).

Los miembros del género *Commelina* suelen ser terrestres y arbustivos. La mayoría son perennes, sin embargo, algunos son anuales. Con respecto a su morfología, las raíces son fibrosas, a excepción de *Commelina maculada* y *Commelina suffruticosa*, que cuentan con raíces tuberosas. Casi todos los géneros y especies de *Commelina* tienen tallos alargados, redondeados y sólidos y los nudos están hinchados o quebradizos. Las vainas están cerradas y las hojas son simples, caulinares, espirales, pecioladas y envainadas en la base (Gajurel & Shrestha, 2009).

Las flores son actinomorfas o zigomorfas estaminadas y tienen una reproducción bisexual, su color usualmente es azul, aunque se presentan variaciones de flores que van desde un azul profundo hasta el azul tenue. Es importante recalcar que el color de sus flores varía dependiendo de las condiciones donde se encuentre la planta, ya que su pH se altera y este se ve reflejado en el color de las hojas. El fruto del género *Commelina* es



una cápsula y puede tener varias formas, desde oblonga, elíptica a obovoide, sus semillas son cilíndricas, reticuladas y cuentan con un hilio lineal (Gajurel & Shrestha, 2009).

Inflorescencias terminales o terminales y axilares, en algunos géneros todas axilares y perforantes de las vainas, generalmente tienen un tirso en forma de panícula con varias a muchas ramas helicoidales, a veces reducidas a un solo cenceño o, raramente, una sola flor, y a veces están encerradas o estrechamente subtendidas por una bráctea frondosa (Faden, 1998).

K. Wilson y Morrison (2000) mencionan que en *Commelina*, la inflorescencia tiene dos cimas como máximo, una dentro de la espata y la otra, cuando está completamente desarrollada, sale de la espata. La cima que emerge a menudo da como resultado una sola flor masculina, como es el caso de *C. benghalensis* L. Las flores pueden ser todas masculinas, *C. hockii* De Wild. O una mezcla de flores masculinas y bisexuales como es el caso de *C. diffusa* Burm. f. La cima encerrada produce flores completamente bisexuales o bisexuales y masculinas.

Existen tres especies principales de la familia Commelinaceae, género *Commelina*, *C. benghalensis* L. *C. diffusa* Burm.f., *C. nudiflora* Linn, pueden comportarse como perennes en tierras bajas tropicales y subtropicales, pero como anuales en zonas templadas, se encuentran en tierras desde el nivel del mar hasta los 2500 metros de altura sobre el nivel del mar (Wilson, 1981).

Algunas especies de *Commelina*, como *C. diffusa* Burm.f. y *C. benghalensis* L., se emplean para usos medicinales y comestibles (Wang et al., 2023). Las hojas y el tallo de *C. diffusa* Burm.f. son usados para tratar picaduras de insectos, serpientes, chinches, afecciones de garganta, aliviar enfermedades de la piel como dermatitis, infecciones del tracto urinario, útero irritado, hemorroides, entre otras afecciones (Vu et al., 2023). Asimismo, *C. benghalensis* es usada para tratar mordeduras de serpiente, fiebre, dolor de cabeza, candidiasis bucal, enfermedad mental, cicatrizar heridas, infertilidad en mujeres, dolor de garganta, problemas oculares, entre otros (Ibrahim et al., 2010).

No está demás mencionar que aquellas dos especies no son las únicas del género *Commelina* con propiedades medicinales, por ejemplo, *C. communis* L. también trata los

dolores de garganta, amigdalitis, infecciones urinarias, diabetes mellitus (Youn et al., 2004). *C. nudiflora* L. es usada para curar heridas de la circuncisión, *C. coelestis* para tratar la diarrea (Zavala et al., 1998), *C. erecta* L. para el dolor de garganta, problemas oculares, dermatológicos, infertilidad femenina, diabetes (Cavichi et al., 2023). *C. latifolia* previene el dolor provocado por heridas, al igual que *C. africana* la cual su macerado se usa para picaduras, quemaduras, erupciones cutáneas (Tadege et al., 2023).

Se observa una similitud con respecto a las aplicaciones medicinales de estas especies, podría decirse que en general que las especies del género *Commelina*, tratan distintas dolencias de la garganta, daños en la piel, infertilidad, problemas oculares, tienen efecto diurético, tratan picaduras, etc.

De la misma forma, el género *Commelina* presenta varios compuestos y metabolitos secundarios entre ellos, alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, lignanos, ácidos fenólicos. Gracias a estos compuestos, las plantas de este género presentan actividad antimicrobiana, antioxidantes, antivirales y antihiper glucémico y anticancerígenos (Yang & Ye, 2009).

### 2.1.1 *Commelina diffusa* Burm.f.

Conocida comúnmente como flor diurna trepadora o flor diurna extendida, *Commelina diffusa* Burm. f., es una planta herbácea de la familia de las Commelinaceae, esta hierba está distribuida en Asia y en diversas regiones tropicales del mundo (Khan et al., 2011). Puede ser encontrada en América, Sur América, Australia, África, Islas del Sur de Asia (Holm, 1977).

*Commelina diffusa* Burm.f. es una maleza que vive en climas abiertos y húmedos, como los arrozales. Puede soportar condiciones húmedas e inundaciones durante un período de tiempo limitado. *Commelina diffusa* Burm.f. es una maleza que vive en tierras cultivadas, límites de campos, pastos húmedos, zanjas de caminos, jardines y áreas desiertas (Holm, 1977).

Esta especie perteneciente a la familia de las Commelinaceae es una hierba anual o perenne que es lisa y escasamente pilosa con tallos rastreros que trepan por arriba y se

ramifican por abajo. Se establece rápidamente en los nudos y se reproduce por semillas y vegetativamente. La maleza siempre es anual en climas templados, mientras que en climas tropicales y subtropicales es anual o perenne, dependiendo de la disponibilidad de humedad (Holm, 1977).

Rocha et al. (2007) en su estudio de caracterización morfológica de especies de *Commelina* spp. mencionan las características morfológicas descriptivas de la especie *C. diffusa* Burm. f., las cuales son: filetes translúcidos; tallo y hoja sin pelos; hoja elíptica estrecha; espata abierta con ápice acuminado; corola con tres pétalos expandidos; Estambres laterales con polen amarillo. De igual forma, mencionan las características morfológicas cuantitativas: la tercera hoja tiene una longitud media de 3,2 cm y hay 3,9 flores por inflorescencia en promedio y 2,5 inflorescencias por espata.

Wang et al. (2023) en su estudio acerca de una nueva especie de *Commelina* en China, establecieron características comparativas entre *C. danxiaensis*, *C. communis*, *C. diffusa*. Entre estas tres especies se observaron morfologías similares, sin embargo, la planta *Commelina diffusa* Burm.f. presenta una filotaxia dísticamente-alternativo, tamaño de la flor de 2 x 1,5 cm, color azul claro, a veces lila de los pétalos laterales, color azul claro del pétalo medial, forma rómbica del pétalo medial.

De la misma forma, Wang et al. (2023) aseguran que en la Reserva Natural Nacional de Danxiashan, se han registrado cuatro especies de *Commelina*, una de las cuales es la nueva especie *Commelina danxiaensis*. Para facilitar la identificación, proporcionan una lista de verificación y clave para las especies del monte Danxia, donde mencionan que *C. diffusa* tiene la espata estrechamente cordada y tiene nervaduras que son concoloras con la espata y poco visibles. El pétalo medial es inferior a los laterales y las cápsulas son desigualmente bivalvas.

A continuación, se describirá la planta *C. diffusa* Burm.f. basado en el libro Flora fanerogámica del Valle de México escrito por Rzedowski y Calderón (2001).

- Tamaño: 50 cm aproximadamente.
- Tallo: Radicante en los nudos inferiores, abundante, muy ramificado, casi sin pelos, delgado y generalmente de menos de 5 mm de diámetro, con tendencia a tomar un tono morado.

- Hojas: tienen vainas membranosas de 0,5 a 1 cm de largo por 3 a 4 mm de ancho y un margen superior ciliado. Láminas tienden a ser ovaladas a lanceoladas y de 2 a 6 cm de largo por 1 a 2 cm de ancho. Aguadas en el ápice y redondeadas en la base, y tienen pocos o ningún pelo.
- Inflorescencia: Las cimas axilares tienen pedúnculos que suelen tener 1 a 5 cm de largo y las brácteas espatáceas tienen 1 a 2 cm de largo y 5 a 10 mm de ancho. Con frecuencia tienen una curvatura en el ápice, que es agudo o acuminado, generalmente sin pelos y las venaciones transversales son algo visibles o invisibles.
- Flores: tienen pétalos azules de 4 a 6 mm de largo, dos de ellos un poco mayores y uñas relativamente largas, mientras que el tercero es poco menor y uñas cortas. Hay 3 estambres, 2 o 3 estaminodios y sépalos de 3 a 4 mm.
- Frutos y semillas: cápsula bivalva, elipsoide, de unos 6 mm de largo y tiene 4 a 5 semillas de color negro con marcas en forma de pequeños hoyos de 2,5 a 4mm de largo.
- Raíz: fibrosa y cilíndrica, delgada en la parte cercana a la planta, en ocasiones muy larga, engrosándose en el extremo distal.
- Hábito y forma de vida: suculenta, usualmente erecta y rastrera a su ascendente.

Por otro lado, esta especie vegetal ha sido empleada alrededor del mundo para fines medicinales, terapéuticos, nutracéuticos. En áreas tropicales y subtropicales se utiliza tradicionalmente como febrífugo, diurético, antídoto (Suganya & Jothi, 2014). En países de Asia, África y América la usan para tratar infecciones del tracto urinario y respiratorio, la diarrea, hemorroides, enteritis y los problemas oculares como la oftalmía y la conjuntivitis (Khan et al., 2011).

Las hojas y el tallo se emplean para tratar abscesos, furúnculos y malaria, así como picaduras de insectos, serpientes y chinches, edemas, laringitis, dolores de garganta, afecciones del tracto respiratorio en general (Khan et al., 2011). Esta especie de *Commelina* también se usa para el dolor de ingle, trata la gripe, la dermatitis, dismenorrea, lepra, enfermedades renales (Suganya & Jothi, 2014).

Las propiedades antimicrobianas y antioxidantes del extracto crudo se han asociado con su capacidad para cicatrizar (Mensah et al., 2006). Los fitoquímicos de *C. diffusa* han demostrado la presencia de glucósidos, flavonoides, esteroides, terpenoides, taninos, alcaloides, antraquinonas y otros componentes (Suganya & Jothi, 2014). También se investigaron las propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antiinflamatorias de la planta, dando resultados positivos (Mensah et al., 2014).

### 2.1.2 Taxonomía *Commelina diffusa* Burm.f.

**Tabla 1.**

*Clasificación taxonómica de Commelina diffusa* Burm. f.

<b>Linaje taxonómico</b>	
<b>Organismo</b>	Organismos celulares
<b>Superreino</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Viridiplantae
<b>Infrareino</b>	Streptophyta
<b>Superdivisión</b>	Embryophyta
<b>División</b>	Tracheophyta
<b>Subdivisión</b>	Spermatophytina
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Superorden</b>	Lilianae
<b>Orden</b>	Commelinales
<b>Familia</b>	Commelinaceae
<b>Género</b>	Commelina
<b>Especie</b>	<i>Commelina diffusa</i> Burm. f.

*Nota.* Información obtenida de (Schoch et al., 2020)

### 2.1.3 Propiedades *Commelina diffusa* Burm. f.

Como se mencionó anteriormente, el género *Commelina* es conocido por poseer de varios compuestos con fines medicinales, terapéuticos, nutraceuticos. La especie *C.*

*diffusa* Burm. f. ha sido estudiada y evaluada mediante pruebas fitoquímicas con el fin de conocer sus principales metabolitos.

Khan et al. (2011) en su trabajo de evaluación fitoquímica y propiedades antimicrobianas de la especie *C. diffusa* Burm. f., realizaron el análisis por cromatografía en capa fina y aseguran la presencia de alcaloides en sus tres fracciones (extracto de éter de petróleo, éter dietílico y metanol) con el reactivo Dragendroff. Por otro lado, confirman la presencia de antraquinonas, pero solo en el extracto metanólico, compuestos cetónicos en los extractos éter de petróleo y éter dietílico, por último, terpenoides en todas sus fracciones (Khan et al., 2011).

Del mismo modo, para corroborar su actividad antimicrobiana y antifúngica, Khan et al. (2011) utilizaron 4 bacterias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), 7 bacterias gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi*) y 7 especies de hongos (*Aspergillus niger*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale*, *Trichophyton spp*, *Microsporum spp*, *Cryptococcus neoformans*), realizaron la prueba de sensibilidad antibacteriana y antifúngica en difusión en disco, midiendo el diámetro de la zona de inhibición alrededor de cada disco (Khan et al., 2011).

Con respecto a las bacterias, el extracto que mostró mayor zona de inhibición fue el metanólico (11 a 19mm), seguido del extracto de éter dietílico (3 a 9mm) y del extracto de éter de petróleo (1 a 2mm). Las concentraciones mínimas inhibitorias del extracto metanólico fueron las más bajas, seguidas por los extractos de éter dietílico y petróleo. Para hongos, el extracto de éter dietílico mostró la mayor zona de inhibición (15 a 19mm), seguido por el extracto metanólico y el de éter de petróleo. Las concentraciones mínimas inhibitorias del extracto dietílico fueron las más bajas, seguidas por el extracto metanólico y éter petróleo (Khan et al., 2011).

Continuando con la actividad antimicrobiana, Nasrin et al. (2019) en su estudio acerca de las propiedades antimicrobianas y antioxidantes, afirma que 7 de sus 12 fracciones de extracto crudo, evaluado por difusión en disco, mostró actividad antibacteriana contra *E. coli* con zonas de inhibición de (20 a 21mm), asimismo, contra

*B. megaterium*. En cuanto a las propiedades antioxidantes, emplearon el método DPPH, para esto prepararon diferentes concentraciones de la solución metanólica de las muestras, estas se mezclaron con una solución de DPPH en metanol, sus resultados mostraron actividad de captura de radicales libres significativa, por ejemplo, el IC<sub>50</sub> para la fracción 11 fue de 39.27 mg/mL (Nasrin et al., 2019).

Siguiendo con la actividad antioxidante, Islam et al. (2021) mediante 4 fracciones del extracto (metanol, n-hexano, cloroformo, acuoso) ejecutó el método DPPH con ácido ascórbico como control positivo, dando como resultados un IC<sub>50</sub> de 98.49 mg/mL para el extracto metanólico que señala una buena capacidad antioxidante, IC<sub>50</sub> de 432.53 mg/mL para la fracción n-hexano que indica una baja actividad, IC<sub>50</sub> de 291.41 mg/mL para la fracción de cloroformo que revela una actividad moderada, IC<sub>50</sub> de 84.77 mg/mL para la fracción acuosa la cual muestra una buena actividad antioxidante y IC<sub>50</sub> de 2.67 mg/mL para el control positivo, la cual apunta una actividad antioxidante alta (Islam et al., 2021).

Islam et al. (2021) en el mismo estudio evaluaron también la actividad depresora del sistema nervioso central del extracto crudo de *C. diffusa* Burm. f. en ratones albinos mediante la prueba de campo abierto y la prueba de cruce de agujeros. En la prueba de campo abierto, diseñaron un campo con cuadrados alternados en dos colores (blanco y negro), los ratones fueron divididos en grupos control con agua destilada, diazepam y otros con dosis diferentes de las fracciones de la planta. En esta prueba se midió el número de cruces de los roedores a través de los cuadrados. Por otra parte, en la prueba de cruce de agujeros, usaron una caja que tenía una partición de madera en el centro y un agujero en el exterior, los roedores pasaron a través del agujero de una cámara a otra y contabilizaron el número de pases en intervalos de tiempo.

Los resultados demuestran que las 4 fracciones (metanol, n-hexano, cloroformo, acuoso) disminuyeron notablemente la actividad locomotora de los ratones en comparación al grupo control. Análogamente, todas las fracciones de la planta disminuyeron significativamente la cantidad de ratones que cruzaron el agujero en comparación con el grupo control, lo cual es congruente con la actividad depresora del SNC observada en la prueba de campo abierto (Islam et al., 2021).

Es importante mencionar que, la especie vegetal presenta actividad antiinflamatoria, según Mensah et al. (2014), el extracto etanólico de las hojas de *C. diffusa* Burm. f. administrado por vía oral a pollos, una hora después de ser inyectados con carragenina, mostraron una reducción significativa en el edema en la pata de los pollos, la disminución fue dosis-dependiente, lo que quiere decir que la inhibición del edema aumentó con la dosis del extracto. Sugieren que las propiedades antiinflamatorias del extracto pueden guardar relación con sus componentes antioxidantes, por la reducción del estrés oxidativo en los tejidos inflamados (Mensah et al., 2014).

Por último, pero no menos importante, *C. diffusa* Burm. f. tiene propiedades nutraceuticas, su contenido de macro y microelementos indispensables para la salud humana, la vuelve una buena alternativa como suplemento alimenticio. Peduruhewa et al. (2021) emplearon diferentes solventes orgánicos como hexano, etanol, cloroformo y agua para el análisis cuantitativo y cualitativo de las propiedades nutraceuticas. La determinación de los microelementos se llevó a cabo mediante el método de espectrofotometría de absorción atómica (Peduruhewa et al., 2021).

Los resultados arrojados dieron un alto contenido de proteínas y fibra, lo que la convierte en una opción viable como suplemento alimenticio y combatir la desnutrición, los micronutrientes que obtuvieron fueron el calcio, hierro, cobre y Zinc, esenciales para una buena salud (Peduruhewa et al., 2021).

## **2.2 Banano (*Musa paradisiaca* L.)**

Es de nuestro conocimiento que el banano es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial. La especie vegetal *Musa paradisiaca* L. comúnmente conocido como banano pertenece a la familia de las Musaceae, es una hierba perenne la cual se puede encontrar alrededor del mundo en áreas tropicales y subtropicales. Se conoce que el origen del género musa proviene de la parte sur y suroeste del continente asiático. (Zafar Imam & Akter, 2011).

El biólogo Norman Willison Simmonds en sus investigaciones propuso que uno de los primeros cultivos domesticados por la humanidad fue el banano, en su obra sugiere



que esta planta surgió al mismo tiempo que la agricultura sedentaria primitiva en la región, aproximadamente hace unos diez mil años. Este evento histórico destaca la estrecha relación que existe entre el banano y el desarrollo temprano de las prácticas agrícolas, lo que lo convierte en un elemento crucial en la historia de la alimentación humana (Simmonds, 1966).

El banano, es un producto comestible el cual nos aporta diversos micro y macronutrientes, pero su origen nace de una serie de mutaciones y cambios genéticos, a partir de especies silvestres no comestibles, de fruto pequeño con numerosas semillas, para alcanzar las mutaciones, se llevan a cabo alteraciones en los cromosomas que contienen las características genéticas, gracias a esto, tenemos actualmente el banano comercial comestible (Castro, 2009).

Las especies silvestres *Musa acuminata* Colla y *Musa balbisiana* Colla dan lugar a cultivares de banano y plátano. Los híbridos de estas dos especies a menudo se denominan *Musa X paradisiaca* L., *Musa X sapientum* L., o incluso *M. acuminata X M. balbisiana* Colla (Seymour, 1995).

La especie vegetal *Musa paradisiaca* L. es una planta herbácea monocotiledónea que puede llegar a una altura entre los 1,5 a 6 metros de largo. Se conoce que esta especie crece y se produce en climas tropicales, requiere de una temperatura adecuada y precipitación baja para desarrollarse uniformemente durante toda su etapa de crecimiento, por el contrario, si se desarrolla en áreas donde exista una alta precipitación y condiciones nubladas, la especie se verá afectada con respecto a sus condiciones fisiológicas (Pineda, 2021).

El sistema radicular consta por las raíces de la planta y son de carácter adventicio, fasciculadas y fibrosas (Belalcazar, 1991). En su investigación, Tomalá (2019) afirma que las raíces presentan un color blanco y son flexibles, pero al pasar del tiempo estas se tornan amarillentas y resistentes, a medida que envejece la planta, la raíz se vuelve de un color castaño oscuro.

Siguiendo con las características botánicas, la planta de banano cuenta con un rizoma o bulbo, tallo subterráneo con meristemos donde comienza el crecimiento del

pseudotallo, raíces y yemas (*El Cultivo del Plátano. 1era Parte.*, 2024) el pseudotallo está conformado por la unión de las vainas de las hojas, sostiene el tallo aéreo que lleva la inflorescencia hacia el ápice. La forma de las vainas son circulares y en una etapa inicial cubren por completo el tallo aéreo, tiempo después el crecimiento de nuevas hojas dentro del pseudotallo obliga a los márgenes libres de las vainas a separarse (Stover & Simmonds, 1987).

La lámina o limbo, el pseudo pecíolo, la vaina y la nervadura central son las cuatro partes visibles de las hojas de banano. La forma de la especie vegetal en su etapa adulta es ovalada, con un ápice obtuso y un semilimbo ligeramente más grande que el otro. El número de hojas que puede llegar a producir la especie dependerá de su edad, usualmente entre 1/3, 3/7 y 4/9 en plantas adultas (Galan et al., 2018).

Las flores son de un tono amarillento, irregulares y con seis estambres, uno de ellos es estéril, reducido a estaminodio petaloideo. El gineceo está conformado con tres pistilos, con ovario ínfero. El “régimen” de la platanera es el conjunto de la inflorescencia. Cada grupo de flores en cada bráctea forma una reunión de frutos llamada “mano”, que tiene entre tres y veintidós frutos. Un régimen no puede tener más de 4 manos, excepto en las variedades muy reproductivas, que pueden tener entre 12 y 14 manos (*El Cultivo del Plátano. 1era Parte.*, 2024)

Su fruto presenta una forma cilíndrica, alargada y un poco curvada, con una pulpa blanda comestible y rica en almidón, posee un sabor dulce y sin semilla. Sus manos están esparcidas por todo el racimo y tienen de 30 a 70 dedos, con una longitud de 20 a 40 cm y un diámetro de 4 a 7 cm (Hernández, 2009).

La ecofisiología del cultivo de banano requiere de un ambiente y condiciones favorables para su óptimo crecimiento, no solo depende de aspectos climáticos sino también geográficos. Como se mencionó anteriormente la especie *Musa paradisiaca* L. crece en áreas tropicales, es por esta razón que necesita de un clima húmedo aproximadamente entre los 18 °C a 35.5 °C, tal como lo menciona (Andrade, 2014) en el manual de buenas prácticas agrícolas para Banano, puesto que, al enfrentarse a temperaturas mayores, la especie puede llegar a sufrir estrés y bajar su rendimiento.

En términos de altitud, la más recomendada sería entre los 0 metros sobre el nivel del mar hasta los 300 sobre el nivel del mar (Andrade, 2014), no obstante, la especie *Musa paradisiaca* L. puede adaptarse y crecer en altitudes hasta los 2.200 metros sobre el nivel del mar (Torres, 2012). En cuanto a la luminosidad para una óptima producción de banano es anualmente entre las mil y mil quinientas horas luz (Andrade, 2014). Asimismo, el viento influye en el buen desarrollo de la planta, por lo que, la falta de vientos fuertes favorece su crecimiento, se recomienda sembrar esta especie en zonas donde los vientos no pasen de 30 kilómetros por hora, con el fin de evitar el volcamiento de las mismas (Andrade, 2014).

Los recursos hídricos es otra condición primordial al momento del desarrollo de la planta, debido a que el agua influye en los procesos fisiológicos a través de reacciones químicas en las células; Cayón et al. (1998) afirman que el tipo de banano, la insolación, la densidad de siembra, la edad del cultivo y el área determinan la cantidad de agua que necesita el cultivo de banano. Por otro lado, Cayón et al. (1998) manifiestan que el suelo sirve como soporte y espacio vital para la especie, este proporciona minerales esenciales para el metabolismo y su desarrollo; el cultivo de banano requiere un suelo que tenga elementos ricos en nutrientes que no se presenten de forma natural, esto quiere decir que deben ser proporcionados por la fertilización (Cayón et al., 1998).

### 2.2.1 Taxonomía del Banano

**Tabla 2.**

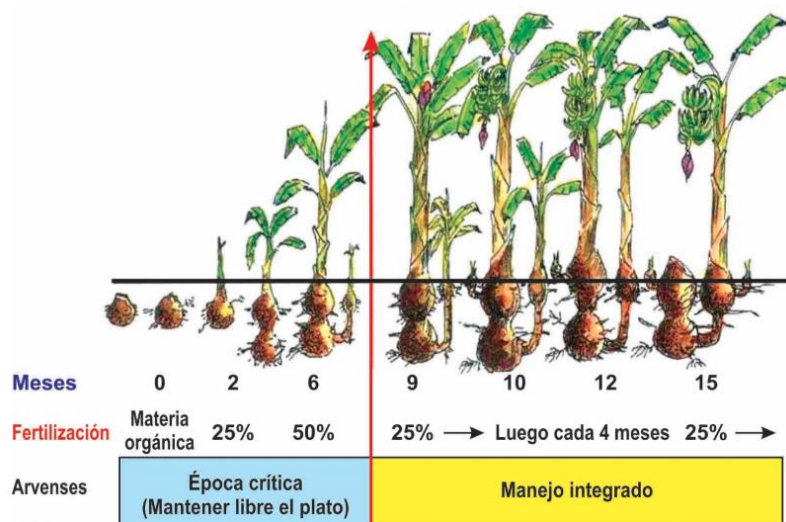
*Clasificación científica de Musa paradisiaca L.*

<b>Clasificación científica de <i>Musa paradisiaca</i> L.</b>	
<b>Reino</b>	Vegetal
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Liliopsida
<b>Orden</b>	Zingiberales
<b>Familia</b>	Musaceae
<b>Género</b>	Musa
<b>Especie</b>	<i>M. paradisiaca</i>

*Nota.* Información de (Kress, 1990).

### 2.2.2 Fases fenológicas del banano

Los autores Marcelino, González & Ríos (2012) presentan en su manual técnico que el ciclo de cultivo de banano consta primordialmente de cuatro fases de desarrollo fenológico, como se observa el cultivo de banano en la **Figura 1**, a continuación, se explicará cada una de ellas.



*Figura 1* Ciclo del cultivo de banano. Imagen obtenida de (Santos et al., 2006)

- Vegetativa: también conocida como la fase de crecimiento, va desde la siembra hasta la emisión de la inflorescencia, que puede ocurrir de seis a siete meses después de la siembra.
- Reproductiva: fase de floración, incluye el periodo que va desde la emisión de la inflorescencia hasta la aparición del último cojín de la flor masculina. Esta fase tiene un tiempo bastante estable que aumenta con la altitud y generalmente dura entre 10 a 15 días.
- Productiva: se la conoce como madurez del racimo y dura desde la exposición del último cojín de flores masculinas hasta la cosecha del racimo, en la especie clon Cuerno puede llegar a durar entre 2.5 a 3.5 meses (Belalcazar, 1991).
- Sucesión: esta fase se lleva a cabo junto al desarrollo fisiológico de la planta madre, después de la cosecha de esta, el retoño comienza a crecer y entrará en su fase reproductiva que durará entre 2.5 a 3 meses y para la cosecha de 5.5 a 6 meses.

### 2.2.3 Producción bananera

En Ecuador, las provincias costeras de El Oro, Guayas y Los Ríos, son las más importantes en la producción de banano, con una participación del 41%, 34%, 16%, respectivamente. El 42% de los pequeños productores de banano del país se encuentran en la provincia de El Oro, mientras que los grandes productores se encuentran principalmente en las provincias de Guayas y Los Ríos (COMEX, 2017).

La producción de musáceas es el primer rubro no petrolero de importancia económica para el país. Alrededor de 268.410 hectáreas de plantaciones de musáceas se encuentran en Ecuador, de las cuales el 95% se exporta y se distribuye en 43 mercados globales. Por lo tanto, el banano ecuatoriano representa aproximadamente el 30% del consumo mundial. Esta actividad tiene un impacto directo e indirecto en alrededor de 2,5 millones de personas (Agrocalidad, 2018).

Como se dijo anteriormente, Ecuador es un país productor cuya gran parte de su economía siempre ha dependido de la exportación de distintos productos, como el café, flores, cacao y banano. Aproximadamente una quinta parte de la producción mundial de banano está destinada a los mercados internacionales.

Entre 2008 y 2017, la producción mundial de banano aumentó un 15,35%, alcanzando 113,92 millones de toneladas métricas (MTM) en 2017. Debido a los aumentos en el rendimiento y el área cosechada durante este tiempo, la producción de bananos aumentó. Las exportaciones de banano aumentaron un 26,67% en el mismo período, alcanzando 23,18 MTM en 2017. Los tres principales exportadores de banano en el mundo en 2017, Ecuador, Filipinas y Costa Rica, representaron alrededor del 50% de las exportaciones mundiales de bananos (Evans et al., 2020); (Crops Production And Trade Statistics, 2024).

De la misma manera, como mencionaron Serrano et al. (2020), la producción del banano Cavendish de Ecuador representa el 40% de la producción mundial y las exportaciones del país representan más del 30% de las exportaciones globales. Siendo uno de los principales proveedores de bananos en Asia y Europa, Ecuador es un rival global en la venta de frutas de banano debido a su alta calidad.

En Ecuador, la producción de bananos alcanzó los 6,5 millones de toneladas en 2018, con una superficie neta de cultivo de 158.057 ha (FAO, Banana Statistical Compendium 2018, 2019). Como lo afirman Villaseñor et al. (2020) el banano es un cultivo que tiene una alta demanda nutricional, este producto se caracteriza por su sabor y aroma afrutado, así como por sus propiedades nutritivas, que incluyen fibras, hidratos de carbono, agua y grasa (Pineda, 2021).

En el año 2019 se calcula que las exportaciones globales de bananos alcanzaron 20,2 millones de toneladas, en comparación al año 2018 aumentó un 5%. Según datos de los nueve primeros meses del año, esta creciente sigue siendo el resultado principal del fuerte crecimiento económico en los dos principales exportadores del año 2019, Ecuador y Filipinas. Mientras tanto, las condiciones climáticas desfavorables causadas por el fenómeno del Niño siguen teniendo un impacto en los envíos de varios proveedores importantes, principalmente de Costa Rica y República Dominicana y en menor medida Colombia (FAO, 2020).

Según el análisis del mercado del Banano realizado por FAO (2020) Los volúmenes mundiales de importación neta de bananos alcanzaron los 18,9 millones de toneladas en 2019, un aumento estimado del 3% con respecto a 2018.

La biotecnología, con tecnologías agrícolas, ha ayudado a mejorar la producción y cultivos bananeros, con el fin de impulsar el desarrollo del país tal como lo menciona Suárez (2019) en su estudio de la producción de un territorio bananero en la costa sur del Ecuador (Suárez, 2019). A pesar de ello, sabemos que existen diversos fitopatógenos, que causan daños y grandes pérdidas en las plantaciones de banano, y por consiguiente se perjudica la economía del país, la gestión adecuada de los productos agrícolas es crucial. El banano es un cultivo que se produce en todo el mundo, por lo que es esencial proteger

las plantaciones de enfermedades perjudiciales como lo es la Sigatoka Negra (Narayanan et al., 2022).

### ***2.3 Sigatoka negra***

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, también conocido como Sigatoka Negra, ha provocado pérdidas en plantaciones de banano no solo en Ecuador sino también alrededor del mundo (Ploetz, 2001). Esta enfermedad causa rayas necróticas en las hojas, pérdida de la capacidad fotosintética y una disminución del rendimiento tal como lo menciona Churchill (2010). El patógeno se propaga tanto en su forma asexual como sexual y actualmente está controlado por un régimen estricto de fungicidas, lo que es motivo de preocupación por motivos económicos y ambientales (Noar et al., 2022).

La Sigatoka Negra se describió por primera vez en el valle de Sigatoka en Fiji en el año de 1963, pero muestras de herbario indican que ya existía en Taiwán en 1927 (Stover, 1978). Se corroboró su origen asiático mediante pruebas genéticas de 136 aislados de *Mycosphaerella fijiensis* de diferentes lugares del mundo, mediante la técnica RFLP (Carlier et al., 1996).

En el continente americano se observó por primera vez en Honduras en el año 1972, luego se extendió a los países bananeros de América Central, América del sur, América del Norte y algunas islas del Caribe. Adicional a esto, la primera vez que se registró en Colombia fue en la zona bananera de Antioquia en 1981 (Stover & Dickson, 1976; Marín et al., 2003). La entrada de este fitopatógeno en el país se dio en el año de 1987 al norte, en la provincia de Esmeraldas, sustituyendo a la Sigatoka Amarilla, hongo menos perjudicial para los cultivos bananeros (Batallas, 2015).

La Sigatoka Negra es causado por los patógenos *Mycosphaerella fijiensis* en su estado sexual y por *Pseudocercospora fijiensis* en su forma asexual. La infección puede ocurrir tanto a través de ascosporas (sexuales) como de conidios (asexuales). La enfermedad se desarrolla principalmente desde la parte superior hacia la parte inferior de la planta de banano, donde las aerosporas afectan primero las estomas y luego las hojas (De Lapeyre de Bellaire et al., 2010).

Es por eso que, las hojas que presenten grandes lesiones causadas por infecciones empezarán a deteriorarse y afectarán la capacidad de las plantas para llevar a cabo la fotosíntesis, lo que eventualmente ocasionará su muerte. En las primeras etapas de la infección, las lesiones lucen de color marrón oxidado. Conforme avanza la infección, estas áreas se tornan más oscuras y se convierten en depresión (Narayanan et al., 2022).

Como se mencionó anteriormente, la Sigatoka Negra causa mayores pérdidas en las plantaciones de banano, por lo tanto, es importante realizar controles de patógenos y posibles estimaciones de pérdida de cultivo. El control de esta enfermedad en Centro América y Suramérica representa el 27% de los costos de producción, siendo este aproximadamente USD 10 millones anuales (Fullerton & Casonato, 2019), las pérdidas del banano aumentan un 70% (FAO, 2020; Ploetz, 2001).

### 2.3.1 Clasificación taxonómica de la Sigatoka negra

**Tabla 3.**

*Clasificación taxonómica de Mycosphaerella fijiensis Morelet*

<b>Linaje taxonómico</b>	
<b>Organismo</b>	Organismos celulares
<b>Superreino</b>	Eucariota
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filo</b>	Ascomycota
<b>Subfilo</b>	Pezizomycotina
<b>Clado</b>	Dothideomycetes
<b>Clado</b>	Dothideomycetidae
<b>Clado</b>	Capnodiales
<b>Clado</b>	Mycosphaerellaceae
<b>Clase</b>	Dothideomycetes
<b>Clado</b>	Dothideomycetes
<b>Clado</b>	Dothideomycetidae
<b>Clado</b>	Capnodiales
<b>Orden</b>	Capnodiales



<b>Familia</b>	Mycosphaerellacea
<b>Subfamilia</b>	Mycosphaerelloideae
<b>Clado</b>	Capnodiales
<b>Tribu</b>	None
<b>Género</b>	<i>Mycosphaerella</i>
<b>Especie</b>	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet

*Nota.* Información de (Schoch et al., 2020).

### 2.3.2 Afectación en los cultivos a nivel mundial

El hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* produce grandes pérdidas en las plantaciones de banano, los bajos rendimientos causados por esta enfermedad han provocado problemas de inseguridad alimentaria, sobre todo en los sectores agrícolas, la sigatoka negra reduce el rendimiento de los cultivos, reduciendo el área fotosintética de la fisiología y el llenado del fruto, tal como lo mencionan Barekye et al. (2011).

La Sigatoka negra provoca un daño en las hojas, causando manchas necróticas y una disminución del área foliar en toda la planta infectada (Barekye et al., 2011), este hongo causa pérdidas económicas para los productores y afecta la calidad del fruto, asimismo, según Chillet et al. (2009) mencionan que el fruto puede verse afectado en su proceso de maduración, el banano madura prematuramente al ser atacado por él.

La enfermedad se encuentra distribuida por toda América causando graves pérdidas de rendimiento, la enfermedad se vuelve cada vez más resistente por lo que su manejo se complica y se carece de medidas de manejo. La aparición de la Sigatoka negra en Centroamérica provocó un aumento significativo con respecto a los costos de protección de los cultivos bananeros (Stover R. H., 1980).

Los costos para combatir dicha enfermedad aumentaron 4 veces más de lo que era anteriormente (Stover R. H., 1980). Los tratamientos contra la Sigatoka negra representan el 27% del costo total de producción de una caja de bananos en Centroamérica (Stover & Simmonds, 1987). A pesar de que en Costa Rica se realizaron 33 aplicaciones anuales de

fungicidas, el hongo *Mycosphaerella fijiensis* afecta el 5% del valor de producción cada año. (Romero R. , 1993).

El impacto del daño causado por la Sigatoka negra es altamente significativo, lo que nos demuestra la importancia de buscar alternativas y recursos para su manejo. Existen factores epidemiológicos que favorecen el desarrollo de la enfermedad, como por ejemplo el clima, ya sea la lluvia, temperatura y humedad (Romero R. , 1998).

El clima juega un papel importante en la expresión de la resistencia del hospedero y su susceptibilidad a la enfermedad, en especial cuando se trata de resistencia poligénica. Asimismo, si la resistencia es monogénica, el clima puede ser crucial para la eficiencia de los genes que pueden conferir resistencia (Romero R. , 1998).

La dinámica del inóculo y el impacto de la enfermedad en los rendimientos también están determinados por el clima. En Costa Rica la Sigatoka negra influye el peso del racimo hasta un 40%. La lluvia propaga la liberación de las ascosporas, la germinación y penetración del hongo, así como la colonización de los tejidos internos, están influenciadas por la temperatura y la humedad. Mientras las temperaturas oscilen entre los 24 °C y los 28 °C y el ambiente presente humedad relativamente alta, la reproducción se beneficia (Romero R. , 1998).

### *2.3.3 Afectación en los cultivos a nivel nacional*

Ecuador sigue siendo el país líder en la producción y exportación de banano a nivel global, con una cantidad de aproximadamente 6 millones de toneladas vendidas a otros países en todo el mundo cada año. Esta actividad, aparte del petróleo, es la segunda forma de ingresar dinero a su economía y, como resultado, contribuye significativamente a su crecimiento como nación (Serrano et al., 2020).

En febrero de 1987, se encontró por primera vez la Sigatoka negra al norte de Ecuador, específicamente en la provincia de Esmeraldas. En 1989, se descubrió en las provincias de Los Ríos y Guayas y para el año de 1992 se presentó en las plantaciones bananeras de la provincia de El Oro, dicha provincia ubicada al sur del país. Lo que quiere

decir que, la enfermedad tardó cinco años en infectar todas las plantaciones de bananos en el país (Martillo & Solano, 2003).

Adicional a ello, se mencionó que son cuatro provincias costeras las que lideran la producción bananera en el país, las condiciones climáticas favorables y el suelo excepcional han contribuido a las altas producciones. Aproximadamente se ha ocupado unas 200 mil ha de suelo para la siembra de banano, este cultivo representa el 20% del producto interno bruto (Serrano et al., 2020).

En relación con el clima, se sabe que la lluvia afecta notablemente a la propagación del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, sin el fenómeno de El Niño el control para esta enfermedad es relativamente fácil, se realizan pocos ciclos de aplicación de agroquímicos, pero con la presencia de El Niño la enfermedad se vuelve más difícil de manejar, por lo que los métodos convencionales de aplicación no son viables (Martillo & Solano, 2003).

La aplicación de agroquímicos en el año 2002 significó una gran pérdida de cultivo y, en consecuencia, económico. En dicho año se realizaron de 18 a 23 ciclos por hectárea por año, sin embargo, con la llegada de El Niño se comenzaron a aplicar fungicidas cada 14 días en la provincia de Los Ríos. La angustia de los agricultores provocó que aplicaran hasta 33 ciclos, a pesar de ello, hubo mucha pérdida de fruta y los daños ocasionados fueron innumerables (Martillo & Solano, 2003).

En condiciones críticas, los agricultores pueden sufrir pérdidas entre un 40% a 100% de producción bananera, es por esto que, se busca de alternativas y estrategias para el control y manejo de la enfermedad (Valverde, 2019).

Como lo menciona Intagri (2018) el crecimiento y propagación de la Sigatoka negra está relacionado con las condiciones meteorológicas. Lamentablemente, Ecuador carece de herramientas tecnológicas especializadas en la evaluación de variables meteorológicas específicas para la vigilancia de las plantaciones bananeras, lo que aumenta significativamente la probabilidad de no identificar el hongo a tiempo.

Por último, es importante mencionar que, en Ecuador, la industria bananera invierte el 35% de sus costos de producción en la gestión de la enfermedad Sigatoka negra. La mayor inversión dentro de este porcentaje se destina a los agroquímicos, los especialistas agropecuarios han iniciado proyectos de investigación para mejorar y asegurar el buen uso de agroinsumos (CropLife Latin America, 2024).

## ***2.4 Sintomatología de la enfermedad***

Según Belalcazar (1991) el desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra se puede visualizar en seis estadíos, tal como se observa en la **Figura 2**.

- Estadío 1: empieza con una pequeña decoloración de color blanco, en algunos casos amarillo, aproximadamente de 1 mm de largo, se puede observar únicamente en el envés de la hoja. Para observar dichas manchas blancas se debe exponer el envés de la hoja a la luz. Dichas manchas blancas son conocidos como piscas.
- Estadío 2: la mencionada mancha blanca/amarilla empieza a transformarse en una estría de color rojizo de 2 a 3 mm de largo en el envés y haz de la hoja.
- Estadío 3: la estría rojiza se torna marrón y ya no es solo una estría sino varias. Sus tamaños aumentan y también se alargan. Los conidióforos aparecen en esta etapa, por lo tanto, conduce a la producción de conidias.
- Estadío 4: las manchas empiezan a crecer aún más y su color se torna marrón oscuro en el envés y una coloración negra en el haz de la hoja, presentan una forma ovalada.
- Estadío 5: las manchas comienzan a tener una forma elíptica, siguen creciendo tanto vertical como horizontalmente, su color se torna negro y los bordes de dichas manchas lucen un color rojizo con halo amarillo.
- Estadío 6: esta etapa indica que la enfermedad está avanzada y es aquí donde el centro de la mancha negra se seca y muestra un centro blanco-grisáceo con peritecios evidentes.



*Figura 2 Estadios de desarrollo de la Sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis). Imagen obtenida de Manual Técnico El cultivo de plátano (Musa paradisiaca L. en Panamá, elaborada por (Marcelino, González, & Ríos, 2012)*

## 2.5 Reproducción del patógeno

*Mycosphaerella fijiensis* es un hongo ascomiceto que se reproduce tanto sexual como de forma asexual, en su reproducción sexual produce las ascosporas mientras que en su forma asexual se generan esporas llamadas conidios (Canto, 2012). En la reproducción sexual se caracteriza por la formación de las siguientes estructuras: espermatogonios, peritecios y como mencioné anteriormente, las ascosporas, mientras que, en la reproducción asexual, las hifas crean una estructura donde crecen los conidióforos y de cada uno puede formarse los conidios (Intagri, 2018).

En la reproducción sexual los espermatogonios están más presentes en la parte inferior de la hoja (envés o parte abaxial), estos producen gametos masculinos, conocidos como espermatia en su etapa madura, que fertilizan los peritecios, también conocidos como pseudotecios o cuerpos fructíferos los cuales son la parte femenina del hongo (Intagri, 2018). Las ascosporas se producen en las ascas de los peritecios, que son sacos pequeños y transparentes. Cada uno de estas ascas contiene ocho ascosporas, las cuales son estructuras pequeñas que aparecen en las etapas finales de la enfermedad (Sánchez et al., 2005).

El pseudotecio puede producir hasta 160 ascosporas (Sánchez et al., 2005), cada una de las cuales tiene la capacidad de infectar las hojas de bananos. La velocidad del

viento es el medio por el cual las ascosporas se propagan a larga distancia (Ploetz, 2001). Es importante destacar que las ascosporas son susceptibles a la radiación ultravioleta, lo que limita su dispersión natural a unos kilómetros.

## ***2.6 Actividad antifúngica***

La naturaleza nos brinda una variedad de especies vegetales las cuales son una fuente de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. La actividad antifúngica de extractos de plantas usadas contra fitopatógenos ha sido estudiada durante años por la necesidad de disminuir el uso de químicos sintéticos en la agricultura que causan daño al medio ambiente y salud de los seres vivos (Barrea & García, 2008)

La actividad antifúngica de las plantas se ha estudiado a través de la resistencia de patógenos a varios fungicidas comerciales utilizados, la presencia de desechos químicos en la cadena de alimentos y el control de enfermedades de cultivos agrícolas, esto ha motivado la búsqueda de nuevas sustancias antifúngicas de origen vegetal que sean efectivas contra fitopatógenos tanto *in vitro* como *in vivo*. Los extractos de plantas naturales son un sustituto efectivo de los agentes antimicrobianos sintéticos y una opción para prevenir la contaminación de los alimentos (Centeno & Carrea, 2013).

El término "agente antifúngico o antimicótico" se refiere a cualquier sustancia capaz de alterar las estructuras de una célula fúngica de tal manera que pueda inhibir su crecimiento, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que permite que los sistemas de defensa del huésped funcionen mejor (Gregorí Valdés, 2005).

El fenómeno se refiere a la capacidad de ciertas sustancias para detener el desarrollo de hongos o incluso causar su muerte, ya que las plantas son una fuente valiosa de moléculas biológicamente activas, entre las cuales se destacan varios metabolitos secundarios con características antifúngicas. Los flavonoides, los fenoles, los glicósidos de fenoles y las saponinas son algunas de las sustancias más conocidas (Grayer & Harborne, 1994).

Los antifúngicos actúan en diferentes niveles dentro de la célula fúngica, provocando una serie de eventos que impiden el crecimiento y la propagación de los hongos. La pared celular, una estructura esencial para la integridad y resistencia de la célula, es uno de los principales blancos de acción (Davicino et al., 2007). Los antifúngicos pueden debilitar la pared celular y hacerla vulnerable al organismo fúngico al obstaculizar su síntesis (Rivas-Morales et al., 2016).

Según la FRAC (2019), existe una serie de clasificación de modos de acción de los antifúngicos, a continuación, se detallará cada una de ellas:

- **Metabolismo de ácidos nucleicos:** la síntesis de ácidos nucleicos ADN y ARN se ve afectado por ellos, lo que reduce la producción de enzimas como la ARN polimerasa I, la adenosin-deaminasa o la ADN topoisomerasa. Tiene un impacto en la división celular (FRAC, 2019).
- **Proteínas del citoesqueleto y las proteínas motoras:** la molécula tubulina, también conocida como microtúbulos-citoesqueleto, es esencial para la formación y segregación de cromosomas durante la división celular. Cualquier alteración en esta molécula tiene un impacto en la mitosis a nivel de la metafase (FRAC, 2019).
- **Respiración:** inhibir el proceso de respiración celular de las mitocondrias. La respiración, un proceso oxidativo complejo, produce ATP y ADP para mantener la energía liberada por el catabolismo de moléculas como los carbohidratos. (FRAC, 2019).
- **Síntesis de aminoácidos y proteínas:** Inhiben la biosíntesis de la metionina (gen cgs) y la secreción de enzimas, que son parte de la transferencia de información de ARN a la síntesis de una secuencia de aminoácidos (FRAC, 2019).
- **Transducción de señales:** Las sustancias que lo producen alteran la transducción de señales, deteniendo los procesos metabólicos que permiten a la célula adaptarse a su entorno. La transducción de señales osmótica (OS-2, HOG1) implica MAP/histidina-quinasa (FRAC, 2019).
- **Transporte:** Alteran la integridad de las membranas celulares y la síntesis de lípidos. Afectan la formación de glicolípidos al influir en la permeabilidad de la membrana (FRAC, 2019).
- **Biosíntesis de esterol en las membranas:** los inhibidores de enzimas o los mecanismos enzimáticos involucrados en la biosíntesis del esterol Los esteroides,

que solo se encuentran en las membranas celulares de algunos hongos (Ascomicetos y Basidiomicetos, no en bacterias ni oomicetos), ayudan a los hongos a mantener su estabilidad y permeabilidad (FRAC, 2019).

- La biosíntesis de la pared celular: la glucosamina y la quitina no se unen en las paredes celulares. La integridad de las paredes celulares fúngicas se ve afectada por la inhibición del glucano, que es el componente estructural principal de las paredes celulares fúngicas (FRAC, 2019).

Los antifúngicos también son cruciales para la agricultura y la protección de cultivos. Las infecciones fúngicas pueden arruinar la producción agrícola y causar pérdidas significativas en los rendimientos, por lo que se utilizan antifúngicos fitofarmacéuticos para prevenir y controlar las enfermedades fúngicas en las plantas cultivadas (Rivas-Morales et al., 2016).

## ***2.7 Controles biológicos contra la Sigatoka negra***

Las prácticas agronómicas son esenciales para gestionar plantaciones, ya que proporcionan condiciones óptimas para el crecimiento de las plantas y previenen la creación de microclimas que favorecen enfermedades. Es esencial implementar un programa de manejo integrado de la Sigatoka negra en la producción comercial de bananos y plátanos. Esto requiere que los técnicos y productores que trabajan en la producción de estas musáceas tengan un conocimiento exhaustivo de la enfermedad (Orozco et al., 2008).

El uso de microorganismos o los productos de su metabolismo para disminuir o eliminar las poblaciones de patógenos es parte del control biológico de enfermedades. Este método protege a las plantas al atacar directamente a los patógenos en el lugar de infección, ya sea antes o después de la infección (Agris, 1996).

El control biológico de los patógenos es un fenómeno común en la naturaleza que implica reducir o eliminar las poblaciones de patógenos utilizando otros organismos. Por ejemplo, los suelos supresores, que contienen microorganismos antagonistas que impiden el crecimiento de los patógenos, impiden que los patógenos prosperen en ciertos lugares.



Además, las plantas que han sido afectadas por patógenos con frecuencia están inoculadas naturalmente con microorganismos antagonistas antes o después del ataque del patógeno. En ocasiones, estos antagonistas pueden ser cepas no virulentas del mismo patógeno, que impiden su crecimiento a través de mecanismos como la hipovirulencia y la protección cruzada (Agrios, 1996).

En otros casos, ciertas plantas superiores pueden ayudar a reducir la cantidad de inóculo atrapando patógenos cercanos (conocidas como plantas trampa) o liberando sustancias tóxicas para los patógenos en el suelo. En los últimos años, los humanos han intentado aprovechar estos antagonismos biológicos naturales y han creado métodos para usar el control biológico para combatir una variedad de enfermedades de las plantas. A pesar de que existen numerosas restricciones ecológicas, se espera que los antagonismos biológicos desempeñen un papel significativo en las estrategias de control utilizadas para combatir una variedad de enfermedades (Agrios, 1996).

Según Guzmán (2012) en comparación con las enfermedades foliares, como la Sigatoka negra, el control biológico ha demostrado ser más efectivo para controlar las enfermedades del suelo. Las características del filoplano lo convierten en un entorno desfavorable para los microorganismos antagonistas. La superficie de las hojas está expuesta a cambios bruscos de temperatura y humedad, lo que crea un ambiente estresante e inestable. Además, el filoplano tiene una disponibilidad limitada y dispar de nutrientes, como carbohidratos y proteínas. A pesar de estos obstáculos, los microorganismos colonizadores del filoplano pueden desempeñar el papel de reguladores biológicos (Guzmán, 2012).

En general, el control biológico de la Sigatoka negra es muy difícil debido a la naturaleza policíclica de la enfermedad, la presencia de plantas de todas las edades y el desarrollo de hojas altamente susceptibles cada 6 a 12 días. Debido a la disponibilidad de fungicidas altamente efectivos, así como al escaso interés y financiamiento para encontrar métodos alternativos de control, hasta ahora se ha prestado poca atención al control biológico de *M. fijiensis* (Marín et al., 2003).

Sin embargo, en los últimos diez años, el interés en buscar alternativas para el control de la Sigatoka negra ha aumentado debido al desarrollo de cepas de *M. fijiensis*

que son menos sensibles o resistentes a fungicidas sistémicos y a la creciente demanda de métodos de control ambientalmente seguros (Marín et al., 2003).

### *2.7.1 Extractos vegetales*

Desde tiempos ancestrales las plantas han sido usadas para fines medicinales y terapéuticos, tratando un sin número de enfermedades, actualmente los investigadores estudian una varia cantidad de especies con el fin de descubrir sus actividades biológicas para poder crear productos como bioinsecticidas y biofungicidas, a base de extractos vegetales, debido a que, con productos químicos sintéticos, las plagas van creando aún más resistencia y el impacto ambiental es cada vez mayor.

Las plantas pueden sintetizar una amplia gama de metabolitos secundarios que están relacionados con una variedad de mecanismos de defensa. Los metabolitos son cruciales para proteger a las plantaciones contra depredadores, microorganismos patógenos y herbívoros, así como diversos tipos de estrés abiótico (Pérez Urria & Ávalos García, 2009).

Se ha demostrado en los últimos años que las plantas tienen funciones biológicas y químicas de defensa, lo que significa que una amplia gama de estos compuestos puede tener efectos biológicos sobre los hongos. Los extractos vegetales pueden ser extraídos de diferentes órganos vegetativos y reproductivos, como raíces, hojas, brotes, tallos, frutos y flores, previamente triturado y tamizado, con un tamaño de partícula determinado y mezclado con un solvente a elección (Mesa et al., 2019).

La mejor forma de concentrar y obtener los componentes activos de las plantas es con extractos vegetales, se logra tener cantidades mínimas de los componentes más vitales, lo que potencia sus efectos, como ya se mencionó, las especies vegetales tienen componentes activos, que son sustancias que ayudan al desarrollo y salud de la planta como minerales, vitaminas, polifenoles, flavonoides y aceites esenciales (Quiroga, 2021).

### 2.7.2 *Obtención de extractos vegetales*

Los extractos son preparaciones líquidas, semisólidas o sólidas que se obtienen de tejidos vegetales, generalmente en estado seco. Pueden obtenerse de plantas frescas, secas, semisecas o fermentadas. La separación de una mezcla de una planta a través de varios tipos de solventes, de una forma caliente o fría, en diferentes intervalos de tiempo, se conoce como proceso de extracción. Como resultado de la extracción, se obtienen dos componentes, el primero, el cual nos brinda los principios activos de la planta, el segundo es el rechazo o bagazo de la especie, el cual no tienen ningún uso en nuestro proceso (Chacón, 2019).

Existe una amplia variedad de métodos de extracción, incluida la percolación y el arrastre con vapor. La extracción Soxhlet, por ejemplo, utiliza una variedad de solventes según su polaridad para producir extractos acuosos, etanólicos, aceites esenciales u otros compuestos. Después de la extracción, se filtra la mezcla, se lava el material insoluble con el mismo solvente y se combinan los filtrados para concentrar y secar el extracto. Se puede lograr altos rendimientos de extracción y una gran versatilidad en la separación de componentes según sus características polares dependiendo del método usado (Mesa et al., 2019).

Adicional a ello, los métodos extractivos se clasifican en: extracción mecánica (por expresión, con calor, con incisiones), destilación, extracción con fluidos supercríticos, extracción con solventes, esta última tiene dos subdivisiones, continua (percolación, soxhlet) y discontinua (maceración digestión, infusión, decocción) (Kuklinski, 1999).

En este trabajo se aplicó la extracción con solventes, este método implica sumergir la especie vegetal, ya triturada, en un solvente o mezcla de solventes, con el fin de que pueda disolver sus componentes activos para hacer uso de ellos en futuras investigaciones, bioproductos o enfermedades (Pérez, 2009).

El proceso de maceración implica mantener el material vegetal en contacto con un solvente durante un período prolongado de tiempo para obtener extractos. El material vegetal debe estar molido para aumentar la superficie de contacto con el solvente, este

proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente. Para uniformar el proceso y mejorar la eficiencia de la extracción es recomendable agitar con frecuencia, se debe proteger el recipiente de la luz solar para evitar que las sustancias sensibles a la luz se descompongan (Cargua, 2018). Luego se filtra el líquido con ayuda de una bomba, se recupera el solvente y se obtiene el extracto en un evaporador rotatorio (Gonzalez, 2004).

## **CAPÍTULO III.**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### ***3.1 Diseño experimental***

Nuestro trabajo fue desarrollado de manera experimental, ya que realizamos distintos ensayos con los que deseamos averiguar las propiedades de la especie *Commelina diffusa* contra el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis* mediante análisis fitoquímico para poder identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico de la especie y pruebas biológicas para indagar si contiene propiedades antimicrobianas, antifúngicas que contribuyan a erradicar el fitopatógeno, de ser así tendría la capacidad suficiente para desarrollar un bioproducto.

#### ***3.2 Búsqueda bibliográfica***

Se realizó la investigación con la ayuda de bases de datos como Scielo, Taylor and Francis, Springer, Enciclopedia de plantas útiles del Ecuador (De la Torre et al., 2008), Florecimiento del arte en la botánica Libro de la morfología floral del Bosque Protector “La Prosperina”, además de repositorios institucionales como el de Universidad Politécnica Salesiana (UPS) y Universidad Nacional de Colombia (UNAL), revistas científicas como “La Granja” y SCIRP, acerca de las especies vegetales que crecen en bosques secos y presenten antecedentes antimicrobianos o antifúngicos, puesto que nuestra investigación va centrada a la búsqueda de extractos vegetales que tengan potencial como biofungicida.

#### ***3.3 Zona de estudio***

Se realizó la búsqueda con respecto a especies que crezcan en bosques secos puesto que tenemos gran variedad de estos tipos de bosques en la zona de Guayaquil y uno de los más cercanos a nuestra institución al que pudimos acceder fue el bosque seco

cerro blanco, este pertenece a la cordillera colon colonche y tiene una extensa biodiversidad.

La recolección de la especie *Commelina diffusa* se dio en el mes de abril del año 2024 en Guayas, Guayaquil en el bosque seco protegido Cerro blanco con las coordenadas  $2^{\circ}11'3''\text{S } 79^{\circ}57'28''\text{O}$ , a 160 pies de altura, tal como se observa en la **Figura 3**. (Sinnhuber, 1959)(Raup, 1942)



*Figura 3. Coordenadas de la especie vegetal recolectada, tomada por Jarrín, Navas.*

Al momento de realizar el muestreo se recolectaron 3kg de la especie vegetal *Commelina diffusa* en bolsas negras, adicional se recolecto una segunda muestra de 1kg la cual se dividiría para estudios genéticos y la herborización de la especie, esta fue guardada en una funda ziploc, y ambas fueron previamente etiquetadas con fecha, origen y persona responsable, para ser trasladadas hasta el laboratorio de la facultad de ciencias naturales y matemáticas de Espol, donde se iba a desarrollar parte de la investigación.

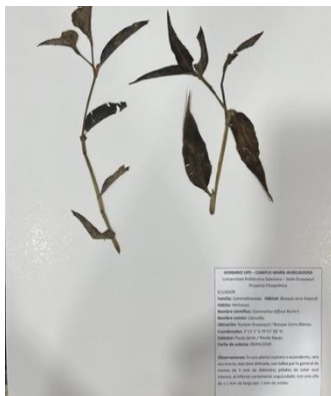
### 3.4 Herborización e identificación

Gracias a la búsqueda bibliográfica previamente realizada teníamos conocimiento de características típicas de la especie, sin embargo, para poder estar seguros de que era la correcta nos ayudamos de la aplicación PlanNet como herramienta de fácil acceso, de igual forma nos cercioramos nuevamente, pero esta vez con la opinión de una persona con amplio conocimiento en especies vegetales como lo es nuestro docente de carrera el Ing. Jaime Naranjo.

La herborización la realizaremos según el método de Linnaeus, el cual nos indica que, en una cartulina u hoja, en este caso usamos cartulina A3 coloquemos nuestro material previamente secado, como se observa en la **Figura 4**. este en lo posible debe ser hojas, ramas y frutos, las cuales prensaremos para su identificación morfológica, taxonómica y preservación (Stearn, 1976).



**Figura 5. Recolección de la especie vegetal *Commelina diffusa*, tomada por Jarrín, Navas.**



**Figura 4. Herborización de la especie vegetal *Commelina diffusa*, tomada por Jarrín, Navas.**

### ***3.5 Secado y molienda***

Una vez la especie vegetal se encontrará en el laboratorio esta tendría que ser deshojada, porque haríamos uso únicamente de sus hojas, estas se colocan en una estufa (Thermo scientific, modelo heratherm, 230 VCA) a una temperatura de 40°C durante 36 – 48 horas. Una vez estén secas pasan a ser molidas, para esto usaremos una licuadora previamente desinfectada, en la cual se pondrán alícuotas pequeñas del material seco, para que pueda triturarse de forma adecuada, este proceso se lo repitió hasta agotar el material disponible.

Al finalizar la molienda pasa a tamizarse, dispusimos de un tamiz # 20 para que la partícula pueda tener un tamaño uniforme u homogéneo para finalizar empaquetando y etiquetando las muestras en fundas selladas al vacío.

### ***3.6 Extracción y filtrado***

Para la obtención del extracto crudo, realizamos una solución metanol diclorometano en proporciones 1:1 con volumen de 500 ml. Seguido de esto, en una balanza analítica pesamos 25 gr del material vegetal pulverizado y seco.

Se vertió en un vaso beaker la solución metanol diclorometano junto con el material vegetal, al cual se le cubrió la superficie con aluminio, ya que realizaremos una extracción asistida por ultrasonido a 63 Hertz durante 20 minutos.

Mientras esperamos se arma el sistema para realizar la filtración al vacío, pasado el tiempo colocaremos la solución que contiene el vaso beaker dentro del embudo buchner , encendemos la bomba, que es quien nos brinda el efecto de vacío y se procede a filtrar, quedando así los sólidos en el papel filtro whatman n° 1 y la fracción líquida en nuestro Kitasato, el cual almacenamos en un frasco ámbar de 1000 ml previamente rotulado y mantenemos en refrigeración a una temperatura de –25 °C (Toma et al., 2001) (Ren et al., 2021).



### ***3.7 Extracción de solventes***

Al momento de usar nuestro extracto este debe estar libre de solventes, es por esto que por medio de la técnica de rotavaporación o evaporación al vacío eliminaremos el solvente y obtendremos el extracto puro.

Para esto dispondremos del rotavapor (Heidolph, modelo: HeiVAP Core), además usaremos un balón de destilación con volumen de 1 L en donde colocaremos la fracción obtenida previamente, está la insertaremos en la boca esmerilada del tubo evaporador y aseguramos, al mismo tiempo encendemos el baño maría y lo graduamos a una temperatura de 40° C, una vez este haya llegado a la temperatura deseada podemos sumergir el balón de destilación, encender el sistema de vacío en condiciones desde 200 mbar, el recirculador del condensador y empezar con la rotación.

Mantener la temperatura del condensador elevada es importante en este proceso y la presión se debe bajar gradualmente según va transcurriendo el tiempo, hasta que quede un volumen aproximado de 100 ml, en ese momento retiramos el balón y la solución restante la pasaremos a un balón de volumen de 250 ml, el cual debemos pesar para posteriormente calcular el rendimiento de la masa.

Colocamos nuevamente el balón de destilación y seguimos evaporando hasta llegar a un volumen alrededor de 10 ml, volvemos a retirar el balón y le agregamos 1.5 gr de fase reversa silica gel C18, el cual va a ayudar a que nuestro extracto llegue a sequedad (De València Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural - Escola Técnica Superior D'Enginyeria Agronòmica I del Medi Natural, 2020).

Una vez este se termine de rotavaporar almacenamos el solvente recuperado en un frasco ámbar etiquetado, a su vez guardaremos el balón de destilación y estos pasaran a una refrigeración de -25 °C hasta su posterior uso.

### 3.8 Purificación del extracto orgánico

Después de la etapa de extracción, el concentrado obtenido se analizó mediante cromatografía líquida al vacío (VLC), tal como se muestra en la **Figura 6**. (Targett et al., 1979).



*Figura 6. Extracción de extracto orgánico, tomada por Jarrín, Navas.*

En este proceso debemos preparar previamente las soluciones Agua tipo 1 y Metanol – Diclorometano en proporción 1:1 con volúmenes de 500 ml.

Para el montaje de nuestro sistema dispondremos de una bomba, quien dará el efecto de vacío, un matraz donde recolectaremos la fracción y una columna de fraccionamiento de 500 gr en donde se le agregará en la parte inferior un disco de papel filtro con los bordes doblados, después se colocará 200gr del reactivo fase reversa silica gel C18 y se empieza a adicionar Agua tipo 1 de forma continua y filtrar al vacío sin dejar que se seque, seguido adicionamos Metanol-Diclorometano 1:1 y filtramos al vacío sin dejar que se seque, nuevamente agregamos Agua tipo 1 y filtramos al vacío sin dejar que se seque, esto es un proceso previo para que el reactivo C18 se humecte o en forma de lavado.

Posterior a esto se coloca otro disco de papel filtro en donde se coloca la muestra que obtuvimos al rotavaporar y un disco de papel en la parte superior. En caso de que no se haya logrado sequedad por completo de su extracto realizar extracciones simultáneas por ultrasonido empleando el balón de destilación que contiene el extracto.

Posteriormente, adicionar la solución de Agua tipo 1 sobre la columna VLC, filtrar al vacío y obtener el extracto acuoso, el cual se recolectará en un frasco ámbar, se rotulará y almacenará.

Para poder lavar la columna de VLC se necesita una solución de metanol y diclorometano en proporción 1:1 y luego con acetona, de esta forma el reactivo restante C18 se puede volver a usar.

### ***3.9 Liofilización***

El liofilizador consta de varias fases como lo son congelador, calentamiento de la bomba de vacío, secado principal y secado final.

Se colocará el concentrado en una caja Petri previamente esterilizada y se lleva al ultra congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos, mientras preparamos el equipo, empezaremos por congelar la base del equipo por 30 minutos, para que al momento de colocar la muestra no exista un choque térmico.

Colocada la muestra procederemos a realizar el secado principal por un tiempo estimado de 4 horas y vacío de 0.040 mbar y una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C}$ , de igual forma se configura el secado final por un tiempo de 2 horas («Freeze-Drying/Lyophilization Of Pharmaceutical And Biological Products», 2016).

Con esto lo que se busca es eliminar los restos de agua interna que contiene el extracto, esta convierte el hielo en vapor y este es eliminado sin que pase por una fase líquida (Adams, 1991).

Terminado el proceso se debe sellar herméticamente y almacenar en un lugar cerrado para protegerlo de la humedad, ya que podría rehidratarse.

Este proceso conserva las propiedades, nutrientes, preserva la estructura celular y alarga la vida útil de nuestra muestra (Mujumdar, 2000) (Alzate & Eduardo, 2008).

### ***3.10 Tamizaje fitoquímico***

Ya obtenido el material liofilizado usaremos una alícuota del mismo para realizar las distintas pruebas del análisis fitoquímico.

Se colocó sílica gel dentro de un desecador para posteriormente ingresar el vial que contenía la muestra, este se mantuvo allí durante 15 minutos.

Luego de eso se realizó una dilución ya que disponíamos de poca cantidad de la muestra, realizamos distintos cálculos para poder agregar la cantidad de agua destilada correspondiente a la muestra.

Hicimos uso de la metodología dispuesta por el Manual de prácticas de laboratorio, farmacognosia y productos naturales (Cuéllar & Martínez, 2014), además de la investigación fitoquímica de otras especies (Dash, 2016).

#### *3.10.1 Prueba de alcaloides*

- Reacción de Mayer

Coloque tres gotas del extracto y tres gotas del reactivo de Mayer en un tubo de ensayo de 10 mL. En caso de que se forme un precipitado, se reportará que es positivo.

- Reacción de Dragendorff

Coloque tres gotas del extracto filtrado y tres gotas del reactivo en un tubo de ensayo de 10 mL. En caso de que se forme un precipitado de color naranja, rojo o marrón, se reportará como positivo.

- Reacción de Wagner

Coloque tres gotas del extracto filtrado y tres gotas del reactivo en un tubo de ensayo de 10 mL. En caso de que se forme un precipitado floculento color marrón al mezclarse con solución de alcaloides en ácido diluido se considerará positivo.

- Reacción de Hager

Coloque tres gotas del extracto filtrado y tres gotas del reactivo en un tubo de ensayo de 10 mL. En caso de que se forme un precipitado amorfo al mezclarse con la solución de alcaloides en ácido diluido se reportará como positivo.

### *3.10.2 Prueba de saponinas*

- Prueba del peróxido

Coloque tres gotas del extracto filtrado y dos gotas de peróxido de hidrógeno en un tubo de ensayo de 10 mL. Se calienta a 40 °C mientras se agita constantemente. En caso de aparición de espuma se valorará la presencia de saponinas y su concentración.

### *3.10.3 Prueba de lactonas sesquiterpénicas*

- Prueba legal

Coloque cuatro gotas del extracto, dos gotas de piridina, una gota de nitroprusiato de sodio al 5% y 4 gotas de KOH 2N en un tubo de ensayo de 10 mL. En caso de que presente un color rosa la prueba se considerara positiva.

- Prueba de baljet

La solución A se compone de 1 g de ácido pícrico en 100 ml de agua destilada. La solución B se forma al preparar una solución de hidróxido de potasio al 5%. La solución C se obtiene con la solución A y B en relación 1:1. Se considera la presencia del metabolito cuando se genera un color azul o violeta.

### 3.10.4 Prueba de flavonoides

- Prueba de Shinoda

Coloque tres gotas del extracto, dos cm de cinta de magnesio y cuatro gotas de HCl concentrado en un tubo de ensayo de 10 mL. Se identifica el tipo de metabolito secundario según la coloración de la reacción.

**Tabla 4.**

*Clasificación del metabolito secundario flavonoides con prueba Shinoda*

<b>Flavonoides</b>	<b>Rx coloración</b>
Flavonas	Naranja
Flavonoides	Rojo
Flavonoles	Rojo azulado
Flavononas	Verde
Flavononoles	Verde azulado
Xantanos	Violeta

*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

- Prueba de ácido sulfúrico

Coloque tres gotas de extracto y tres gotas de ácido sulfúrico grado reactivo (98%) en un tubo de ensayo de 10 mL. Se identifica el tipo de metabolito secundario según la coloración de la reacción.

**Tabla 5.**

*Clasificación del metabolito secundario flavonoides con prueba de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

<b>Flavoniodes</b>	<b>Rx coloración</b>
Chalconas	Rojo azulado
Auronas	Rojo guinda
Flavonas	Amarillo intenso
Flavononas	Naranja o guinda
Flavonoles	Amarillo intenso

*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

- Prueba de Zinc

Coloque tres gotas del extracto, 0.5 gramos de Zinc en polvo y cuatro gotas de HCl concentrado en un tubo de ensayo de 10 mL en un tubo de ensayo de 10 mL. Se identifica el tipo de metabolito secundario según la coloración de la reacción.

**Tabla 6.**

*Clasificación del metabolito secundario flavonoides con prueba de Zinc*

Flavonoides	Rx coloración
Leucoantocianidinas	Rojo
Catequinas	Cafe amarillento

*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

### 3.10.5 Prueba de cumarinas

- Prueba de fluorescencia

Coloque tres gotas del extracto y tres gotas de hidróxido de amonio al 10% en un tubo de ensayo de 10 mL. Realizar la prueba de la luz ultravioleta: tapan el tubo y exponer a diferentes longitudes de onda. Se identifica la presencia mediante coloración azul, verde o violeta fluorescente.

- Prueba de KOH (hidróxido de potasio)

Coloque tres gotas del extracto y tres gotas del KOH al 5% en un tubo de ensayo de 10 mL. En caso de presencia de cumarinas cambia la coloración a rojo o amarillo.

### 3.10.6 Prueba de carbohidratos

- Prueba de Fehling

El extracto se diluyó en 1-2 mL de agua destilada. Se colocaron 2 mL del reactivo de Fehling en un tubo de ensayo de 10 mL y se calentó la mezcla en un baño maría durante

5-10 minutos. En caso de que se torne de color rojo o aparezca un precipitado rojo, el ensayo se considerara positivo.

### ***3.11 Microdilución in vitro en placa multipocillo***

Para las pruebas biológicas usaremos el método de microdilución por placa de los cuales seguiremos estándares provenientes de la (CLSI) por sus siglas en inglés Clinical & laboratory Standards Institute Y The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (UECAST), instituciones las cuales validan métodos y nos permiten replicarlos. Como referencia usaremos el método para la determinación de concentraciones mínimas inhibitoras de agentes antifúngicos en diluciones en caldo para mohos formadores de conidios («EUCAST Technical Note On The Method For The Determination Of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations Of Antifungal Agents For Conidia-forming Moulds», 2008b).

#### ***3.11.1 Preparación del medio TSB***

Para realizar la microdilución en placa debemos realizar pasos previos como la esterilización y desinfección de nuestro material. Partiendo de esto lo primero a realizar es el medio de cultivo TSB, el cual usaremos para inocular nuestro hongo *Mycosphaerella fijiensis*, necesitaremos pesar 3g del reactivo en polvo en 100 ml de agua destilada, este lo pondremos a diluir en una plancha calentadora, hasta que se disuelva por completo, dentro de un área aséptica se dispensara 10 ml del medio de cultivo en 8 tubos de ensayo con tapa, estos se llevaran al autoclave al igual que el restante medio de cultivo a temperatura de 121 °C durante 1 hora.

#### ***3.11.2 Inoculación del hongo***

Disponíamos de una resiembra de *Mycosphaerella fijiensis*, sin embargo, esta se encontraba en un medio sólido y la necesitaríamos en medio líquido por lo cual se la cultivo en medio TSB previamente realizado, dentro de la cabina de flujo laminar se inóculo el hongo haciendo cortes de 0.5 cm, estos se incubaron a 27 °C durante 3 días.



Pasado el tiempo se debía agitar durante 48 horas bajo las mismas condiciones en el equipo Heidolph (Unimax 1010, Incubator 1000 heating mode ).

### *3.11.3 Preparación de Controles*

Necesitaremos preparar las siguientes soluciones al 10%, como control positivo sintético, usamos una mezcla de antibióticos comerciales penicilina y estreptomina, y adicionalmente estreptomina únicamente de las cuales se tomó 100  $\mu$ L y se adiciono en un frasco ámbar junto con 900  $\mu$ L de DMSO, de esta forma obtenemos un volumen de 1 ml, como control positivo natural usamos terpineol, de igual forma preparamos un volumen final de 1 ml en las mismas proporciones. Todas las soluciones deben homogeneizarse, después los frascos ámbar tienen que ser rotulados y almacenados en refrigeración hasta su uso posterior.

### *3.11.4 Preparación del colorante TTC*

Se preparo la solución de TTC al 1% con 24 horas de anticipación, para esto dispusimos de un tubo falcón de 15 ml en donde disolvimos 100mg de TTC de grado analítico en 10ml de etanol al 50%, este es sensible a la luz por lo que se envolvió en papel aluminio y se refrigero hasta su uso.

### *3.11.5 Estandarización del inóculo*

Pasado el tiempo mencionado anteriormente se visualiza el crecimiento del microorganismo dentro de los tubos de ensayo, este se agita en el vortex durante 2 minutos para homogeneizar la muestra.

La estandarización se realizó mediante el espectrofotómetro (HACH DR 6000) a una longitud de onda de 530 nm, esto con la finalidad de ajustar la densidad óptica a una concentración de  $2 \times 10^4$  cells/mL, añadiendo de esta forma TSB gradualmente hasta poder llegar a la concentración deseada.

### 3.11.6 Inoculación en placa multipocillo

Debemos preparar una dilución seriada para observar el comportamiento antifúngico en las microplacas de 96 pocillos, hasta un volumen final de 120  $\mu\text{L}$ . Con la ayuda de una micropipeta dispensaremos 180  $\mu\text{L}$  del medio TSB en la fila A, columna (1,2,3,5,6,7,9,12). De la fila B – H se dispensaron 100  $\mu\text{L}$  en las mismas columnas, mientras que la columna 4, 8 y 10 quedan vacías para prevenir contaminación entre los pocillos y en la columna 11 se dispensaría DMSO.

En las columnas 1, 2 y 3 se agregó 20  $\mu\text{L}$  de nuestro extracto orgánico, en la columna 5, 6 y 7 se agregó 20  $\mu\text{L}$  de nuestros antibióticos sintéticos y natural, de esta forma podemos empezar con las diluciones empezando en los pocillos de la fila A con un volumen de 200  $\mu\text{L}$  resuspendemos y tomamos 100  $\mu\text{L}$  de forma descendente hasta el último pocillo en el cual descartamos los últimos 100  $\mu\text{L}$  restantes.

Por último, agregaremos 20  $\mu\text{L}$  del inóculo previamente estandarizado en todos los pocillos menos en la columna 9 y en los pocillos vacíos. Envolvemos las placas en papel aluminio ya que el DMSO es sensible a la luz y este se incuba con una agitación orbital de 60 rpm durante 48h mínimo a una temperatura de 27 °C para que el microorganismo crezca de forma óptima.

La distribución se dio de la siguiente forma, donde en las columnas 1, 2 y 3 evaluaremos la eficiencia de nuestro extracto, en las columnas 5, 6 y 7 se agrega el antibiótico, columna 9 TSB en este caso lo usamos como control blanco, en la columna 11 se agregó DMSO como control negativo y en la columna 12 TSB más inóculo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I
B	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I
C	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I
D	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I
E	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I
F	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I
G	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I
H	E. O	E. O	E. O		P+S	T	S		TSB		DMSO	TSB+I

Figura 7. Protocolo de microdilución en placa multipocillos. Elaborado por Navas, Jarrín.

Transcurridas las 48 horas, se agregó 10  $\mu\text{L}$  de la solución TTC al 10 % en todos los pocillos excepto en los vacíos, esta placa luego paso a incubarse en agitación a 60 rpm con temperatura de 27 °C durante 10 minutos, de igual forma este se envolvió en papel aluminio ya que la solución de TTC es fotosensible.

### 3.11.7 Lectura de microplaca

Se pueden observar cambios en la coloración de los pocillos, esto es debido a la reacción redox del TTC producida por la actividad celular presente. A partir de esto verificaremos de forma cuantitativa la concentración mínima inhibitoria.

Mediante el lector de microplacas Thermo Scientific (Multiskan FC) se realizó la lectura de la placa multipocillo a una de onda de 450 nm, se configuro el equipo según el orden de las muestras, siendo de color azul o celeste el compuesto desconocido y de color amarillo lo que se identifica como mis controles.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Desconocido001 1:1 Grupo 1	Desconocido009 1:1 Grupo 1	Desconocido011 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido023 1:1 Grupo 1	Desconocido033 1:1 Grupo 1	Desconocido041 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control009 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control017 Grupo 1	Control001 Grupo 1
B	Desconocido002 1:1 Grupo 1	Desconocido010 1:1 Grupo 1	Desconocido016 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido026 1:1 Grupo 1	Desconocido034 1:1 Grupo 1	Desconocido042 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control010 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control018 Grupo 1	Control002 Grupo 1
C	Desconocido003 1:1 Grupo 1	Desconocido011 1:1 Grupo 1	Desconocido019 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido027 1:1 Grupo 1	Desconocido035 1:1 Grupo 1	Desconocido043 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control011 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control019 Grupo 1	Control003 Grupo 1
D	Desconocido004 1:1 Grupo 1	Desconocido012 1:1 Grupo 1	Desconocido020 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido028 1:1 Grupo 1	Desconocido036 1:1 Grupo 1	Desconocido044 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control012 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control020 Grupo 1	Control004 Grupo 1
E	Desconocido005 1:1 Grupo 1	Desconocido013 1:1 Grupo 1	Desconocido021 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido029 1:1 Grupo 1	Desconocido037 1:1 Grupo 1	Desconocido045 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control013 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control021 Grupo 1	Control005 Grupo 1
F	Desconocido006 1:1 Grupo 1	Desconocido014 1:1 Grupo 1	Desconocido022 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido030 1:1 Grupo 1	Desconocido038 1:1 Grupo 1	Desconocido046 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control014 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control022 Grupo 1	Control006 Grupo 1
G	Desconocido007 1:1 Grupo 1	Desconocido015 1:1 Grupo 1	Desconocido023 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido031 1:1 Grupo 1	Desconocido039 1:1 Grupo 1	Desconocido047 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control015 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control023 Grupo 1	Control007 Grupo 1
H	Desconocido008 1:1 Grupo 1	Desconocido016 1:1 Grupo 1	Desconocido024 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Desconocido032 1:1 Grupo 1	Desconocido040 1:1 Grupo 1	Desconocido048 1:1 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control016 Grupo 1	Blanco1 Grupo 1	Control024 Grupo 1	Control008 Grupo 1

Figura 8. Diseño experimental para la maquina multiskan FC. Elaborado por Navas, Jarrín.

Para poder obtener los valores de la concentración mínima inhibitoria se deben emplear distintos datos.

Una vez se haya leído la placa el sistema lanza los resultados, estos serán nuestros datos, además de la longitud de onda y las cantidades usadas en la práctica empleada.

Con la formula:

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \left( \frac{AA}{AB} \right) \times 100$$

Donde:

AA: Absorbancia del pocillo que contiene la muestra (sustancia de interés + microorganismo).

AB: Absorbancia del control (microorganismo +TTC, sin la muestra de interés).

## CAPÍTULO IV.

### RESULTADOS Y DISCUSIONES

#### 4.1 Resultados

##### 4.1.1 Tamizaje fitoquímico

Se desarrollaron las pruebas de tamizaje fitoquímico en el extracto orgánico de las hojas de la especie vegetal *Commelina diffusa*, para analizar si había presencia de alcaloides, saponinas, lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, cumarinas y carbohidratos. Para ello se evaluó la presencia del metabolito, utilizando la siguiente simbología: ausencia (-), presencia leve (+), presencia moderada (++) y presencia abundante (+++).

**Tabla 7.**

*Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito alcaloide realizado al extracto orgánico de las hojas de Commelina diffusa*

Tamizaje fitoquímico	Metabolito a analizar	Extracto orgánico (hojas)
Mayer	Alcaloides	+
Wagner	Alcaloides	++
Dragendorff	Alcaloides	-
Hager	Alcaloides	-

*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

Se empezó por el análisis de alcaloides con **Tabla 7** el reactivo Mayer se logró observar dentro del tubo de ensayo un leve precipitado, lo que nos sugiere la presencia leve (+) de alcaloides. Asimismo, para el reactivo Wagner se observó presencia moderada (++) de alcaloides debido a su precipitado marrón naranjado. Sin embargo, los métodos de detección de Dragendorff y Hager, mostraron resultados diferentes, al mezclar cada reactivo con el extracto no mostró ningún cambio de color, de hecho, ambos

permanecieron incoloros, por lo que nos indica que no hay presencia de alcaloides (-) tal como se observa en la **Figura 9**.



*Figura 9. Resultados de alcaloides, tomada por Jarrín, Navas.*

### **Tabla 8.**

*Resultados tamizaje fitoquímico del metabolito saponina realizado al extracto orgánico de la hoja de *Commelina diffusa**

<b>Tamizaje fitoquímico</b>	<b>Metabolito a analizar</b>	<b>Extracto orgánico (Hojas)</b>
Peróxido de Hidrógeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Saponinas	-

*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

En el ensayo de saponinas **Tabla 8**, se observó una ausencia (-) según el método de Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) debido a que no hubo la aparición de espuma luego del baño María a 40 °C, tal como se observa en la **Figura 10**.



*Figura 10. Resultados de saponinas, tomada por Jarrín, Navas.*

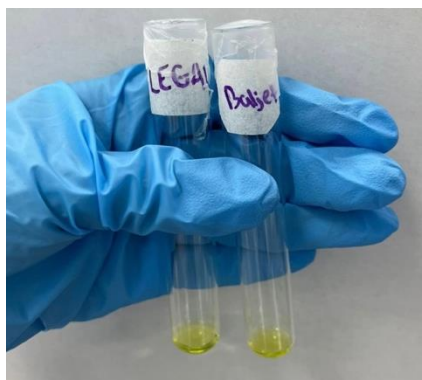
**Tabla 9.**

*Resultados del tamizaje fitoquímico para lactonas sesquiterpénicas y aglicona esteroidal del extracto orgánico de las hojas de Commelina diffusa*

<b>Tamizaje fitoquímico</b>	<b>Metabolito a analizar</b>	<b>Extracto orgánico (Hojas)</b>
Legal	Lactonas sesquiterpénicas	-
Baljet	Aglicona esteroidal	-

*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

Para analizar la presencia de lactonas sesquiterpénicas **Tabla 9** se llevó a cabo la prueba de Legal, en vista de que no se presencié el cambio de color a rosa, sino a amarillo, tal como se observa en la, se reporta la ausencia (-) de lactonas sesquiterpénicas, asimismo, con la prueba de Baljet no hubo presencia de color azul o violeta, sino amarillo, por lo que también se reporta la ausencia (-) de aglicona esteroidal.



*Figura 11. Resultados de lactonas sesquiterpénicas, tomada por Jarrín, Navas.*

**Tabla 10.**

*Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito flavonoide realizado al extracto orgánico de las hojas de Commelina diffusa*

<b>Tamizaje fitoquímico</b>	<b>Metabolito a analizar</b>	<b>Extracto orgánico (Hojas)</b>
Shinoda	Flavonoides	Flavonas +
Ácido Sulfúrico	Flavonoides	Flavonona +
Zinc	Flavonoides	-

*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

Seguido de ese tamizaje, según la **Tabla 10** se realizó las pruebas Shinoda, Ácido sulfúrico y Zinc respectivamente, para corroborar la presencia de flavonoides en el extracto orgánico de las hojas. La prueba de Shinoda nos arroja un color naranja claro, lo que nos sugiere la presencia leve (+) de Flavonas como metabolito secundario, asimismo, la prueba de ácido sulfúrico nos arroja unas manchas de color naranja claro, por lo que nos sugiere la presencia leve (+) de Flavonona, como se logra ver en la **Figura 12**, por el contrario, con la prueba de Zinc no se ve presencia de color rojo ni café amarillento, por lo que no hay presencia (-) de leucoantocianidinas y catequinas respectivamente, lo que sí es que presenta un color gris por el Zinc.



*Figura 12. Resultados de flavonoides, tomada por Jarrín, Navas.*

**Tabla 11.**

*Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito cumarina realizado al extracto orgánico de las hojas de *Commelina diffusa**

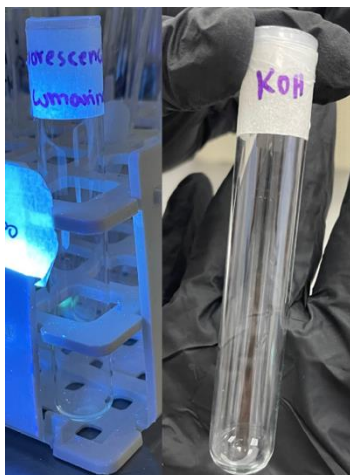
Tamizaje Fitoquímico	Metabolito a analizar	Extracto orgánico (Hojas)
Fluorescencia	Cumarinas	-
Hidróxido de potasio (KOH)	Cumarinas	-

**Nota.** Elaborado por Jarrín, Navas.

Por otro lado, para lograr considerar la presencia de cumarinas en nuestra muestra **Tabla 11**, se realizó la prueba de fluorescencia, debió arrojar un color azul, verde o violeta fluorescente, con ayuda de una linterna fluorescente, no se logró visualizar ninguno de los tres colores mencionados, lo cual demuestra la ausencia (-) de cumarinas. De igual forma, se ejecutó la prueba de hidróxido de potasio, la cual debía presentar un color rojo-



amarillo, en vista de que quedó incoloro el resultado como se logra ver en la **Figura 13**, se reporta también como ausencia (-) para prueba de KOH.



*Figura 13. Resultados de cumarinas, elaborado por Jarrín, Navas.*

### Tabla 12.

*Resultados del tamizaje fitoquímico del metabolito carbohidrato realizado al extracto orgánico de las hojas de *Commelina diffusa**

Tamizaje fitoquímico	Metabolito a analizar	Extracto orgánico (Hojas)
Fehling	Carbohidratos	-

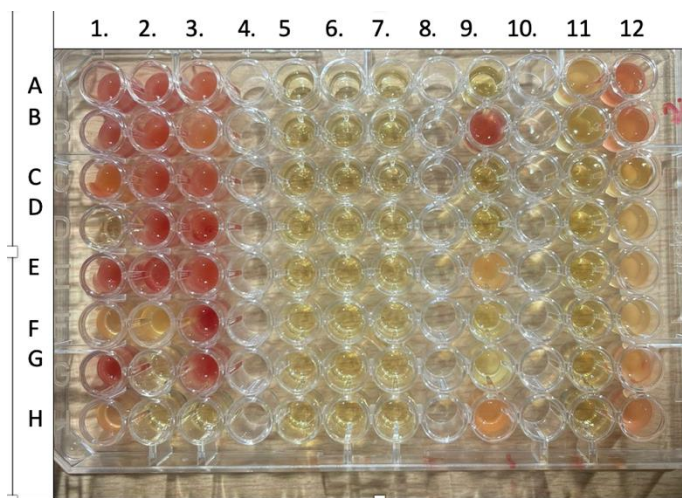
*Nota.* Elaborado por Jarrín, Navas.

Por último, para la prueba de carbohidratos **Tabla 12**, se utilizó el reactivo de Fehling, al presentarse un color celeste, esto indica la ausencia (-) de carbohidratos en nuestro extracto orgánico, ya que no se visualizó un color rojo, como se contempla en la **Figura 14**.



*Figura 14. Resultados de carbohidratos, tomada por Jarrín, Navas.*

#### 4.1.2 Microdilución in vitro en placa multipocillos



**Figura 15. Resultados de microdilución in vitro en placa multipocillo, tomada por Jarrín, Navas.**

Pasadas las 48 horas de incubación, como se mencionó anteriormente, se agregaron 10 ml del preparado de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) en los pocillos, excepto en los vacíos (Columna 4, 8,10), se dejó incubar por 10 minutos en agitación de 60 rpm. De la columna 1 a la 3 (TSB, extracto vegetal, inóculo), los pocillos presentan un color rojizo hasta la fila G, esto indica la presencia de actividad metabólica del hongo por lo tanto, podemos decir que el extracto vegetal no inhibió el crecimiento del fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*, sin embargo en los pocillos de la fila H de la columna 2 y 3 muestra un color amarillento, al igual que el pocillo G de la columna 2, lo que quiere decir que no hay actividad metabólica del hongo, lo que sugiere una inhibición del crecimiento fúngico.

La columna 5 (Penicilina + Estreptomina + TSB + inóculo), el cual fue mi control positivo sintético, podemos deducir que el tratamiento con este antibiótico contra el fitopatógeno es efectivo ya que muestra una coloración amarillenta, es decir, no hubo cambio de color, inhibió el crecimiento del hongo. Asimismo, la columna 6 (Terpineol + TSB + inóculo) el cual fue mi control positivo natural, también mostro efectividad contra el hongo, inhibió el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis*, no hubo cambio de color, permaneció amarillento. De la misma forma, la columna 7 (Estreptomina + TSB + inóculo) el cual fue también mi control positivo sintético, permanece de color amarillo, por lo que logró inhibir el crecimiento del hongo.

La columna 9 (únicamente TSB), la cual nos sirvió como control blanco, el pocillo A mostró un color rojizo, esto quiere decir que hubo actividad metabólica, sin embargo, al no haber puesto inóculo, este cambio de color puede significar una contaminación cruzada o error de pipeteo, al igual que el pocillo E y H.

Por otro lado, la columna 11 (DMSO + inóculo) fue utilizado como control negativo, en el pocillo A se observa un ligero color rosa lo que indica que hay actividad metabólica, el DMSO no ha inhibido el crecimiento del hongo, los pocillos restantes no tuvieron cambio de color, permanecieron amarillos, lo que quiere decir que el DMSO tuvo efecto inhibitor. La columna 12 (TSB + inóculo), la cual nos sirvió como control positivo, el pocillo A, B, G y H mostraron un color rosado, lo que indica que hubo crecimiento del hongo, mientras que los pocillos C, D, E y F muestra un color entre amarillento y rosa, esto nos podría indicar que igual hubo un crecimiento del hongo, pero no en gran cantidad.

## **4.2 Discusiones**

En la investigación del tamizaje fitoquímico resultó positiva la prueba de alcaloides empleando Mayer y Wagner, dio negativa Dragendorff y Hager. Según Mahmood et al. (2020) en un estudio fitoquímico del principio activo de la *Commelina* como uso helmítico para cerdos en Benum encontró la presencia de alcaloides proponiendo más estudios para determinar su eficacia contra microorganismos patógenos, concordando la presencia de alcaloides en la *Commelina*.

Por otro lado, para la prueba de saponinas, para el cual fue usado peróxido de hidrógeno, no hubo aparición de espuma luego del baño María, corroboramos el resultado con la investigación de Islam et al. (2021), su extracto orgánico de *Commelina diffusa* con el peróxido también presentó ausencia de saponinas. Sin embargo, según la investigación de Peduruhewa et al. (2021), en el extracto etanólico de *Commelina diffusa* si obtuvo presencia de saponinas.

Recordemos que la estructura química de la saponina cuenta con dos partes esenciales, por un lado, la parte conocida como aglicona o sapogenina es una estructura

hidrofóbica (no polar) que puede ser triterpenoide o esteroide y los glúcidos hidrofílicos (polar) son el otro componente adicional de su estructura, esta estructura permite que se disuelvan en diferentes tipos de solvente, sin embargo, debido a su naturaleza compleja, algunas saponinas no suelen ser muy solubles en agua (solvente altamente polar), el etanol por otro lado, es un solvente moderadamente polar capaz de disolver tanto compuestos polares como ligeramente apolares, las saponinas por su estructura anfipática suelen ser más solubles en etanol que en agua pura (Chi et al., 2022).

El siguiente metabolito analizado fueron los flavonoides, para esto se realizó la prueba de Shinoda, Ácido Sulfúrico y Zinc, los cuales dieron como resultado positivo para flavonas, positivo para flavononas y negativo en la prueba de Zinc, se verificó el resultado con la investigación de Mensah et al. (2014), ellos también observaron la presencia de flavonoides en la especie *Commelina diffusa*, al igual que Adoho et al. (2022) que identificó flavonoides en *Commelina diffusa*, concordando con los autores mencionados en la presencia de flavonoides en la especie vegetal *Commelina diffusa*.

De igual forma, para analizar el metabolito cumarina, se realizaron las pruebas de Fluorescencia e Hidróxido de potasio (KOH), ambas pruebas resultaron negativas, se puede verificar ambos resultados con la investigación de Peduruhewa et al. (2021), ellos al realizar el tamizaje fitoquímico reportaron que en su extracto orgánico de las hojas de *Commelina diffusa* no hubo presencia de cumarinas, por el contrario, en su extracto etanólico si hubo presencia de cumarinas, esto puede deberse a la estructura anfipática de las cumarinas y la polaridad intermedia del etanol (Peduruhewa et al., 2021).

Por otra parte, para la detección del metabolito carbohidrato se realizó la prueba de Fehling, nos arrojó un resultado negativo, en la investigación realizada por Kamble (2019), aseguran que el extracto orgánico de las hojas de *Commelina diffusa*, presentan un 6,32% de carbohidratos, lo que sugiere que no hay una gran presencia de esta biomolécula (Kamble, 2019). La diferencia de resultados puede ser debido al estadio del desarrollo de nuestra planta, asimismo, a la época del año donde se realizó la recolección de la especie.

La técnica de microdilución *in vitro* en placa de multipocillos, aunque es un método establecido principalmente para organismos de interés médico, dermatológico e

infeccioso, es menos convencional para ciertos microorganismos, como hongos, mohos o levaduras no dermatológicas. De acuerdo con (C. C. Méndez et al., 2019), la mayoría de los protocolos estándar se centran en aplicaciones médicas. No obstante, existen directrices específicas para la evaluación de hongos y otros organismos no dermatológicos, en las cuales nos basamos para este estudio.

El presente trabajo fue de carácter experimental, enfocado en analizar la viabilidad de implementar esta técnica en estudios que no están estrictamente ligados al ámbito médico, como en el caso de hongos del género *Fusarium* (Lage et al., 2013). A pesar de su enfoque experimental, seguimos las estandarizaciones propuestas por el CLSI y EUCAST, adaptando la metodología a los requerimientos específicos del estudio.

Tradicionalmente, métodos como la difusión en agar, la macrodilución y los discos de Bauer-Kirby han sido preferidos para este tipo de análisis (J. Méndez & Herrera, 2001). Sin embargo, investigaciones recientes sugieren que los extractos vegetales poseen una notable capacidad para sintetizar otros organismos, probablemente debido a sus mecanismos de defensa naturales (Mesa et al., 2019). Esto resalta la importancia de continuar explorando y perfeccionando metodologías que permitan evaluar de manera precisa la eficacia de estos extractos frente a fitopatógenos, con el objetivo de avanzar en el desarrollo de nuevos bioproductos.

## CAPÍTULO V.

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Se logró obtener el extracto orgánico a través de cromatografía líquida al vacío de las hojas de la especie *Commelina diffusa*, se consiguió al realizar una previa identificación, herborización, secado, molienda, extracción asistida, filtrado y extracción de solventes.

El análisis fitoquímico del extracto orgánico detectó la presencia de flavonoides empleando Shinoda, ácido sulfúrico y alcaloides utilizando Mayer y Wagner. Dieron negativos saponinas, lactonas, sesquiterpenos, cumarinas, lactonas, Dragendorff.

Resultado negativa la prueba de actividad biológica del extracto orgánico de la especie *Commelina diffusa*, sobre *Mycosphaerella fijiensis* mediante la microdilución en placa *in vitro*, por lo que, se acepta la hipótesis nula, el extracto orgánico de la especie vegetal *Commelina diffusa* no presenta acción antifúngica contra el fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis* y se rechaza la hipótesis alternativa.

#### 5.2 Recomendaciones

Se sugiere realizar futuras investigaciones de los componentes flavonoides y alcaloides obtenidos del tamizaje fitoquímico, empleando espectrofotómetros de masas para la elaboración de espectros permitiendo la identificación de estructura química para posterior uso.

Es importante seguir estudiando las propiedades biológicas de la *Commelina diffusa* con otros microorganismos diferentes de *Mycosphaerella fijiensis*, e investigar su aplicación en la industria agrícola.

Deben emplearse otros sistemas de solventes en volúmenes diferentes para separar metabolitos activos para ser analizados mediante análisis fitoquímico y biológicos, permitiendo la formulación de nuevos biopesticidas para el desarrollo de cultivos orgánicos, protegiendo la salud humana y el medio ambiente.

Se sugiere propagar de manera *in vitro* la especie vegetal *Commelina diffusa*, para así poder trabajar con material vegetal de diferentes estadios de desarrollo, al igual que con mayor cantidad de muestra, y seguir un estricto protocolo de optimización de análisis de tamizaje fitoquímico y propiedades biológicas.

Podemos agregar que esta técnica es muy prometedora, sin embargo, hay que seguir investigando sobre sus aplicaciones a los distintos tipos de microorganismos, ya que alegamos existen limitaciones en los estándares actuales.

## CAPÍTULO VI.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adoho, A., Konmy, B., Olounladé, P., Azando, E., Hounzangbé-Adoté, M., & Gbangboché, A. (2022). Phytochemistry and Larval Toxicity of *Ipomea asarifolia*, *Commelina diffusa*, *Acalypha ciliata* and *Eleusine indica* against *Artemia salina*. *International Journal Of Veterinary Science*, 11(2), 121-128. <https://doi.org/10.47278/journal.ijvs/2021.098>
- Agrios, G. (1996). *Fitopatología*. México DF.: UTEHA.
- Agrocalidad. (2018). *Directrices Para Informar La Ejecución De Eventos Agrícolas Y Visitas Provenientes Del Exterior Como Medida De Prevención Del Ingreso De Fusarium Oxysporum F. Sp. Cubense Raza 4 Tropical A Ecuador*. Ecuador.
- Andrade, E. (2014). Guía de buenas prácticas agrícolas para banano. *Agrocalidad*, 84. *banano* (Master's thesis).
- Barekye, A., Tongoona, P., Derera, J., Laing, M. D., & Tushemereirwe, W. K. (2011). Appraisal of methods for assessing black Sigatoka resistance in diploid banana populations. *African Journal Of Plant Science*, 5(15), 900-908. <https://doi.org/10.5897/ajps10.207>
- Barrea, L., & García, L. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Instituto politécnico nacional*, 9.
- Batallas, E. (2015). Caracterización Morfológica De Hongos Fitopatógenos En El Cultivo De Banano (*Musa Paradisiaca* L.) Sector Los Laureles, Cantón La Maná, Cotopaxi 2015. *Unidad Académica De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales*, 86.
- Belalcazar, S. (1991). *El cultivo del plátano (Musa AAB Simmonds) en el trópico*. Cali: Feriva Ltda.
- Canto, B. (2012). Presencia de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, en desechos vegetales en las plantaciones. Identificación de reservorios. *Innovaciones para el manejo integrado en campo de la Sigatoka negra en México. Aportaciones de la investigación básica*, 49.
- Cargua, R. (2018). Actividad Antifúngica Del Extracto Alcohólico Y Aceite Esencial De *Plantago Major* (Llantén) Frente A *Candida Albicans*. *Universidad Regional*



*Autónoma De Los Andes.*  
<https://dspace.uniandes.edu.ec/bitstream/123456789/8788/1/PIUAMFCH020-2018.pdf>

- Carlier, J., Lebrun, M. H., Zapater, M. F., Dubois, C., & Mourichon, X. (1996). Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*, 5(4), 499-510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1996.tb00342.x>
- Castro, L. L. (2009). Valoración del potencial de frutos de tres musáceas para la producción de alcohol a nivel de laboratorio. 93.
- Cavichi, L. V., Liberal, Â., Dias, M. I., Mandim, F., Pinela, J., Kostić, M., Soković, M., Kalschne, D. L., Fernandes, Â., Canan, C., Barros, L., & Amaral, J. S. (2023). Chemical Composition and Biological Activity of *Commelina erecta*: An Edible Wild Plant Consumed in Brazil. *Foods*, 12(1), 192. <https://doi.org/10.3390/foods12010192>
- Cayón, G., Belalcázar, S., & Lozada, J. (1998). Ecofisiología del plátano (*Musa AAB* Simmonds). *Agrosavia*, 16.
- Centeno, C. B., & Carrea, C. J. (2013, junio). *Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de Melissa officinalis (Lamiaceae) sobre Aspergillus flavus*. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-01622013000200008](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-01622013000200008)
- Chacón, V. (2019). Evaluación De La Actividad Antimicrobiana Del Extracto Hidroetanólico De Hojas, Semillas Y Flores De Bauhinia Forficata En Cepas De Escherichia coli, Staphylococo aureus Y Pseudomona aeruginosa. *Universidad Regional Autónoma de los Andes*, 82.
- Chi, G. J. G., Mendoza, J. L., Franco, Y. L., Mata, M. L., & Cota, L. Q. (2022). Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de Yucca: una revisión. *BIOTecnia*, 25(1), 147-155. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1800>
- Chillet, M., Abadie, C., Hubert, O., Chilin-Charles, Y., & De Lapeyre de Bellaire, L. (2009). Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. *Crop Protection*, 28(1), 41-45. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.08.008>
- Churchill, A. C. L. (2010). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307-328. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00672.x>

- Coll, J. C., & Bowden, B. F. (1986). The Application of Vacuum Liquid Chromatography to the Separation of Terpene Mixtures. *Journal Of Natural Products*, 49(5), 934-936. <https://doi.org/10.1021/np50047a033>
- COMEX. (2017). *Informe sector bananero ecuatoriano*. Quito.
- CropLife Latin America, C. L. (2024, 29 enero). *Sigokota negra en plátano: ciclo de vida, nombre científico y fungicidas* - CropLife Latin America. Croplifela.org. <https://croplifela.org/es/plagas/listado-de-plagas/sigatoka-negra>
- Crops Production And Trade Statistics. (2024). *FAOSTAT*. Recuperado 18 de julio de 2024, de <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>
- Cuéllar, A., & Martínez, M. M. (2014). *Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales*. Plaza de la Revolución: Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela.
- Davicino, R., Mattar, M. A., Casali, Y. A., Correa, S. G., Pettenati, E. M., & Micalizzi, B. (2007, diciembre). *Actividad antifúngica de extractos de plantas usadas en medicina popular en Argentina*. Recuperado 17 de julio de 2024, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332007000300011](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332007000300011)
- De Lapeyre de Bellaire, L., Fouré, E., Abadie, C., & Carlier, J. (2010). Black Leaf Streak Disease is challenging the banana industry. *Fruits*, 65(6), 327-342. <https://doi.org/10.1051/fruits/2010034>
- De València Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural - Escola Tècnica Superior D'Enginyeria Agronòmica I del Medi Natural, U. P. (2020, 9 noviembre). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/51363>
- Evans, E. A., Ballen, F. H., & Siddiq, M. (2020). Banana production, global trade, consumption trends, postharvest handling, and processing. *Banana Production, Postharvest Science, Processing Technology, And Nutrition*, 1-18. <https://doi.org/10.1002/9781119528265.ch1>
- Faden, R. B. (1998). Commelinaceae. En *Springer eBooks* (pp. 109-128). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-03531-3\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-662-03531-3_12)
- FAO. (2019). *Banana Statistical Compendium 2018*. Roma.
- FAO. (2020). Análisis del mercado del banano Panorama general de febrero de 2020. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 4.

- FRAC. (2019). Clasificación de fungicidas y bactericidas según el modo de acción. *FRAC*, 28.
- Fullerton, R. A., & Casonato, S. G. (2019). The infection of the fruit of 'Cavendish' banana by *Pseudocercospora fijiensis*, cause of black leaf streak (black Sigatoka). *European Journal Of Plant Pathology*, 155(3), 779-787. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01807-x>
- Fundamentos teórico-prácticos de Química orgánica.* (s. f.). [https://kupdf.net/download/fundamentos-te-oacute-rico-pr-aacute-cticos-de-qu-iacute-mica-org-aacute-nica\\_5901faf3dc0d607a3d959e9a\\_pdf](https://kupdf.net/download/fundamentos-te-oacute-rico-pr-aacute-cticos-de-qu-iacute-mica-org-aacute-nica_5901faf3dc0d607a3d959e9a_pdf)
- Gajurel, J. P., & Shrestha, k. K. (2009). Taxonomy of the genus *Commelina* Plum. ex L. (Commelinaceae) in Nepal. *Botanica Orientalis Journal of Plant Science*, 7.
- Gonzalez, A. (2004). Obtención De Aceites Esenciales Y Extractos Etanolicos De Plantas Del Amazonas. *Universidad Nacional De Colombia*. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/2800>
- Grayer, R. J., & Harborne, J. B. (1994). A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982–1993. *Phytochemistry*, 37(1), 19-42. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)85005-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)85005-4)
- Gregorí Valdés, G. V. B. (2005, mayo). *Estructura y actividad de los antifúngicos*. Recuperado 17 de julio de 2024, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000200012#:~:text=Los%20antif%C3%BAngicos%20que%20act%C3%BAan%20sobre,osm%C3%B3tico%2C%20por%20lo%20que%20muere](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012#:~:text=Los%20antif%C3%BAngicos%20que%20act%C3%BAan%20sobre,osm%C3%B3tico%2C%20por%20lo%20que%20muere).
- Guzmán, M. (2012). Control biológico y cultural de la Sigatoka-negra. *Tropical Plant Pathology*, 5.
- Hernández, L. M. (2009). El plátano Un cultivo tradicional con importancia nutricional. *Fuerza Farmacéutica*, 4.
- Holm, L. G. (1977). *The world's worst weeds: Distribution and Biology*. University Press of Hawaii.
- Ibrahim, J., Ajaegbu, V. C., & Egharevba, H. O. (2010, 1 mayo). *Pharmacognostic and phytochemical analysis of Commelina benghalensis L.* OpenSIUC. Recuperado 12 de julio de 2024, de <https://opensiuc.lib.siu.edu/ebl/vol2010/iss5/7>
- Intagri. (2018). Manejo de la Sigatoka negra en banano. *Intagri*, 5.
- Islam, M. M., Rahman, M., Asaduzzaman, M., & Ali, M. S. (2021). Antioxidant, Analgesic and CNS Depressant Activities of *Commelina diffusa* Burm. f. *The*

- Dhaka University Journal Of Pharmaceutical Sciences*, 20(2), 159-166.  
<https://doi.org/10.3329/dujps.v20i2.57166>
- Kamble, S. (2019). Nutraceutical Investigations of *Commelina diffusa* Burm. F. Leaves- A Popular Wild Vegetable. *Plantae Scientia*, 2(3), 34-39.  
<https://doi.org/10.32439/ps.v2i3.34-39>
- Kaur, R., Nishtha, N., & Kumar, J. (2023). Phytochemical screening, antioxidant activity and metal binding studies on floral extracts of *Euphorbia milii*. *Materials Today Proceedings*. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2023.03.444>
- Khan, B. A., Nadeem, M. A., Nawaz, H., Amin, M. M., Abbasi, G. H., Nadeem, M., Ali, M., Ameen, M., Javaid, M. M., Maqbool, R., Ikram, M., & Ayub, M. A. (2023). Pesticides: Impacts on Agriculture Productivity, Environment, and Management Strategies. En *Emerging contaminants and associated treatment technologies* (pp. 109-134). [https://doi.org/10.1007/978-3-031-22269-6\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-031-22269-6_5)
- Khan, M. A. A., Islam, M. T., & Sadhu, S. K. (2011). Evaluation of phytochemical and antimicrobial properties of *Commelina diffusa* Burm. f. *Oriental Pharmacy And Experimental Medicine/Oriental Pharmacy And Experimental Medicine*, 11(4), 235-241. <https://doi.org/10.1007/s13596-011-0028-0>
- Kuklinski, C. (1999). *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. OMEGA.
- Kumar, J., Kaur, A., & Narang, P. (2020). Phytochemical screening and metal binding studies on floral extract of *Solanum nigrum*. *Materials Today Proceedings*, 26, 3332-3336. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.09.170>
- Lage, L., Panizo, M. M., Ferrara, G., & Reviakina, V. (2013). *Validación del inóculo por densitometría para las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos en especies del género Fusarium*. [https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562013000100010](https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100010)
- Mahmood, T., Batool, R., Aziz, E., Iqbal, J., Salahuddin, H., Tan, B., & Tabassum, S. (2020). In vitro antioxidant and anti-cancer activities and phytochemical analysis of *Commelina benghalensis* L. root extracts. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, 10(9), 417. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.290133>
- Marcelino, L., González, V., & Ríos, D. (2012). El cultivo de plátano (*Musa paradisiaca* L.) en Panamá. *Instituto de investigación agropecuaria de Panamá*, 48.

- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., & Sutton, T. B. (2003). Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease*, 87(3), 208-222. <https://doi.org/10.1094/pdis.2003.87.3.208>
- Martillo, E., & Solano, P. (2003). Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. *Inihap*, 13-18.
- Méndez, C. C., Sánchez, E. G., & Martín-Mazuelos, E. (2019). Actualización de los métodos de estudio de sensibilidad in vitro a los antifúngicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 37, 32-39. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(19\)30180-6](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(19)30180-6)
- Méndez, J., & Herrera, M. L. (2001). *Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica*. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1017-85462001000100005#:~:text=Los%20m%C3%A9todos%20que%20se%20utilizan,prueba%20de%20difusi%C3%B3n%20en%20disco](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100005#:~:text=Los%20m%C3%A9todos%20que%20se%20utilizan,prueba%20de%20difusi%C3%B3n%20en%20disco).
- Mensah, A. Y., Houghton, P. J., Dickson, R. A., Fleischer, T. C., Heinrich, M., & Bremner, P. (2006). In Vitro evaluation of effects of two ghanaiian plants relevant to wound healing. *PTR. Phytotherapy Research/Phytotherapy Research*, 20(11), 941-944. <https://doi.org/10.1002/ptr.1978>
- Mensah, A. Y., Houghton, P. J., Dickson, R. A., Fleischer, T. C., Heinrich, M., & Bremner, P. (2006). In Vitro evaluation of effects of two ghanaiian plants relevant to wound healing. *Phytotherapy Research*, 20(11), 941-944. <https://doi.org/10.1002/ptr.1978>
- Mensah, A. Y., Mireku, E. A., Damoah, A. O., & Amponsah, I. K. (2014, 23 septiembre). Anti-inflammatory and antioxidant activities of *Commelina diffusa*(Commelinaceae). *World Journal Of Pharmaceutical Sciences*. Recuperado 13 de julio de 2024, de <https://wjpsonline.com/index.php/wjps/article/view/anti-inflammatory-antioxidant-commelina-diffusa-commelinaceae/709>
- Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45, 23-30.

[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1669-23142019000100023&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142019000100023&lng=es&tlng=es).

- Mesa, V., Martín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). *Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos*. <https://www.redalyc.org/journal/864/86458941001/html/>
- Nadal Medina, R., Manzo Sánchez, G., Orozco Romero, J. O., Orozco Santos, M., & Guzmán González, S. (2009). Diversidad genética de bananos y plátanos (*musa spp.*) determinada mediante marcadores RAPD. *Revista fitotecnia mexicana*, 7.
- Narayanan, K. L., Krishnan, R. S., Robinson, Y. H., Julie, E. G., Vimal, S., Saravanan, V., & Kaliappan, M. (2022). Banana plant disease classification using hybrid convolutional neural Network. *Computational Intelligence And Neuroscience*, 2022, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2022/9153699>
- Nasrin, M., Afroz, F., Sharmin, S., Rana, M. S., & Sohrab, M. H. (2019). Cytotoxic, Antimicrobial and Antioxidant Properties of *Commelina diffusa* Burm. F. *Pharmacology & Pharmacy*, 10(02), 82-93. <https://doi.org/10.4236/pp.2019.102007>
- Noar, R. D., Thomas, E., & Daub, M. E. (2022). Genetic Characteristics and Metabolic Interactions between *Pseudocercospora fijiensis* and Banana: Progress toward Controlling Black Sigatoka. *Plants*, 11(7), 948. <https://doi.org/10.3390/plants11070948>
- Nollet, L. M., & Mir, S. (2023). Biopesticides handbook. En *CRC Press eBooks*. <https://doi.org/10.1201/9781003265139>
- Orozco, M., Orozco, J., Pérez, O., Manzo, G., Farías, J., & Da Silva, W. (2008). Prácticas culturales para el manejo de la sigatoka negra en bananos y plátanos. *Tropical Plant Pathology*, 33. <https://www.scielo.br/j/tpp/a/sfk79TX5GLKJHfYH6ymrVTB/?format=pdf&lang=es#:~:text=El%20control%20de%20la%20Sigatoka,el%20vigor%20de%20las%20plantas>.
- Peduruhewa, P. S., Jayathunge, K. G. L. R., & Liyanage, R. (2021). Nutritional Evaluation and Phytochemical Screening of *Commelina diffusa*: An Underutilized Wild Edible Plant of Sri Lanka. *American Journal Of Food And Nutrition*, 9(3), 106-111. <https://doi.org/10.12691/ajfn-9-3-2>

- Pérez Urria, P. C., & Ávalos García, Á. G. (2009). *Metabolismo secundario de plantas*. Recuperado 18 de julio de 2024, de <https://hdl.handle.net/20.500.14352/50406>
- Pérez, T. (2009). Obtención de extractos vegetales a partir de plantas medicinales. *Academia*.
- Pineda, J. (2021). Evaluación de diferentes métodos de aplicación de fungicidas y extractos botánicos para el control de pudrición de corona de banano.
- Ploetz, R. C. (2001). Black Sigatoka of Banana. *The Plant Health Instructor Index*. <https://doi.org/10.1094/phi-i-2001-0126-01>
- Quiroga, K. (2021). Efecto fungicida de extractos vegetales contra la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo de plátano (*Musa paradisiaca*) Cultivar Hartón. *Universidad de Pamplona, Programa de ingeniería agronómica*, 74.
- Raup, H. M. (1942). Trends in the Development of Geographic Botany. *Annals Of The Association Of American Geographers*, 32(4), 319-354. <https://doi.org/10.1080/00045604209357239>
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. <https://doi.org/10.3926/oms.313>
- Rocha, D., Rodella, R., & Martins, D. (2007). Caracterização morfológica de espécies de trapoeraba (*Commelina* spp.) utilizando a análise multivariada. *Planta Daninha*, 25(4), 671-678. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582007000400003>
- Rodríguez, C., Cayón, G., & Mira, J. J. (2006). Influencia delseudotallo de la planta madre cosechada sobre el crecimiento y producción del hijo de sucesión en banano (*Musa* AAA Simmonds). *Agromía Colombiana*, 24(2), 274-279. <https://www.redalyc.org/pdf/1803/180316239009.pdf>
- Romero, R. (1993). *Control de Sigatoka negra en bananos y plátanos en Costa Rica*. Villa hermosa.
- Romero, R. (1998). *El control de la sigatoka negra en producción de banano orgánico*. San José: Biodiversity International.
- Rzedowski, J., & Calderón, G. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*.
- Sánchez, G. M., González, S. G., García, C. M. R., James, A., & Santos, M. O. (2005). Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* Spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 87-96. <http://repositoriodigital.academica.mx/jspui/handle/987654321/413168>

- Santos, R. G., S, J. E. M., & C, G. E. P. (2006). Manejo sostenible del cultivo del plátano. En *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA eBooks*. <https://repository.agrosavia.co/handle/20.500.12324/12888>
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Sepúlveda-R, L. (2015). Caracterización Fenotípica de *Mycosphaerella fijiensis* y su Relación con la Sensibilidad a Fungicidas en Colombia. *Revista Mexicana de Fitopatología(En Línea)/Revista Mexicana de Fitopatología*. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1507.8>
- Serrano, L. A. L., Sisalima, M. F. A., Velásquez, N. A. B., & Pineda, Y. L. B. (2020). Ecuador: Análisis comparativo de las exportaciones de banano orgánico y convencional e incidencia en la Balanza Comercial, 2018. *Revista Científica y Tecnológica UPSE/Revista Científica y Tecnológica UPSE*, 7(2), 38-46. <https://doi.org/10.26423/rctu.v7i2.521>
- Sinnhuber, K. A. (1959). Alexander von Humboldt 1769–1859. *Scottish Geographical Magazine*, 75(2), 89-101. <https://doi.org/10.1080/00369225908735748>
- Stearn, W. T. (1976). Carl linnaeus and the theory and practice of horticulture. *Taxon*, 25(1), 21-31. <https://doi.org/10.2307/1220402>
- Stover, R. H. (1978). Distribution and probable origin of *Mycosphaerella fijiensis* in Southeast Asia. *Tropical Agriculture, Trinidad And Tobago*, 55(1), 65-68. <https://journals.sta.uwi.edu/ta/index.asp?action=viewPastAbstract&articleId=2992&issueId=283>
- Stover, R. H. (1980). Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant disease*, 750-756.
- Stover, R. H., & Dickson, J. D. (1976). *Banana leaf spot caused by Mycosphaerella musicola and M. fijiensis Var. Difformis: a comparison of the first Central American epidemics. FAO Plant Protection Bulletin (Vol. 24)*.
- Stover, R. H., & Simmonds, N. W. (1987). *Bananas*. Londres : Longman .



- Stover, R., & Dickson, J. (1976). Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first Central American epidemics. . *FAO Plant Protection Bulletin* , 36-42.
- Suárez, L. G. (2019). Tierra, trabajo y tóxicos: Sobre la producción de un territorio bananero en la costa sur del Ecuador. *Estudios Atacameños*. <https://doi.org/10.22199/issn.0718-1043-2019-0034>
- Suganya, R. A., & Jothi, G. J. (2014). Preliminary Phytochemical Screening, Antibacterial And Antioxidant Activities Of *Commelina nudiflora* (Commelinaceae). *International Research Journal Of Pharmacy*, 5(11), 851-855. <https://doi.org/10.7897/2230-8407.0511174>
- Tadege, G., Sirak, B., Abebe, D., & Nureye, D. (2023). Antinociceptive and antiinflammatory activities of crude leave extract and solvent fractions of *Commelina latifolia* Hochst. ex C.B.Clarke (Commelinaceae) leaves in murine model. *Frontiers In Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1284087>
- Targett, N. M., Kilcoyne, J. P., & Green, B. (1979). Vacuum liquid chromatography: an alternative to common chromatographic methods. *Journal Of Organic Chemistry*, 44(26), 4962-4964. <https://doi.org/10.1021/jo00394a045>
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 8(2), 137-142. [https://doi.org/10.1016/s1350-4177\(00\)00033-x](https://doi.org/10.1016/s1350-4177(00)00033-x)
- Torres, S. (2012). *Guía práctica para el manejo de banano orgánico en el valle del Chira*. Piura.
- Valverde, M. (2019). Manejo y prevención de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en el cultivo de banano, en la hacienda Banaloli 1, zona de Babahoyo . *Universidad Técnica de Babahoyo* , 45.
- Vega-Avila, E., Tapia-Aguilar, R., Reyes-Chilpa, R., Guzmán-Gutiérrez, S. L., Pérez-Flores, J., & Velasco-Lezama, R. (2012). Actividad antibacteriana y antifúngica de Justicia Spicigera. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2), 75-82. <http://scielo.unam.mx/pdf/rlq/v40n2/v40n2a3.pdf>
- Villaseñor, D., Romero, Y. N., Romero, E. L., Naveda, R. M., Unda, S. B., Porrás, C. G., & Montealegre, J. G. (2020). Respuesta óptima económica de la fertilización potásica sobre variables productivas del banano (*Musa* spp.). *Chilean Journal Of*

- Agricultural & Animal Science*, 36(2), 161-170.  
<https://doi.org/10.29393/chjaas36-14rodv80014>
- Vu, D. L., Van Anh Nguyen, T., Nguyen, T. D., Dang, V. H., Le, H. D., & Nguyen, X. T. (2023). Anti-diabetic Effect of Major Compounds from *Commelina diffusa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 33(3), 657-661.  
<https://doi.org/10.1007/s43450-023-00394-7>
- Wang, L., Zhao, W., Chen, Z., Huang, W., Ding, M., Luo, J., Liao, W., Guo, W., & Fan, Q. (2023). *Commelina danxiaensis* (Commelinaceae), a new species from Guangdong, China. *PhytoKeys*, 218, 117-126.  
<https://doi.org/10.3897/phytokeys.218.91199>
- Wilson, A. K. (1981). Commelinaceae-A Review of the Distribution, Biology and Control of the Important Weeds Belonging to this Family. *Tropical Pest Management*, 27(3), 405-418. <https://doi.org/10.1080/09670878109413812>
- Wilson, K., & Morrison, D. (2000). Monocots: Systematics and Evolution. En *CSIRO Publishing eBooks*. Csiro Publishing. <https://doi.org/10.1071/9780643090149>
- Yang, Q., & Ye, G. (2009). A new C-glucoside from *Commelina communis*. *Chemistry Of Natural Compounds*, 45(1), 59-60. <https://doi.org/10.1007/s10600-009-9253-x>
- Youn, J., Park, H., & Cho, K. (2004). Anti-hyperglycemic activity of *Commelina communis* L.: inhibition of  $\alpha$ -glucosidase. *Diabetes Research And Clinical Practice*, 66, S149-S155. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2003.08.015>
- Zavala, M., Pérez, S., Pérez, C., Vargas, R., & Pérez, R. (1998). Antidiarrhoeal activity of *Waltheria americana*, *Commelina coelestis* and *Alternanthera repens*. *Journal Of Ethnopharmacology*, 61(1), 41-47. [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(98\)00014-2](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00014-2)

## ANEXOS

### *Anexo 1. Recolección y herborización de Commelina diffusa*



### *Anexo 2. Secado y molienda de Commelina diffusa*



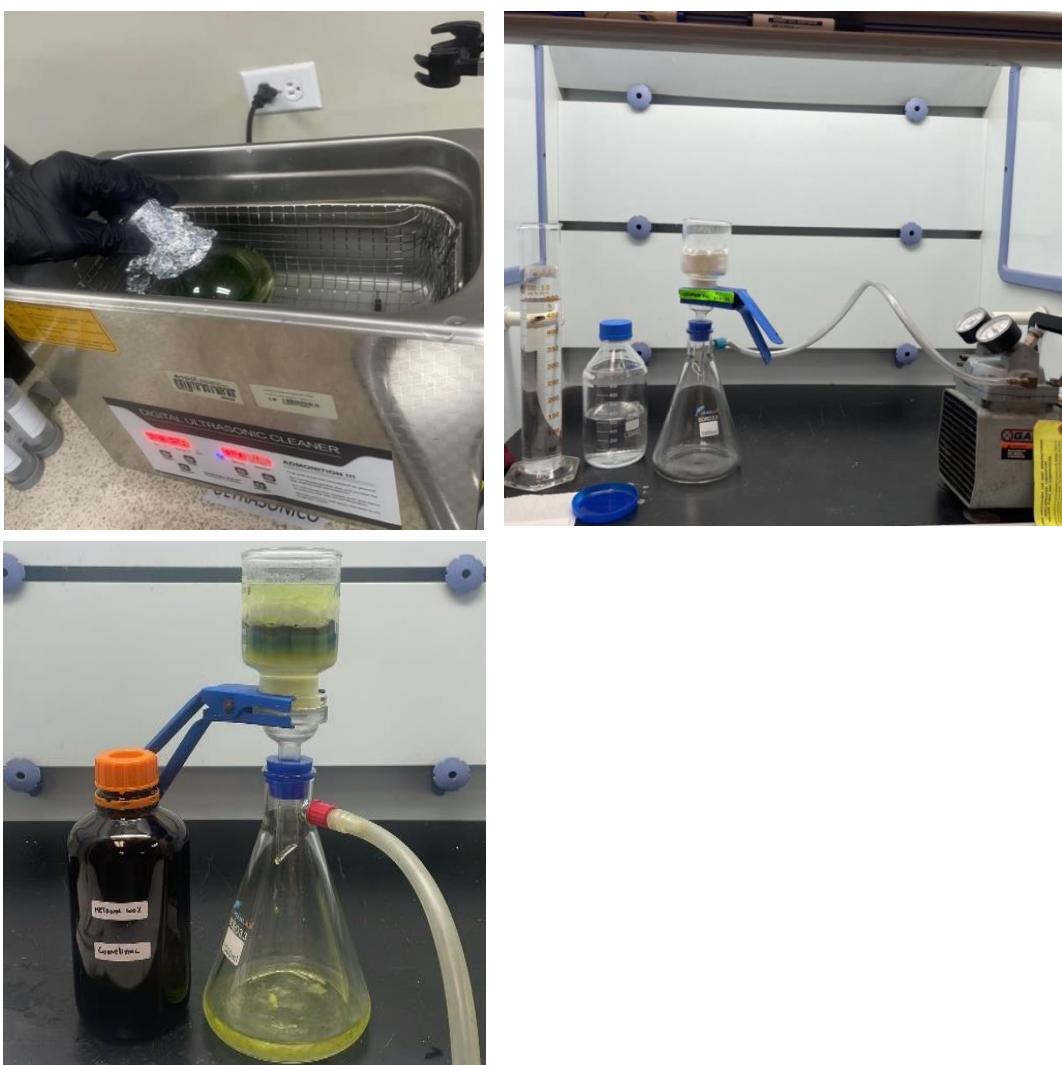
### *Anexo 3. Filtración al vacío de la especie vegetal*



*Anexo 4. Limpieza de rotavapor y extracción de solventes*



*Anexo 5. Montaje de columna VLC para cromatografía líquida al vacío*



*Anexo 6. Liofilización de la especie Commelina diffusa*



*Anexo 7. Tamizaje fitoquímico*



*Anexo 8. Observación macroscópica del hongo Mycosphaerella fijiensis*



*Anexo 9. Preparación de materiales para microdilución en pocillos*

