



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO  
ORGÁNICO DE CUTÍCULAS DE LARVAS DE *RHYNCHOPHORUS PALMARUM*  
SOBRE *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS***

*Trabajo de titulación previo a la obtención del Título  
de Ingeniero(a) en Biotecnología*

**AUTORES:**

JOSE RAUL HUAYAMAVE HUANCAYO  
GIANELLA AYLIN ROBELLI CARDENAS

**TUTOR:**

MSc. RAI SEBASTIAN CRUZ MORENO

**GUAYAQUIL - ECUADOR  
2026**

## CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, **Jose Raul Huayamave Huancayo** con documento de identificación N° 0941720062  
y **Gianella Aylin Robelli Cardenas** con documento de identificación N° 0941822611;  
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 enero del año 2026

Atentamente,



---

Jose Raul Huayamave Huancayo

CI: 0941720062



---

Gianella Aylin Robelli Cardenas

CI: 0941822611

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

Nosotros, **Jose Raul Huayamave Huancayo** con documento de identificación N° 0941720062 y **Gianella Aylin Robelli Cardenas** con documento de identificación N° 0941822611, 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: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE CUTÍCULAS DE LARVAS DE *RHYNCHOPHORUS PALMARUM* SOBRE *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS***, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniero (a) 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 enero del año 2026

Atentamente,



---

Jose Raul Huayamave Huancayo

CI: 0941720062



---

Gianella Aylin Robelli Cardenas

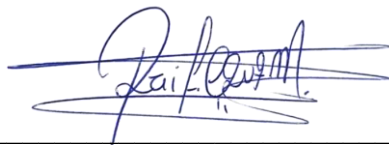
CI: 0941822611

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Raí Sebastian Cruz Moreno** con documento de identificación N° 1724832900, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ORGÁNICO DE CUTÍCULAS DE LARVAS DE *RHYNCHOPHORUS PALMARUM* SOBRE *PSEUDOCERCOSPORA FIJIENSIS***, realizado por **Jose Raul Huayamave Huancayo** con documento de identificación N° 0941720062 y **Gianella Aylin Robelli Cardenas** con documento de identificación N° 0941822611, 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 enero del año 2026

Atentamente.



Raí Sebastian Cruz Moreno

CI: 1724832900

## **Dedicatoria Jose Huayamave**

Primero, a Dios. Gracias por ser mi fortaleza cuando las fuerzas me faltaban y por permitirme mantenerme firme para cerrar esta etapa.

A mis padres, por ser la raíz de todo lo que soy. Gracias por el sacrificio silencioso y por creer en mí siempre; este logro es tan mío como suyo.

A mi abuela Maritza y mi abuelo Pepe, gracias por cada consejo a tiempo, por su cariño y por enseñarme, con el ejemplo, que rendirse nunca es una opción.

A mi abuela Rocio y mi abuelo Raul, que hoy me acompañan desde otro lugar. Aunque no pueda abrazarlos, sé que están orgullosos y este trabajo va dedicado a su memoria.

A mis hermanas, Sandra y Annie: quiero que vean esto y sepan que los sueños sí se cumplen con esfuerzo. Que esto les sirva de recordatorio de que ustedes también pueden lograr lo que se propongan, y que siempre tendrán en mí a un aliado incondicional.

A Tamara, por ser mi compañera de vida y mi motivación diaria. Gracias por la paciencia, por el cariño y por impulsarme a ser mejor cada día.

A Luis, gracias por esa lealtad que se encuentra pocas veces, por estar en las buenas y en las malas ofreciéndome una amistad sincera.

Y a ti, Gianella, mi compañera de tesis y batalla; gracias por compartir el estrés, los consejos y por demostrarme lo bonita que es nuestra amistad. A mis amigos y a todos los que se cruzaron en este largo camino: gracias por hacer la carga más ligera y por las risas compartidas. Me llevo cada momento en el corazón.

## **Dedicatoria Gianella Robelli**

El presente trabajo de experimentación lo dedico en primer lugar a Dios, quien nunca me dejó sola en toda esta trayectoria de aprendizaje y quien nos envió a muchos de sus ángeles para guiar mi camino y evitar que abandonara este propósito.

A mi mamita Yanina, que me sostuvo en cada noche de desesperación, por quien decidí luchar y a quien deseo llenar de orgullo por toda la fortaleza que me brindó día a día.

A mi hermana Xiomara que creyó en mí y, con su ejemplo y dedicación me demostró que yo podía lograrlo, incluso hacerlo mejor. Gracias por ser mi refugio, por tus sabios consejos que fueron un respaldo constante durante toda la carrera.

A Benji y Catta, quienes con su sola presencia lograban cambiar mi ánimo; me acompañaron en mis noches de desvelo y me ofrecieron su amor incondicional.

A mis amigos, que nos acompañaron en cada paso de este camino y siempre supieron decir las palabras correctas para brindarle consuelo y apoyo. En especial a Juan por hacernos creer y reconocer lo capaces que somos.

Y, por supuesto, a Jose, por ser un amigo y compañero incondicional; sin él este reto no hubiera sido posible.

Finalmente me dedico este trabajo a mí misma, por demostrarme que con esfuerzo y constancia todo se puede lograr, y por haber alcanzado la meta de convertirme en ingeniera.

## **Agradecimientos**

A la Universidad Politécnica Salesiana, por brindarme el entorno académico y los recursos necesarios para completar mi formación. Su compromiso con la excelencia educativa ha sido fundamental para mi desarrollo académico y personal.

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a todos los profesionales que contribuyeron de manera significativa para que este proyecto sea posible.

En primer lugar, a la directora María Alejandra De La Cruz, por su constante apoyo, orientación y acompañamiento durante todo el proceso de investigación.

A nuestro tutor Sebastián Cruz, por su colaboración y por compartir su experiencia, lo cual ha enriquecido significativamente este trabajo.

Asimismo, agradecemos a los laboratoristas Emilio, Carla y Paulo, cuya experiencia y conocimiento fueron fundamentales para el desarrollo del trabajo. Nuestra gratitud no sólo se extiende por el soporte técnico brindado, sino también por su compañerismo y amistad.

A nuestros amigos, Paola, Andrea, Paulette, Juan, Cielo, Dennisse y Gabriela, por acompañarnos día a día, cada momento juntos y las charlas después de cada comida, por ser la compañía que se necesita después de que no todo salga bien y nuestro refugio.

A nuestras familias que, a su constante apoyo y esfuerzo, nos enseñaron que rendirnos no era una opción.

## Resumen

La Sigatoka Negra, causada por el hongo *Pseudocercospora fijiensis*, constituye una importante amenaza fitosanitaria para la producción bananera, que requiere soluciones de control sostenibles. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antifúngica de un extracto orgánico obtenido de la cutícula de larvas de *Rhynchophorus palmarum* L. (chontacuro) sobre el crecimiento de *P. fijiensis*.

Para este estudio, se recolectaron especímenes en estadio larvario en la localidad de Lago Agrio, provincia de Sucumbíos. La obtención de los metabolitos de interés se realizó mediante una extracción por maceración con hexano. Posteriormente, se determinó la actividad antifúngica mediante la técnica de microdilución en caldo, siguiendo protocolos estándar CLSI M38-A2, para establecer la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Los resultados mostraron que el extracto posee una capacidad inhibitoria significativa, reportando un CMI de 666, 67  $\mu\text{g/mL}$ . Concluyendo que el extracto de cutículas de *R. palmarum* L. demuestra potencial como una fuente de compuestos bioactivos antifúngicos, sugiriendo su viabilidad como una alternativa orgánica para el manejo integrado de la Sigatoka negra.

**Palabras clave:** *Rhynchophorus palmarum* L., *Pseudocercospora fijiensis*, actividad antifúngica, extracto orgánico, CMI.

## Abstract

Black Sigatoka, caused by the fungus *Pseudocercospora fijiensis*, is a major phytosanitary threat to banana production, requiring sustainable control solutions. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity of an organic extract obtained from the cuticle of *Rhynchophorus palmarum* L. (chontacuro) larvae on the growth of *P. fijiensis*.

For this study, specimens in the larval stage were collected in the town of Lago Agrio, Sucumbíos province. The metabolites of interest were obtained by extraction through maceration with hexane. Subsequently, antifungal activity was determined using the broth microdilution technique, following standard CLSI M38-A2 protocols, to establish the minimum inhibitory concentration (MIC).

The results showed that the extract has significant inhibitory capacity, reporting an MIC of 666, 67 µg/mL. It was concluded that the extract of *R. palmarum* L. cuticles shows potential as a source of bioactive antifungal compounds, suggesting its viability as an organic alternative for the integrated management of black Sigatoka.

**Keywords:** *Rhynchophorus palmarum* L., *Pseudocercospora fijiensis*, antifungal activity, organic extract, MIC

## Índice de contenido

Capítulo 1 .....	1
Antecedentes .....	1
1.1. Introducción .....	1
1.2. Justificación.....	5
1.3. Hipótesis.....	6
1.4. Objetivos .....	7
1.4.1. Objetivo general .....	7
1.4.2. Objetivos específicos.....	7
Capítulo 2 .....	8
Marco Teórico .....	8
2.1. Microorganismos.....	8
2.1.1. Microorganismos Patógenos .....	8
2.1.2. Género <i>Pseudocercospora</i> .....	8
2.1.3. Especie <i>fijiensis</i> .....	9
2.1.4. Sigatoka negra .....	9
2.1.5. Resistencia fúngica.....	10
2.2. Insectos.....	10
2.2.1. Género <i>Rhynchophorus</i> .....	10
2.2.2. Especie <i>palmarum</i> (Estadio larval) .....	11

2.2.3.	Compuestos de la larva de <i>R. palmarum</i> L.....	11
2.2.4.	Cutícula y lípidos superficiales de <i>R. palmarum</i> L. ....	11
2.2.4.1.	Generalidades de los ácidos grasos larvales.....	12
2.2.4.2.	Ácido Oleico .....	12
2.2.4.3.	Ácido Palmítico.....	12
2.2.4.4.	Ácidos Grasos Poliinsaturados (Linoleico y Linolénico) .....	12
2.3.	Extracción de compuestos cuticulares de <i>R. palmarum</i> L....	13
2.3.1.	Maceración .....	13
2.3.1.1.	Hexano .....	13
2.4.	Análisis microbiológicos.....	14
2.4.1.	Microdilución .....	14
2.4.1.1.	Concentración mínima inhibitoria.....	14
2.4.1.2.	Determinación visual y puntos de corte .....	14
2.4.1.3.	Uso de indicadores colorimétricos .....	15
2.4.1.4.	Factores que afectan la CMI.....	15
2.4.1.5.	Criterios de actividad para productos naturales .....	16
Capítulo 3	.....	17
	Materiales y métodos .....	17
3.1.	Obtención de las muestras de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> .....	17
3.2.	Aislamiento del hongo filamentoso.....	17

3.2.1.	Preparación de medio de cultivo SDA .....	17
3.2.2.	Preparación de medio de cultivo PDA .....	18
3.2.3.	Preparación de medio PDB .....	18
3.2.4.	Preparación del material vegetal .....	19
3.2.5.	Siembra de las muestras foliares .....	21
3.2.6.	Resiembra de las muestras material micelial .....	22
3.2.6.1.	Identificación morfológica microscópica de <i>Pseudocercospora fijensis</i> .....	22
3.2.6.2.	Identificación molecular de <i>Pseudocercospora fijensis</i> .....	23
3.3.	Obtención de especímenes de <i>Rhynchophorus palmarum L.</i> .....	23
3.3.1.	Identificación taxonómica de especímenes de <i>Rhynchophorus palmarum L.</i> ..	24
3.3.2.	Extracción orgánica de lípidos desde las cutículas larvarias.....	24
3.3.2.1.	Acondicionamiento y limpieza inicial de las muestras biológicas.....	24
3.3.2.2.	Disección y aislamiento de la cutícula .....	24
3.3.2.3.	Extracción de lípidos cuticulares de <i>Rhynchophorus palmarum L.</i> .....	25
3.3.2.4.	Concentración y acondicionamiento de los extractos .....	25
3.3.2.5.	Recuperación del n-hexano .....	26
3.4.	Microdilución <i>in vitro</i> en placa multipocillo.....	26
3.4.1.	Preparación de controles .....	26
3.4.2.	Preparación de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) .....	27
3.4.3.	Preparación de concentraciones de lípidos cuticulares .....	27

3.4.4.	Estandarización del inóculo .....	28
3.4.5.	Inoculación en placa multipocillo .....	28
3.4.5.1.	Lectura de placa multipocillos .....	29
	Capítulo 4 .....	32
	Resultados y Discusiones .....	32
4.1.	Identificación taxonómica de <i>Rhynchophorus palmarum</i> L. ....	32
4.2.	Rendimiento del extracto lipídico de cutículas .....	34
4.3.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) .....	35
4.4.	Análisis Estadístico de la Inhibición .....	37
	Capítulo 5 .....	40
	Conclusiones y Recomendaciones .....	40
5.1.	Conclusiones .....	40
5.2.	Recomendaciones.....	41
	Referencias bibliográficas .....	42
	Anexos .....	50

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ubicación de la Finca El Paraíso. ....	17
<b>Figura 2.</b> Dispensación de medio PDB en tubos de ensayo. ....	19
<b>Figura 3.</b> Corte de fragmentos de la hoja del banano. ....	20
<b>Figura 4.</b> Fragmento de la hoja del banano. ....	20
<b>Figura 5.</b> Proceso de desinfección por hipoclorito de sodio al 0,1%. ....	21
<b>Figura 6.</b> Siembra de muestras foliares. Nota. Tomada por los autores (2026).....	22
<b>Figura 7.</b> Feria de las Nacionalidades, Lago Agrio, Ecuador. ....	23
<b>Figura 8.</b> Protocolo de microdilución en placa multipocillos. ....	29
<b>Figura 9.</b> Diseño experimental para la máquina multiskan FC. ....	30

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Resultados a nivel cefálico del <i>R. palmarum L.</i> .....	32
<b>Tabla 2.</b> Resultados en la región anal del <i>R. palmarum L.</i> .....	33
<b>Tabla 3.</b> Aspecto de la larva de <i>R. palmarum L.</i> .....	33
<b>Tabla 4.</b> Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a <i>P. fijiensis</i> .....	35
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de inhibición de los lípidos cuticulares de <i>R. palmarum L.</i> y del control sintético. ....	36
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones de inhibición del extracto lipídico de <i>R. palmarum L.</i> .....	36
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones del fluconazol, control sintético.....	36
<b>Tabla 8.</b> Estadístico descriptivo del MIC. ....	38

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Desinfección de la hoja contaminada de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> .....	50
<b>Anexo 2.</b> Certificado de identificación morfológica de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> . .....	51
<b>Anexo 3.</b> Certificado de análisis molecular de <i>Pseudocercospora fijiensis</i> . .....	52
<b>Anexo 4.</b> Procesamiento de muestras de <i>R. palmarum</i> L. ....	53
<b>Anexo 5.</b> Extracción de lípidos cuticulares de <i>R. palmarum</i> L.....	54

## Capítulo 1

### Antecedentes

#### 1.1. Introducción

El banano (*Musa spp.*) es uno de los cultivos tropicales más importantes del mundo, tanto desde el punto de vista económico como nutricional. En 2020, la producción mundial de banano y plátano superó los 160 millones de toneladas, lo que lo convierte en la fruta fresca más exportada, con un valor aproximado de US\$10 .000 millones anuales (Strobl & Mohan, 2020). La economía de los países de América Latina, África y Asia se basan en la producción de banano, destinado tanto al consumo interno como a la exportación (Churchill, 2011).

En Ecuador, este sector constituye la columna vertebral de la economía agrícola, representando casi el 50% del PIB y consolidando la posición del país como fuente de un tercio de las exportaciones mundiales de fruta. Más allá de su impacto macroeconómico, esta industria brinda apoyo directo e indirecto a más de un millón de familias, la superficie de siembra es de 230000 hectáreas con una producción concentrada en las provincias de Guayas, Los Ríos y El Oro (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2023). Actualmente, en el país se han reportado 144.981,00 hectáreas de plantaciones de banano, de las cuales 86.712,00 hectáreas son de monocultivo y 58.269,00 hectáreas de otros cultivos (Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2013).

Sin embargo, a pesar del liderazgo comercial en mercados como Europa y Estados Unidos, la industria se enfrenta a una difícil realidad en términos de eficiencia: los rendimientos promedio en el país siguen siendo inferiores a los de competidores como Costa Rica y Filipinas. Esta brecha de productividad se debe no solo a las diferencias en la infraestructura, sino también a la constante amenaza de factores bióticos y enfermedades, que complican la gestión de los

cultivos y aumentan los costos de producción (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2023).

La sostenibilidad de este cultivo está seriamente amenazada por enfermedades foliares destructivas, en particular la Sigatoka negra, causada por el hongo ascomiceto *Pseudocercospora fijiensis* (Churchill, 2011; Ploetz, 2001). La Sigatoka negra se considera una de las enfermedades del banano más grave del mundo debido a su amplia distribución y su impacto significativo en el rendimiento (Marín et al., 2003; Ploetz, 2001).

La Sigatoka negra se caracteriza por la aparición de estrías cloróticas que luego evolucionan a manchas necróticas en las hojas, reduciendo drásticamente la capacidad fotosintética de la planta (Churchill, 2011; Marín et al., 2003). Esto produce importantes pérdidas de cultivos: sin un control eficaz, los frutos maduran prematuramente y el rendimiento puede reducirse en más del 50% (Marín et al., 2003).

Además, los plátanos infectados pierden su calidad de exportación, ya que el hongo provoca una maduración prematura de la fruta, lo que lleva a una maduración excesiva durante el transporte (Churchill, 2011). Hoy en día, esta enfermedad está presente en todas las zonas tropicales húmedas donde se cultiva banano, lo que representa una amenaza constante para la industria bananera mundial (Arango Isaza et al., 2016).

Varios estudios han confirmado que *P. fijiensis* tiene un potencial evolutivo significativo, que se refleja en su capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente y de dispersarse a largas distancias mediante ascosporas transportadas por el viento (Arango Isaza et al., 2016). Este fenómeno, combinado con el tamaño de la población genética, ha contribuido a la aparición de cepas resistentes. Por lo tanto, las recomendaciones actuales enfatizan la necesidad de la rotación de ingredientes activos, el uso de mezclas y su integración con otras

estrategias de control de plagas para prolongar la vida útil de los fungicidas (Arango Isaza et al., 2016; Marín et al., 2003).

De esta manera surge un enfoque innovador: estudiar compuestos antimicrobianos derivados de insectos como agentes potenciales para combatir patógenos de plantas. Los insectos, que representan el grupo de organismos más diverso del planeta, han desarrollado mecanismos de defensa químicos y moleculares altamente efectivos contra una amplia gama de patógenos microbianos (Ratcliffe et al., 2011). Muchos insectos producen potentes péptidos antimicrobianos (AMPs), como defensinas, cecropinas, atacinas y melitinas, que les permiten neutralizar bacterias, hongos e incluso virus presentes en su entorno (Yi et al., 2014).

Dentro de los compuestos derivados de insectos con posible aplicación fitosanitaria se encuentran los lípidos cuticulares. La superficie del cuerpo de los insectos está cubierta por una capa de ceras y lípidos que desempeñan diversas funciones: previenen la desecación, facilitan la comunicación química y actúan como barrera física y química contra toxinas, parásitos y microorganismos (Gołębiowski et al., 2011).

Los ácidos grasos de cadena media, como el ácido láurico, son de especial interés debido a sus propiedades antimicrobianas de amplio espectro (Desbois & Smith, 2010). Se sabe que el ácido láurico y otros ácidos grasos saturados con 10-14 átomos de carbono actúan como agentes bacteriostáticos o bactericidas al intercalarse en las membranas celulares de los microorganismos y desestabilizarlas (Desbois & Smith, 2010).

Los insectos que habitan ambientes asociados con plantas o materia vegetal en descomposición pueden ser fuentes interesantes de compuestos antifúngicos, dado que coexisten con una variedad de hongos y deben desarrollar mecanismos de defensa efectivos. El picudo negro de la palma (*Rhynchophorus palmarum* L.) (Coleoptera: Curculionidae), es un insecto común en las regiones tropicales de América y el Caribe, se le conoce principalmente

como una plaga agresiva de las palmeras y un vector del nematodo *Bursaphelenchus cocophilus*, que causa la enfermedad del anillo rojo (P. Sánchez et al., 1993). Su ciclo de vida es holometábolo, y en climas cálidos puede completarse en tan sólo dos o tres meses.

A pesar de su impacto negativo en los cultivos agrícolas, sus características biológicas han atraído la atención de los científicos. Sus larvas, comúnmente llamadas “chontacuros”, aportan nutrientes esenciales a la dieta de las comunidades amazónicas (Chimbo-Gándara et al., 2024). El análisis bromatológico muestra que estas larvas contienen 20% de proteínas y 50% de lípidos sobre una base de materia seca, lo que indica la presencia de ácidos grasos insaturados como el oleico y el palmítico (Chimbo-Gándara et al., 2024).

La alta concentración de lípidos indica la síntesis de compuestos con potencial biológico. De hecho, estudios realizados en Brasil mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) identificaron ácidos grasos en la cutícula de adultos de *R. palmarum* L., con predominio de los ácidos palmitoleico, oleico y linoleico (Batalha et al., 2020). La evaluación de estos extractos reveló actividad antimicrobiana contra patógenos del género de *Candida* y especies como *E. coli* y, con concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) que oscilan entre 12,5 y 20 µg/mL (Batalha et al., 2020). Esta capacidad inhibidora se debe a la acción sinérgica de los ácidos grasos libres presentes de forma natural en el cuerpo del insecto (Batalha et al., 2020; Gołębiowski et al., 2013).

Basándose en esta hipótesis, este proyecto investiga si los extractos lipídicos larvarios de *R. palmarum* L. pueden inhibir el crecimiento de *P. fijiensis*, el hongo que causa la sigatoka negra en el banano. Dado que no se han realizado estudios previos sobre el uso de este enfoque contra *P. fijiensis*, este estudio tiene como objetivo determinar el potencial biofungicida de estos extractos. Si se confirma la eficacia de estos extractos, se sentarán las bases para el desarrollo

de nuevos productos naturales o biopesticidas para promover el manejo integrado de la sigatoka negra, reduciendo así la dependencia de fungicidas químicos sintéticos.

## 1.2. Justificación

El problema de la sigatoka negra demanda soluciones innovadoras y sostenibles. El uso de fungicidas químicos de manera constante, altos costos de los mismos y la resistencia de los patógeno, coloca en peligro la eficacia a largo plazo de las estrategias de control (Cañas-Gutiérrez et al., 2009; Marín et al., 2003). En América Latina, las pérdidas y los costos causados por la enfermedad de la sigatoka negra se estiman en más de 300 millones de dólares estadounidenses al año (Peláez Montoya et al., 2006). Por lo tanto, encontrar métodos alternativos más respetuosos con el medio ambiente y sostenibles para controlar esta enfermedad se ha convertido en una cuestión prioritaria.

El uso de compuestos de origen biológico se ajusta a los principios de la gestión integrada y la agricultura sostenible. Los extractos naturales suelen ser biodegradables, con menor impacto negativo en el medio ambiente y en los organismos no objetivo. Distintivamente, los compuestos antimicrobianos obtenidos de insectos pueden tener las siguientes ventajas: los insectos son abundantes y renovables, y muchos de sus mecanismos químicos de defensa tienen una baja toxicidad para las plantas y los mamíferos (Ratcliffe et al., 2011).

En el sector agrícola, las AMPs obtenidas de determinados insectos modificados genéticamente se han probado en plantas, lo que ha confirmado una mayor resistencia a los hongos patógenos. Un ejemplo es la expresión de péptidos de insectos en plátanos. Esta expresión demostró efectos protectores específicos contra las especies *Fusarium* y *Mycosphaerella* (Soares et al., 2021).

Según Batalha et al., 2020 han demostrado que *R. palmarum* L. contiene compuestos con un amplio espectro de actividad antimicrobiana, lo que respalda el mecanismo de acción propuesto contra *P. fijiensis*; el aprovechamiento del insecto *R. palmarum* L. para obtener una sustancia útil, da un enfoque integral de la gestión de recursos, mediante el cual los residuos o subproductos se convierten en un medio de control biológico. Así promover estrategias de economía circular en los ecosistemas agrícolas tropicales. En última instancia, esta investigación reforzará la comprensión de las relaciones entre los insectos, los microbios y las plantas. Se trata de un campo interdisciplinario (entomología química, agronomía, fitopatología, biotecnología).

Por lo tanto, esta iniciativa aborda la necesidad de métodos de control a largo plazo más económicos, duraderos y eficaces contra la enfermedad de la sigatoka negra. Si se confirma la actividad antifúngica de los extractos de *R. palmarum* L. contra *P. fijiensis*, refuerza el camino para el desarrollo de productos biorracionales.

Esto no solo beneficiará a la industria bananera al diversificar los enfoques para el control de enfermedades, sino que también aumentará la importancia de la investigación sobre la biodiversidad y la conservación de los insectos tropicales, demostrando las aplicaciones útiles de las especies locales. Por lo tanto, esta medida, que reviste gran importancia científica y práctica, es coherente con objetivos globales tales como el uso de la biodiversidad para la agricultura sostenible, la reducción de la resistencia a los plaguicidas y como remedio para la seguridad alimentaria.

### 1.3. Hipótesis

Ho: Los compuestos lipídicos extraídos de las larvas de *Rhynchophorus palmarum* L. son capaces de inhibir el crecimiento in vitro del hongo *Pseudocercospora fijiensis*.

H1: Los compuestos lipídicos extraídos de las larvas de *Rhynchophorus palmarum* L. no son capaces de inhibir el crecimiento in vitro del hongo *Pseudocercospora fijiensis*.

## 1.4. Objetivos

### 1.4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica del extracto orgánico de cutículas de larvas de *Rhynchophorus palmarum* sobre *Pseudocercospora fijiensis*.

### 1.4.2. Objetivos específicos

1. Identificar taxonómicamente la especie *Rhynchophorus palmarum* mediante caracteres morfológicos.
2. Obtener el extracto lipídico de las cutículas de larvas de *Rhynchophorus palmarum* mediante técnicas de extracción orgánica.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto lipídico de la cutícula sobre *Pseudocercospora fijiensis* mediante microdilución.

## Capítulo 2

### Marco Teórico

#### 2.1. Microorganismos

Los microorganismos son un grupo heterogéneo de organismos vivos, que incluye bacterias, hongos, virus, protozoos y algas microscópicas. Su estudio es fundamental en el sector agrícola, ya que interactúan de manera directa con cultivos de diversas maneras, desde un manejo sobre el acondicionamiento del suelo, la bioestimulación radicular y el desarrollo vegetativo, el control sobre especies fitopatógenas como: hongos, bacterias, insectos y nematodos (Madigan et al., 2015)

##### 2.1.1. Microorganismos Patógenos

Los fitopatógenos son organismos capaces de causar distintas enfermedades, que pueden alterar los procesos fisiológicos normales de las plantas, causando una reducción sobre el desarrollo vegetativo y la productividad sobre los mismos (Agrios, 2005).

Los hongos fitopatógenos, en particular, son responsables de la mayoría de las pérdidas de cultivos a nivel mundial; actúan colonizando el tejido vegetal y produciendo toxinas o enzimas que las destruyen (Agrios, 2005).

##### 2.1.2. Género *Pseudocercospora*

El género *Pseudocercospora* pertenece a la clase *Dothideomycetes* e incluye un gran número de especies de hongos fitopatógenos que causan manchas y tizones foliares en una amplia variedad de plantas hospedantes. Taxonómicamente, este género representa la forma anamórfica (asexual) de varios patógenos previamente clasificados en el género

*Pseudocercospora*, se caracterizan por la formación de conidios filiformes o con forma de maza inversa y estroma pigmentado (Crous et al., 2006).

En la actualidad se ha realizado el cambio de nombre genérico *Mycosphaerella*, en base a los cambios del código internacional de nomenclatura para hongos y plantas (ICN), realizados en el 2011 dando una nueva clasificación a este género con el nombre *Pseudocercospora* (Crous et al., 2006).

### **2.1.3. Especie *fijiensis***

*Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton (anteriormente conocida como la especie teleomórfica *Mycosphaerella fijiensis*) es un hongo ascomiceto heterotálico haploide (Arzanlou et al., 2007). Es el agente causal más agresivo del complejo de manchas foliares del banano y el plátano. Se diferencia de especies relacionadas, como *P. musae*, en su capacidad para penetrar las estomas y la rápida producción de toxinas que causan necrosis del tejido foliar (Arzanlou et al., 2007).

### **2.1.4. Sigatoka negra**

La sigatoka negra es la enfermedad foliar más destructiva de las plantas de banano (*Musa spp.*) a nivel mundial, causada por el hongo *P. fijiensis*, inicialmente se presenta como vetas de color marrón rojizo en el envés de las hojas, que luego se transforman en manchas necróticas negras, reduciendo la superficie fotosintética de la planta (Marín et al., 2003).

La reducción de la fotosíntesis produce una maduración prematura de la fruta y una pérdida significativa del peso del racimo, lo que requiere un manejo agroquímico intensivo para mantener la producción constante en el cultivo (Marín et al., 2003)

### 2.1.5. Resistencia fúngica

La resistencia fúngica es la capacidad adquirida y hereditaria de una población fúngica para sobrevivir a la exposición a dosis de fungicidas que previamente eran eficaces contra ella (Hollomon, 2015).

En el caso de *P. fijiensis*, la presión selectiva resultante del uso constante de fungicidas sistémicos (como azoles y estrobilurinas) aceleró la aparición de cepas resistentes, lo que complicó el control de la enfermedad y aumentó los costos de producción (Cañas-Gutiérrez et al., 2009).

## 2.2. Insectos

Los insectos representan la clase animal más diversa del planeta, presentando adaptaciones morfológicas y químicas que varían significativamente según su etapa de desarrollo (Gullan & Cranston, 2010). En los insectos con metamorfosis completa (aquellos que la experimentan), la etapa larvaria se especializa en la alimentación y el crecimiento, acumulando importantes reservas de energía en forma de lípidos, lo que influye directamente en la composición de su cutícula y tejidos (Gullan & Cranston, 2010).

### 2.2.1. Género *Rhynchophorus*

El género *Rhynchophorus* (Coleoptera: Curculionidae) incluye especies de gorgojos grandes cuyas larvas se desarrollan excavando túneles en los troncos de diversas especies de palmeras (*Arecaceae*) (Dnfouenr, 1993). Estas larvas constituyen una fuente importante de proteínas y lípidos en la dieta de varias poblaciones nativas de regiones tropicales (Dnfouenr, 1993).

### **2.2.2. Especie *palmarum* (Estadio larval)**

La larva de *Rhynchophorus palmarum* L., comúnmente llamada “chontacuro” es ápodo, posee un cuerpo robusto y blando, curvado ventralmente en forma de "C". Su coloración varía del blanco cremoso al amarillento, con una cápsula cefálica esclerotizada de color marrón rojizo y potentes mandíbulas adaptadas para triturar fibras vegetales. (P. A. Sánchez et al., 1993).

Durante esta etapa, que incluye de nueve a diez estadios larvarios y dura entre 42 y 62 días, la larva acumula importantes reservas de lípidos antes de la pupación (Giblin-Davis, 2013).

### **2.2.3. Compuestos de la larva de *R. palmarum* L.**

La composición química de las larvas de *R. palmarum* L. destaca por su alto contenido lipídico, que representa aproximadamente el 50-60 % de su peso seco. A diferencia del adulto (cuya cutícula es dura y rica en hidrocarburos complejos), las larvas son ricas en grasas y aceites con propiedades nutricionales y medicinales (Vargas et al., 2022).

Diversas investigaciones han demostrado que el aceite larvario es una fuente importante de vitaminas A y E, así como de minerales, lo que le confiere propiedades antioxidantes (Vargas et al., 2022)

### **2.2.4. Cutícula y lípidos superficiales de *R. palmarum* L.**

La cutícula larvaria es flexible y está ligeramente esclerotizada, lo que le permite desarrollarse, en su barrera externa o "aceite de la piel" consiste principalmente en una mezcla de ácidos grasos y lípidos neutros, que la protege de la desecación y las infecciones microbianas en el ambiente húmedo del tronco de la palma (Ahipo Dué et al., 2009).

#### **2.2.4.1. Generalidades de los ácidos grasos larvales**

Los lípidos extraídos de la superficie y el cuerpo graso de las larvas se componen principalmente de triglicéridos y ácidos grasos libres. Estos compuestos sirven como reserva energética, y algunos ácidos grasos libres presentes en la cutícula actúan como agentes antimicrobianos naturales, alterando las membranas celulares de los patógenos invasores (Maceda-Santivañez, 2021).

#### **2.2.4.2. Ácido Oleico**

El ácido oleico es el ácido graso monoinsaturado predominante en las larvas de *R. palmarum* L., representando aproximadamente entre el 40 % y el 60 % del perfil lipídico total. Este compuesto es conocido por su fluidez y capacidad para penetrar las membranas biológicas, lo que podría contribuir a la defensa antifúngica inespecífica del insecto (Vargas et al., 2022).

#### **2.2.4.3. Ácido Palmítico**

El ácido palmítico es el principal ácido graso saturado presente en la larva y representa aproximadamente entre el 25 % y el 40 % de sus lípidos. Combinado con el ácido oleico, forma la estructura básica de los triglicéridos de reserva y la capa cerosa protectora de la cutícula larvaria (Ahipo Dué et al., 2009).

#### **2.2.4.4. Ácidos Grasos Poliinsaturados (Linoleico y Linolénico)**

Aunque presentes en menores cantidades, los ácidos grasos esenciales como el linoleico y el linolénico son precursores de moléculas de señalización del sistema inmunitario en insectos y presentan una actividad antimicrobiana más directa que los ácidos grasos saturados (Vargas et al., 2022)

## **2.3. Extracción de compuestos cuticulares de *R. palmarum* L.**

### **2.3.1. Maceración**

La maceración es un método de extracción sólido-líquido que consiste en sumergir el material biológico en un disolvente durante un tiempo determinado a temperatura ambiente siendo el caso de los lípidos cuticulares, la inmersión suele ser breve, preservando únicamente los compuestos de la superficie exterior (Millar & Haynes, 1998).

Por el alto contenido de grasa del *R. palmarum* L, la molienda de la cutícula larvaria de permite la extracción de lípidos superficiales y subcutáneos, este método es eficaz para producir “aceite larvario”, rico en los compuestos bioactivos mencionados (Millar & Haynes, 1998).

#### **2.3.1.1. Hexano**

El n-hexano es un disolvente orgánico apolar ampliamente utilizado para la extracción de lípidos, aceites y ceras; debido a su baja polaridad los hidrocarburos cuticulares y los ácidos grasos apolares se disuelve de forma altamente selectiva, evitando así la extracción de azúcares polares o proteínas que no forman parte de la barrera lipídica de interés (Skoog et al., 2018).

El uso de hexano como disolvente apolar es ideal para aislar la fracción lipídica (ácidos grasos y triglicéridos) de las larvas sin extraer proteínas hidrosolubles ni carbohidratos, esto garantiza que el extracto resultante sea representativo de la fracción lipofílica responsable de la posible actividad biológica (Skoog et al., 2018).

## **2.4. Análisis microbiológicos**

Para evaluar la actividad biológica de los extractos naturales contra fitopatógenos, se necesitan métodos estandarizados para la evaluación cuantitativa de la inhibición del crecimiento de hongos.

### **2.4.1. Microdilución**

El método de microdilución en caldo es una técnica cuantitativa que se realiza habitualmente en placas de 96 pocillos. Permite evaluar la sensibilidad de los microorganismos a diversas concentraciones de un agente antimicrobiano en un volumen pequeño, optimizando así el uso de reactivos y extractos (Balouiri et al., 2016).

#### **2.4.1.1. Concentración mínima inhibitoria**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo tras un período de incubación específico. Es el método de referencia para determinar la actividad antifúngica de una sustancia (Rex, 2008).

#### **2.4.1.2. Determinación visual y puntos de corte**

En el método estándar, la CMI se determina mediante la monitorización de la turbidez en pocillos de microdilución. La ausencia de turbidez indica inhibición del crecimiento. Sin embargo, en el caso de hongos filamentosos como *P. fijiensis*, la determinación puede ser difícil debido al crecimiento micelial irregular. Por lo tanto, el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) ha desarrollado protocolos específicos (M38-A2), donde el criterio de evaluación es una reducción significativa (generalmente del 50 % o 100 %) del crecimiento en comparación con un control sin tratamiento antifúngico. (Rex, 2008).

### 2.4.1.3. Uso de indicadores colorimétricos

Al evaluar extractos complejos o sustancias, que pueden formar emulsiones y enturbiar espontáneamente el medio de cultivo, las mediciones visuales de turbidez se vuelven imprecisas. Por lo cual se utilizan indicadores metabólicos como las sales de tetrazolio (Sarker et al., 2007). Estos compuestos, reducidos por las enzimas deshidrogenasas en las células vivas, cambian de color, lo que permite diferenciar entre células fúngicas vivas y muertas, independientemente de la turbidez del aceite (Sarker et al., 2007).

### 2.4.1.4. Factores que afectan la CMI

La reproducibilidad de la CMI depende de variables críticas que deben controlarse estrictamente:

- **Inóculo:** La densidad de esporas o fragmentos de micelio debe estandarizarse (normalmente de  $0,4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL para hongos filamentosos), ya que un inóculo excesivamente alto puede distorsionar el valor de la CMI (Espinel-Ingroff et al., 1997).
- **Temperatura y tiempo:** Para hongos de crecimiento lento, como *P. fijiensis*, los tiempos de incubación pueden ser mayores, lo que requiere que la estabilidad química del compuesto evaluado se mantenga durante varios días (Espinel-Ingroff et al., 1997).
- **Solubilidad:** La hidrofobicidad de los lípidos requiere el uso de emulsionantes (como Tween 80) o disolventes (DMSO) en concentraciones no tóxicas para el hongo para garantizar un contacto eficaz entre el extracto y el microorganismo (Eloff, 1998).

#### **2.4.1.5. Criterios de actividad para productos naturales**

A diferencia de los antibióticos sintéticos puros, cuyas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) se miden a bajas concentraciones ( $\mu\text{g/mL}$ ), los extractos naturales son mezclas complejas (Gibbons, 2004). La comunidad científica ha desarrollado criterios para determinar la actividad de los extractos. Generalmente, se considera que un extracto crudo posee una actividad antimicrobiana significativa si su CMI es inferior a  $1000 \mu\text{g/mL}$  ( $1 \text{ mg/mL}$ ). Valores superiores a esta concentración suelen indicar baja actividad o inespecificidad para uso clínico o agrícola (Gibbons, 2004; Ríos & Recio, 2005).

## Capítulo 3

### Materiales y métodos

#### 3.1. Obtención de las muestras de *Pseudocercospora fijiensis*

Las muestras de hojas infestadas fueron recolectadas en la finca *El Paraíso Bananero* con las coordenadas 2°26'32"S; 79°24'55"W, misma que se localiza en el cantón La Troncal, provincia de Cañar. Dentro del área de muestreo se identificó visualmente una planta de banano que presentaba lesiones necróticas y sintomatología compatible causada por el hongo fitopatógeno *P. fijiensis*. Posterior a la recolección de las hojas afectadas, se trasladó manteniendo las condiciones ambientales del lugar con la finalidad de proceder con el aislamiento del patógeno en el laboratorio.

**Figura 1.** Ubicación de la Finca El Paraíso.



Nota. Extraída de Google Maps por los autores (2026)

#### 3.2. Aislamiento del hongo filamentoso

##### 3.2.1. Preparación de medio de cultivo SDA

Previo a la preparación del medio selectivo, se llevó a cabo la esterilización y desinfección de los materiales de laboratorio. Posteriormente, se preparó el medio de cultivo pesando 4,55 g de SDA (Sabouraud Dextrosa Agar), los cuales fueron disueltos en 70 mL de agua destilada. La mezcla se colocó sobre una plancha de calentamiento hasta obtener la

completa solubilización del agar; se tapó el envase con papel aluminio para ser llevado a la autoclave (*Marca: Hirayama; modelo: HVE50*) a una temperatura de 121 °C durante 1 hora a una presión de 1 atm.

### **3.2.2. Preparación de medio de cultivo PDA**

Para la preparación del medio nutritivo, se llevó a cabo la esterilización y desinfección de los materiales de laboratorio. Posteriormente, se pesó 5,46 g de PDA (Papa Dextrosa Agar), de los cuales fueron disueltos 140 mL de agua destilada. La mezcla se colocó sobre una plancha de calentamiento hasta obtener la completa solubilización del agar; se tapó el envase con papel aluminio para ser llevado a la autoclave (*Marca: Hirayama; modelo: HVE50*) a una temperatura de 121 °C durante 1 hora a una presión de 1 atm.

### **3.2.3. Preparación de medio PDB**

Para la preparación del medio nutritivo, se llevó a cabo la esterilización y desinfección de los materiales de laboratorio. Posteriormente se pesó 3,12 g De PDB (Papa Dextrosa Broth), los cuales fueron disueltos 130 mL de agua destilada. La mezcla se colocó sobre una plancha de calentamiento hasta obtener la completa solubilización del agar, dentro de una cabina de flujo laminar se dispensó el medio en tubos de ensayo de 15 ml con tapa, luego fue llevado a la autoclave (*Marca: Hirayama; modelo: HVE50*) a una temperatura de 121 °C durante 1 hora a una presión de 1 atm.

**Figura 2.** Dispensación de medio PDB en tubos de ensayo.



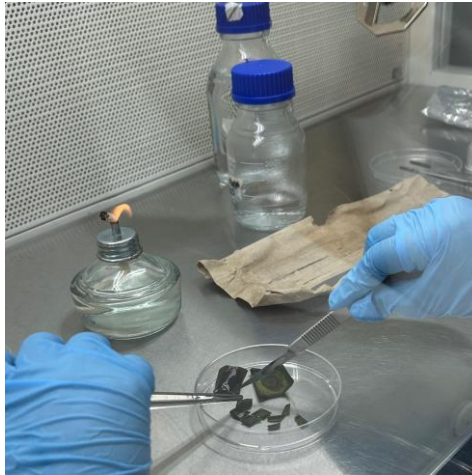
Nota. Tomada por los autores (2026)

#### **3.2.4. Preparación del material vegetal**

Para la preparación del material vegetal se realizó con base en la metodología propuesta por Conde-Ferrández (2008), para el aislamiento de conidios de *Pseudocercospora fijensis* efectuando ligeras modificaciones debido a las condiciones del laboratorio.

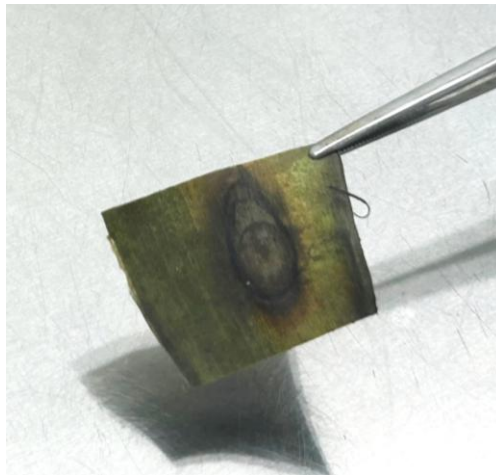
En una primera etapa, se llevó a cabo la desinfección superficial de las muestras mediante el uso de hipoclorito de sodio al 0,1%, en la cual se sumergieron fragmentos de hoja de aproximadamente de 4x4 cm, previamente recolectados en campo, durante un periodo de 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los fragmentos fueron retirados con unas pinzas estériles y se eliminó el exceso de solución mediante suaves movimientos de escurrido con agua destilada estéril.

**Figura 3.** Corte de fragmentos de la hoja del banano.



Nota. Tomada por los autores (2026)

**Figura 4.** Fragmento de la hoja del banano.



Nota. Tomada por los autores (2026)

Posteriormente, el material vegetal fue sumergido en alcohol al 70% durante 5 minutos, repitiendo el proceso de escurrido para retirar el desinfectante. Finalmente, las muestras se enjuagaron con agua destilada estéril durante 10 minutos, tras lo cual se procedió inmediatamente a las siembras en medios de cultivo. (Anexo 1)

**Figura 5.** Proceso de desinfección por hipoclorito de sodio al 0,1%.

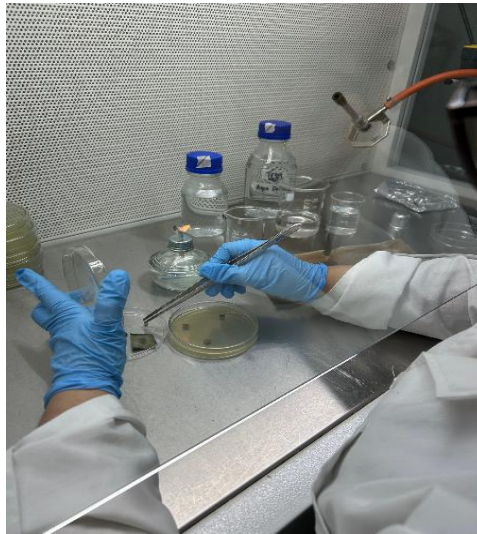


Nota. Tomada por los autores (2026)

### **3.2.5. Siembra de las muestras foliares**

La inoculación del material vegetal se llevó a cabo se realizó en medio selectivo para hongos SDA. Inicialmente se realizaron ensayos por duplicado, empleando dos fragmentos de tejido foliar por placa. Así mismo se efectuaron repeticiones por triplicado, colocando un solo fragmento por unidad experimental. Posteriormente, las placas fueron selladas y trasladadas a la incubadora, donde se mantuvieron a 27°C durante 8 días, con el fin de favorecer el desarrollo fúngico.

**Figura 6.** Siembra de muestras foliares.



Nota. Tomada por los autores (2026)

### **3.2.6. Resiembra de las muestras material micelial**

Una vez evidenciado el crecimiento fúngico en el medio de cultivo selectivo, se procedió a la resiembra del hongo *Pseudocercospora fijensis*, con el objetivo de tener cultivos con mayor grado de pureza. Así fue como se seleccionaron fragmentos de micelio en crecimiento activo, realizando cortes de 0,5 x 0,5 mm en el agar a partir del borde de la colonia y se transfirieron a nuevas placas con medio SDA. Finalmente fueron incubadas a 27°C durante 8 días, con el fin de favorecer el desarrollo fúngico.

Este procedimiento se realizó varias veces, hasta aislar al hongo *P. fijensis*. Luego el hongo fue pasado a medios PDA y PDB para que este se mantenga los nutrientes necesarios durante el periodo de los siguientes análisis para esta investigación.

#### **3.2.6.1. Identificación morfológica microscópica de *Pseudocercospora fijensis***

Para este procedimiento, las estructuras miceliales fueron observadas al microscopio mediante tinción con azul de lactofenol, lo que permitió identificar los conidios con

características morfológicas propias del hongo. Así mismo se envió una muestra a los laboratorios de IDgen para la confirmación de nuestros resultados morfológicos. (Anexo 2).

### 3.2.6.2. Identificación molecular de *Pseudocercospora fijensis*

La identificación a nivel molecular fue realizada por el laboratorio especializado en análisis molecular IDgen, mediante el uso de la técnica de *barcoding* RPB2 para hongos. Este procedimiento incluyó la extracción de ADN, la amplificación del fragmento genético mediante PCR y la posterior secuenciación. Permitiendo la comparación de las secuencias obtenidas con bases de datos como referencia para su determinación taxonómica. El informe detallado del análisis se presenta en el **Anexo 3**.

### 3.3. Obtención de especímenes de *Rhynchophorus palmarum* L.

Las larvas fueron adquiridas en la feria “Las Nacionalidades”, ubicada en el cantón de Lago Agrio, provincia de Sucumbíos. Durante la selección, se priorizaron los individuos de mayor tamaño, asumiendo que correspondían a estadios larvales avanzados. Posteriormente, las muestras fueron transportadas hasta el laboratorio en recipientes acondicionados con sustrato de palma de coco, con el fin de preservar viabilidad.

**Figura 7.** Feria de las Nacionalidades, Lago Agrio, Ecuador.



Nota. Tomada por los autores (2026)

### **3.3.1. Identificación taxonómica de especímenes de *Rhynchophorus palmarum* L.**

Se realizó la identificación taxonómica de la especie con el fin de confirmar que correspondían a *R. palmarum* L., para lo cual se seleccionaron cinco larvas representativas. Estas fueron analizadas mediante esteromicroscopía, permitiendo la observación detallada de las estructuras morfológicas externas, con el objetivo de verificar la concordancia de sus características anatómicas con los criterios de la especie.

### **3.3.2. Extracción orgánica de lípidos desde las cutículas larvarias**

#### **3.3.2.1. Acondicionamiento y limpieza inicial de las muestras biológicas**

Las larvas de *R. palmarum* L. fueron sometidas a un proceso inicial de saneamiento con el fin de eliminar restos de sustrato y seleccionar únicamente especímenes vivos y en buen estado fisiológico. Posteriormente, se distribuyeron en tres contenedores, donde se realizaron lavados sucesivos con agua destilada para remover impurezas superficiales provenientes del medio de transporte. Para detener la actividad metabólica y facilitar la manipulación tisular, las larvas limpias se secaron superficialmente y se sometieron a congelación a -4 °C durante 24 horas.

#### **3.3.2.2. Disección y aislamiento de la cutícula**

Transcurrido este tiempo, las larvas fueron sometidas a disección mediante una incisión dorsal longitudinal, retirando la totalidad del contenido interno (vísceras, cuerpo graso y hemolinfa) para aislar exclusivamente la cutícula.

Las cutículas obtenidas fueron sometidas a un riguroso protocolo de limpieza y desinfección para asegurar la ausencia de contaminantes microbianos en los ensayos posteriores. El protocolo consistió en:

- Lavados exhaustivos con agua destilada estéril (3 minutos cada uno).
- Inmersión en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5% durante 30 segundos.
- Enjuague final con alcohol al 70% para asegurar la asepsia y facilitar la evaporación del agua remanente

Posteriormente, las cutículas se dispusieron en bandejas de aluminio y se llevaron a una estufa de desecación a 37 °C durante 48 horas hasta obtener peso constante. Una vez secas, las cutículas fueron trituradas y pulverizadas mecánicamente hasta obtener un tamaño de partícula fino y homogéneo, maximizando así el área de contacto con el solvente de extracción. **(Anexo 4)**

#### **3.3.2.3. Extracción de lípidos cuticulares de *Rhynchophorus palmarum* L.**

Para recuperar la fracción de lípidos cuticulares superficiales (ceras e hidrocarburos), se pesó la cutícula pulverizada y se añadió n-hexano en proporción 1:10. La mezcla se mantuvo en maceración pasiva en frascos ámbar cerrados durante 15 minutos a temperatura ambiente. Este solvente apolar solubiliza selectivamente los lípidos de la epicutícula sin extraer componentes polares intracelulares (Gołębiowski et al., 2011). **(Anexo 5).**

#### **3.3.2.4. Concentración y acondicionamiento de los extractos**

Una vez concluido el tiempo de extracción, la muestra se llevó a la centrifuga (*Marca: Daihan; modelo: CEF-D50.6*) a 4000 rpm durante 10 minutos con el fin de favorecer la sedimentación del material sólido. El sobrenadante se sometió a filtración al vacío con papel filtro Whatman Grado 1 para eliminar cualquier tipo de impureza.

### **3.3.2.5. Recuperación del n-hexano**

Las muestras filtradas fueron transferidas a balones y estos se sometieron a evaporación de presión reducida utilizando un rotavapor (*Marca: HEIDOLPH; modelo: Hei-VAP Core*), manteniendo la temperatura del baño en 37°C a una regulación al vacío de 300 mbar, tras la evaporación del solvente, los extractos crudos fueron transferidos a viales de vidrio ámbar previamente estériles.

Finalmente, se almacenaron a una temperatura de -20°C con el objetivo de preservar la estabilidad química de los extractos lipídicos hasta su evaluación.

## **3.4. Microdilución *in vitro* en placa multipocillo**

Las pruebas biológicas se realizaron mediante el método de microdilución en placa, siguiendo lineamientos estandarizados establecidos por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) y el European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), organismos internacionales encargados de la validación de metodologías para la evaluación de la susceptibilidad antifúngica, lo que garantiza la reproducibilidad y confiabilidad de los ensayos. Como referencia, se empleó el protocolo para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de agentes antifúngicos mediante dilución en caldo en hongos formadores de conidios, según la EUCAST Technical Note on the Method for the Determination of Broth Dilution Minimum Inhibitory Concentrations of Antifungal Agents for *Conidia*-forming Moulds (EUCAST, 2008).

### **3.4.1. Preparación de controles**

Para el establecimiento de los controles del ensayo, se prepararon soluciones específicas que permitieron validar los resultados obtenidos en la prueba de microdilución.

Como control natural se empleó el terpineol, el cual fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) hasta alcanzar una concentración al 10%. De manera análoga, la estreptomicina se preparó bajo las mismas condiciones como control sintético. Adicionalmente, se utilizó fluconazol disuelto en agua destilada estéril como control sintético antifúngico de referencia.

El control positivo estuvo constituido por medio de cultivo inoculado con el hongo, mientras que el control negativo consistió en medio de cultivo suplementado únicamente con DMSO.

#### **3.4.2. Preparación de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC)**

La solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% se preparó con 24 horas de antelación. Para ello, se empleó en un vial ámbar, en donde se disolvieron 100 mg de TTC de grado analítico en 10 mL de agua destilada estéril y se almacenó en refrigeración.

#### **3.4.3. Preparación de concentraciones de lípidos cuticulares**

La solución de los lípidos cuticulares se preparó mediante un cálculo de la relación peso/volumen (p/v). Para la concentración al 8%, se pesaron 120 mg de lípidos cuticulares de *R. palmarum* L., los cuales se disolvieron en 1,5 mL de DMSO y se homogeneizaron mediante agitación en vórtex. De manera similar, la solución de al 4% se obtuvo pesando 60 mg de lípidos cuticulares y adicionando 1,5 ml de DMSO seguida de la homogenización en vórtex. Finalmente, para la concentración al 2%, se emplearon 30 mg del material lipídico, los cuales se disolvieron en 1,5 ml de DMSO y se sometieron al mismo proceso de homogenización.

#### **3.4.4. Estandarización del inóculo**

En los tubos de ensayo en donde se inoculó el hongo se lo llevó a agitar en el vortex (*Marca: OHAUS; modelo: VXMNAL*) durante 2 minutos para homogenizar la muestra.

La estandarización del inóculo se llevó a cabo utilizando en el espectrofotómetro (*Marca: HACH; modelo: DR 6000*), a una longitud de onda de 625 nm, con el objetivo de ajustar la densidad óptica hasta alcanzar una concentración final de  $2 \times 10^4$  células/mL. Para ello, se adicionó medio en caldo de PDB de manera gradual hasta obtener la concentración requerida.

#### **3.4.5. Inoculación en placa multipocillo**

La inoculación se llevó a cabo siguiendo los lineamientos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para ensayos de susceptibilidad antifúngica mediante microdilución en caldo (documento CLSI M38), adaptados a las condiciones específicas del estudio. Para ello, se empleó una placa multipocillos estéril de 96 pozos, organizada para evaluar la actividad antifúngica de los lípidos cuticulares, así como los controles experimentales.

Para la preparación de las diluciones se realizó el siguiente protocolo, en la fila A se dispensaron 180  $\mu$ L de medio de cultivo PDB estéril, adicionando 20  $\mu$ L para las columnas 1, 2 y 3 de lípidos cuticulares a una concentración inicial del 2%, en la columna 5 se destinó con 20  $\mu$ L al control natural con terpineol, la columna 6 con 20  $\mu$ L al control con fluconazol y la columna 7 con el control sintético con estreptomycin. La columna 9 correspondió al control de esterilidad del medio (este sin el inóculo), la columna 11 al control negativo (medio de cultivo suplementado con DMSO) y la columna 12 al control positivo (constituido con el medio de cultivo inoculado).

A partir de la primera columna se alcanzó un volumen inicial de 200  $\mu\text{L}$  por pozo, mientras que en las columnas inferiores (B-H) solo se dispensaron 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo estéril. Se realizó una dilución seria horizontal de 1:2 mediante la transferencia de 100  $\mu\text{L}$  de cada pozo adyacente, utilizando una pipeta multipocillos, homogenizando por aspiración y dispensación. Este procedimiento se repitió sucesivamente hasta la fila H, descartándose los 100  $\mu\text{L}$  finales, de manera que todos los pozos conservaron un volumen uniforme de 100  $\mu\text{L}$ .

Posteriormente, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de la suspensión fúngica previamente estandarizada en los pozos correspondientes a las columnas 1 a la 9 y 12.

**Figura 8.** Protocolo de microdilución en placa multipocillos.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b>A</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I
<b>B</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I
<b>C</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I
<b>D</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I
<b>E</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I
<b>F</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I
<b>G</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I
<b>H</b>	2%	2%	2%		T	F	E		M		M+DMSO	M+I

Nota. Realizado por los autores (2026)

La placa fue llevada a incubadora agitadora por 48 horas a una temperatura de 27°C. Transcurrido este periodo, se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de la solución TTC al 10% en todos los pocillos, excepto los vacíos. Posteriormente, se volvieron a incubar en agitación durante 18 horas a 70 rpm a una temperatura de 27°C.

### 3.4.5.1. Lectura de placa multipocillos

Se evidenciaron variaciones en la coloración de los pocillos, atribuibles a la reacción óxido-reducción del TTC como resultado de la actividad metabólica celular. A partir de estos cambios cromáticos, se procedió a la determinación cuantitativa de la concentración mínima inhibitoria (CMI). La lectura de la placa multipocillos se realizó mediante un lector

de microplacas (*Marca: THERMO SCIENTIFIC; modelo Multiskan FC*) a una longitud de onda de 450 nm. El equipo fue configurando de acuerdo con los protocolos que se iban realizando, la coloración azul o celeste se identificaba al compuesto de estudio, mientras que los controles se caracterizaban por un color amarillo.

**Figura 9.** Diseño experimental para la máquina multiskan FC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2%0001 0.1648	2%0001 0.1550	2%0001 0.1575		Ter0001 0.1435	fluconazol00 01 0.1589	estreptomici na0001 0.4005		medio0001 0.1510		medio +dms00001 0.1315	medio +hongo0001 1.3582
B	2%0001 0.4476	2%0001 0.3493	2%0001 0.2799		Ter0001 0.1472	fluconazol00 01 0.1615	estreptomici na0001 0.3606		medio0001 0.1473		medio +dms00001 0.1415	medio +hongo0001 0.5144
C	2%0001 0.5469	2%0001 0.3766	2%0001 0.3567		Ter0001 0.1535	fluconazol00 01 0.3167	estreptomici na0001 0.3430		medio0001 0.1443		medio +dms00001 0.1388	medio +hongo0001 0.5580
D	2%0001 0.5972	2%0001 0.4371	2%0001 0.4567		Ter0001 0.1712	fluconazol00 01 0.7061	estreptomici na0001 0.4678		medio0001 0.1403		medio +dms00001 0.1477	medio +hongo0001 0.5558
E	2%0001 0.8228	2%0001 0.6572	2%0001 0.3319		Ter0001 0.3538	fluconazol00 01 0.3043	estreptomici na0001 0.5022		medio0001 0.1439		medio +dms00001 0.1257	medio +hongo0001 0.7665
F	2%0001 0.9027	2%0001 0.6299	2%0001 0.5791		Ter0001 0.3434	fluconazol00 01 0.4738	estreptomici na0001 0.4528		medio0001 0.1390		medio +dms00001 0.1272	medio +hongo0001 0.5406
G	2%0001 0.7583	2%0001 0.5868	2%0001 0.5194		Ter0001 0.4159	fluconazol00 01 0.5145	estreptomici na0001 0.6031		medio0001 0.1588		medio +dms00001 0.1331	medio +hongo0001 0.5859
H	2%0001 0.7757	2%0001 0.6575	2%0001 0.5568		Ter0001 0.4416	fluconazol00 01 0.5602	estreptomici na0001 0.5119		medio0001 0.1350		medio +dms00001 0.1249	medio +hongo0001 0.5874

Nota. Elaborado por los autores (2026)

Para la determinación de los valores correspondientes a la concentración mínima inhibitoria (CMI), es necesario emplear diversos parámetros y datos experimentales obtenidos a partir de los ensayos realizados.

Una vez realizada la lectura de la placa, el sistema genera automáticamente los resultados, los cuales constituyen los datos experimentales del ensayo. Con la siguiente fórmula:

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

Donde:

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

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




## Capítulo 4

### Resultados y Discusiones

#### 4.1. Identificación taxonómica de *Rhynchophorus palmarum* L.



La identificación taxonómica se realizó mediante la observación directa de las larvas con un estereomicroscopio. Las larvas examinadas presentaron características típicas del género *Rhynchophorus* y de la especie *R. palmarum* L., como se describe en las claves taxonómicas. El cuerpo, eruciforme (tipo oruga), carecía de patas (ápodo), robusto, ligeramente curvado en la base y de color blanco cremoso. A nivel cefálico se apreciaba una cápsula cefálica bien esclerotizada, de color marrón rojizo u oscuro. Mediante el estereomicroscópico se identificó mandíbulas robustas de tres dientes, adaptadas para triturar tejido fibroso. En la región abdominal se observaron espiráculos laterales y una placa terminal anal, característicos de la subfamilia *Dryophthorinae*. La ausencia de patas torácicas y la morfología del pronoto confirmaron la etapa larvaria de *R. palmarum* L.

**Tabla 1.** Resultados a nivel cefálico del *R. palmarum* L.

<p>A</p> 	<p>B</p> 	<p>C</p> 
<p>A: Membrana post occipital mostrando escleritos cervicales</p>	<p>B: Antenas en posición oblicua en el margen anterior de la cabeza; sensorio más largo que ancho, subcónico, circular en vista apical</p>	<p>C: Cabeza expuesta, más larga que ancha, fuertemente esclerotizada y pigmentada de color marronrojizo, con rayas palidecientes</p>


Nota. Realizada por Autores (2026)

**Tabla 2.** Resultados en la región anal del *R. palmarum* L.

<p>A</p> 	<p>B</p> 
<p>A: Segmentos dorsales con setas largas formando un disco dorsal esclerotizado.</p>	<p>B: En el margen anal se distinguen pequeñas proyecciones blanquecinas correspondientes a estructuras cuticulares accesorias asociadas al orificio anal.</p>

Nota. Realizada por Autores (2026)

**Tabla 3.** Aspecto de la larva de *R. palmarum* L.

<p>A</p> 
<p>A: Aspecto de la larva en el tercer estadio.</p>

Nota. Realizada por Autores (2026)

La morfología observada es totalmente consistente con las descripciones diagnósticas presentadas por Vásquez-Ordóñez et al., 2020, quienes destacan que, si bien las larvas de *R. palmarum* L. comparten similitudes con otras especies como *Dynamis borassi*, se pueden distinguir por la estructura de las piezas bucales y la placa terminal abdominal. La coloración de la cabeza y las robustas mandíbulas son características de las últimas etapas larvarias de esta especie, que ha evolucionado para excavar en los troncos de las palmas aceiteras y cocoteras (Hagley, 1965). El uso de un estereomicroscopio resultó esencial para confirmar la identidad de la muestra biológica antes de la extracción química, garantizando así que los lípidos obtenidos provenían efectivamente de *R. palmarum* L. y no de especies simpátricas invasoras.

#### **4.2. Rendimiento del extracto lipídico de cutículas**

El proceso de extracción orgánica permitió aislar la fracción lipídica presente en las cutículas de las larvas. A partir de una masa inicial de cutículas secas de 10g, se obtuvo un peso final de extracto crudo de 1,32 g.

El extracto obtenido presentó una consistencia aceitosa/viscosa y una coloración amarilla ámbar. El rendimiento total de la extracción se calculó mediante la siguiente relación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = (\text{Peso del extracto (g)} / \text{Peso de cutícula seca (g)}) \times 100$$

Aplicando la fórmula, se determinó un rendimiento de extracción del 13,2%.

Un rendimiento del 13,2 %, obtenido con una breve maceración en hexano, demuestra el alto contenido lipídico de la cutícula de *R. palmarum* L. A diferencia de la extracción Soxhlet completa, que permite la recuperación de lípidos internos (que, según Batalha et al., 2020, pueden alcanzar el 60 % del peso seco de estas larvas), la

técnica de lavado superficial empleada permitió el aislamiento selectivo de los lípidos cuticulares. Según Batalha et al., 2020, la cutícula del insecto está recubierta por una compleja capa de hidrocarburos, ácidos grasos libres y ésteres de cera que desempeñan un papel crucial en su protección contra la desecación y los patógenos. Un rendimiento superior al 10 % solo para la fracción cuticular sugiere que *R. palmarum L.* invierte una parte significativa de sus recursos energéticos en esta barrera química. En comparación con otros insectos como *Tenebrio molitor*, en el que los lavados superficiales suelen producir menos del 5-8 % de lípidos cuticulares (Laroche et al., 2019), este valor confirma el potencial de *R. palmarum L.* como fuente abundante de biomoléculas lipofílicas.

#### 4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se evaluó la actividad antifúngica de un extracto orgánico de cutícula de *R. palmarum L.* y un control positivo (fluconazol) contra *Pseudocercospora fijiensis* mediante microdilución. Los resultados mostraron una inhibición dependiente de la concentración para ambos tratamientos (Tabla 1).

**Tabla 4.** Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *P. fijiensis*.

Tratamiento	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )	Efecto observado
Extracto de <i>R. palmarum L.</i>	666.67	Inhibición completa hasta dilución 1:4
Fluconazol	107.67	Inhibición completa hasta dilución 1:8

Nota. Realizada por Autores (2026)

El extracto presentó una CMI de 666,67  $\mu\text{g/mL}$ . A concentraciones más bajas (333,33  $\mu\text{g/mL}$ ), se observó crecimiento fúngico, lo que estableció el límite de eficacia biológica. El fluconazol, por otro lado, demostró mayor eficacia con una CMI de 107,67  $\mu\text{g/mL}$ .

**Tabla 5.** Porcentaje de inhibición de los lípidos cuticulares de *R. palmarum L.* y del control sintético.

<b>EXTRACTO AL 2%</b>			
Pocillo	Factor de dilución	Concentración( $\mu\text{g/mL}$ )	Estado
A	Original	2666,67	Inhibido
B	1:2	1333,33	Inhibido
C	1:4	666,67	Inhibido (CMI)
D	1:8	333,33	Crecimiento

Nota. Realizada por Autores (2026)

**Tabla 6.** Concentraciones de inhibición del extracto lipídico de *R. palmarum L.*

	<b>Tabla de % Inhibición</b>			Control sintético Fluconazol 6
	Extracto 2% 1	Extracto 2% 2	Extracto 2% 3	
<b>A</b>	97,98	99,41	99,05	98,84
<b>B</b>	56,05	70,44	80,60	97,92
<b>C</b>	41,08	66,01	68,92	74,77
<b>D</b>	33,14	56,57	53,70	17,20
<b>E</b>	0,65	24,88	72,49	76,53
<b>F</b>	-11,76	28,16	35,60	51,01
<b>G</b>	12,27	37,37	47,23	47,95
<b>H</b>	6,24	23,54	38,27	37,78

Nota. Realizada por Autores (2026)

**Tabla 7.** Concentraciones del fluconazol, control sintético.

<b>FLUCONAZOL</b>			
Pocillo	Factor de dilución	Concentración( $\mu\text{g/mL}$ )	Estado
A	Original	861,33	Inhibido
B	1:2	430,67	Inhibido
C	1:4	215,33	Inhibido
D	1:8	107,67	Inhibido (CMI)

Nota. Realizada por Autores (2026)

El valor de CMI obtenido para el extracto de cutícula de *R. palmarum L.* (666,67  $\mu\text{g/mL}$ ) ubica a este subproducto en la categoría de actividad biológica moderada a alta entre los compuestos naturales crudos. Al comparar este resultado con la literatura

existente sobre el control botánico de la sigatoka negra, se puede observar que el extracto demuestra una eficacia superior en comparación con varias otras fuentes herbales. Por ejemplo, estudios previos informaron que se necesitaban concentraciones de extracto de hoja de canela cruda de hasta 5000 µg/mL (0,5%) para inhibir eficazmente *P. fijiensis* (Darmadi et al., 2019), lo que sugiere que la cutícula de *R. palmarum L.* tiene una potencia significativamente mayor por unidad de masa. Además, nuestros resultados son consistentes con estudios de otras especies promisorias como *Ocimum gratissimum*, que reportaron valores de CMI que oscilan entre 625 y 1250 µg/mL frente a hongos fitopatógenos (Lima et al., 2022).

#### **4.4. Análisis Estadístico de la Inhibición**

El análisis descriptivo del porcentaje de inhibición causado por el extracto de cutícula de *R. palmarum L.* mostró una inhibición media del 58,67% y un valor mediano del 66,01%.

Los datos obtenidos mostraron una variación significativa entre réplicas, reflejada por una desviación estándar (DE) de  $\pm 73,47$ . Esta alta variabilidad indica que, a pesar del alto potencial inhibitorio del extracto (mediana superior a la media), la respuesta biológica no fue uniforme en todas las unidades experimentales. Además, el coeficiente de variación supera el 100%, lo que indica la naturaleza compleja y rugosa de la matriz evaluada en comparación con el control sintético.

**Tabla 8.** Estadístico descriptivo del MIC.

<b>POTENCIA</b>	
	1687,92
	4356,75
	4749,67
<b>SUMA:</b>	10794,35
<b>VARIANZA:</b>	5397,17
<b>DESVIACIÓN:</b>	73,47

<b>MEDIA</b>	58,67
<b>MEDIANA</b>	66,01
<b>DESVIACIÓN ESTANDAR</b>	73,47

Nota. Realizada por Autores (2026)

El análisis estadístico reveló una alta variabilidad (desviación estándar  $\pm 73,47$ ) debido a las propiedades fisicoquímicas del extracto. El análisis de la composición de la cutícula de *R. palmarum* L. indica un alto contenido de lípidos y ácidos grasos de cadena larga (Batalha et al., 2020). Estos compuestos hidrofóbicos tienden a formar emulsiones inestables en medios de cultivo acuosos, lo que explica la heterogeneidad de la inhibición entre réplicas. Sin embargo, el hecho de que la mediana (66,01 %) sea mayor que la media (58,67 %) indica que el principal efecto biológico es inhibitorio, y los valores más bajos corresponden a excepciones experimentales, probablemente relacionadas con la solubilidad, un fenómeno común en los extractos lipídicos crudos (Kett et al., 2021).

La capacidad inhibitoria observada se debe probablemente a la cutícula del insecto, que actúa como una barrera inmune activa rica en péptidos y lípidos antimicrobianos que alteran la permeabilidad de las membranas fúngicas (Kett et al., 2021). Aunque el fluconazol es aproximadamente seis veces más potente (107,67  $\mu\text{g/ml}$ ), esta diferencia es esperable al comparar un extracto complejo con el producto puro. Dada la creciente resistencia de *P. fijiensis* a los fungicidas azólicos (Aguilar-

Barragan et al., 2014), este extracto representa una fuente prometedora de nuevos metabolitos biológicamente activos.

## Capítulo 5

### Conclusiones y Recomendaciones

#### 5.1. Conclusiones

La identidad taxonómica de *Rhynchophorus palmarum* L. se confirmó mediante microscopía estereoscópica, que confirmó la correspondencia inequívoca de las materias primas utilizadas con los estadios larvarios de esta especie de plaga basándose en características diagnósticas clave como la morfología de la cabeza y el abdomen.

El método de maceración con hexano resultó eficaz en el aislamiento de lípidos cuticulares, con un rendimiento del 13,2 %. Esto demuestra que la cutícula de *R. palmarum* L. no solo representa una barrera física, sino también un reservorio químico rico en compuestos lipofílicos extraíbles.

Un extracto orgánico de cutícula de *Rhynchophorus palmarum* L. demostró una actividad antifúngica eficaz contra *Pseudocercospora fijiensis* con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 666,67  $\mu\text{g/mL}$ . A pesar de la alta variabilidad estadística (desviación estándar  $\pm 73,47$ ) debida a la naturaleza lipídica del extracto, la inhibición media (66,01%) confirma su potencial bioactivo, superando la eficacia de otros extractos vegetales descritos en la literatura, como el extracto de canela.

El extracto mostró un comportamiento dosis-dependiente cualitativamente comparable al del fluconazol, lo que confirma el potencial de los subproductos de este insecto como fuente no convencional para el desarrollo de biofungicidas.

Este estudio confirma que los subproductos (cutícula) de las larvas de *R. palmarum* L. contienen metabolitos con significativa actividad fungistática. Estos

resultados sugieren que los lípidos cuticulares, un componente del sistema de defensa natural del insecto, podrían servir de base para el desarrollo de nuevos biofungicidas para el control de la Sigatoka negra.

## 5.2. Recomendaciones

Dada la alta desviación estándar observada ( $\pm 73,47$ ) y la naturaleza lipofílica del extracto, se recomiendan estudios futuros para desarrollar sistemas de administración o formulaciones que mejoren la solubilidad de los lípidos cuticulares en medios acuosos. El uso de nanoemulsiones o la inclusión de surfactantes biocompatibles como Tween 80 en concentraciones optimizadas, garantizará una dispersión homogénea de los metabolitos activos, reduciendo así la variabilidad experimental y potencialmente disminuyendo la CMI al aumentar la biodisponibilidad del extracto para el hongo.

Dada la prometedora actividad del extracto crudo (CMI 666,67  $\mu\text{g/mL}$ ), se propone el fraccionamiento químico para aislar y purificar los compuestos específicos responsables de la actividad antifúngica. La identificación del tipo de actividad (ácidos grasos libres, ésteres de cera o péptidos antimicrobianos) permitirá la producción de un compuesto con una eficacia comparable o incluso superior a la de los fungicidas sintéticos comerciales, eliminando al mismo tiempo los compuestos inertes que reducen la actividad.

Tras determinar la actividad *in vitro*, se debe evaluar la seguridad del extracto en el tejido del banano para descartar cualquier efecto fitotóxico. Para verificar si la concentración efectiva de 666,67  $\mu\text{g/ml}$  mantiene su eficacia en condiciones reales, donde los factores ambientales y la estructura foliar pueden influir en la actividad del biofungicida, se recomiendan bioensayos *ex vivo* en hojas de banano infectadas o ensayos en invernadero.

### Referencias bibliográficas

- Agrios, G. N. . (2005). *Plant pathology*. Elsevier Academic Press.
- Aguilar-Barragan, A., García-Torres, A. E., Odriozola-Casas, O., Macedo-Raygoza, G., Ogura, T., Manzo-Sánchez, G., James, A. C., Islas-Flores, I., & Beltrán-García, M. J. (2014). Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. *Brazilian Journal of Microbiology*, *45*(1), 359–364. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822014000100051>
- Ahipo Dué, E., César, H., Zabri, B. L., Parfait, J., Kouadio, E. N., & Kouamé, L. P. (2009). Fatty acid composition and properties of skin and digestive fat content oils from *Rhynchophorus palmarum* L. larva. *African Journal of Biochemistry Research*, *3*(4), 89–094. <http://www.academicjournals.org/AJBR>
- Arango Isaza, R. E., Diaz-Trujillo, C., Dhillon, B., Aerts, A., Carlier, J., Crane, C. F., V. de Jong, T., de Vries, I., Dietrich, R., Farmer, A. D., Fortes Fereira, C., Garcia, S., Guzman, M., Hamelin, R. C., Lindquist, E. A., Mehrabi, R., Quiros, O., Schmutz, J., Shapiro, H., ... Kema, G. H. J. (2016). Combating a Global Threat to a Clonal Crop: Banana Black Sigatoka Pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) Genomes Reveal Clues for Disease Control. *PLOS Genetics*, *12*(8), e1005876. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005876>
- Arzanlou, M., Abeln, E., C. Kema, G. H. J. Waalwijk, C. Carlier, J. de Vries, I. Guzmán, & M. Crous, P. W. (2007). Molecular phylogeny of *Pseudocercospora* and *Mycosphaerella* species from banana: two genera with distinct evolutionary lineages and strategies. *Phytopathology*, *97*(10), 1354–1366.

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Batalha, M. de M. C., Goulart, H. F., Santana, A. E. G., Barbosa, L. A. O., Nascimento, T. G., da Silva, M. K. H., Dornelas, C. B., & Grillo, L. A. M. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of cuticular and internal lipids of the insect *Rhynchophorus palmarum*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 105(1). <https://doi.org/10.1002/arch.21723>
- Cañas-Gutiérrez, G. P., Angarita-Velásquez, M. J., Restrepo-Flórez, J. M., Rodríguez, P., Moreno, C. X., & Arango, R. (2009). Analysis of the CYP51 gene and encoded protein in propiconazole-resistant isolates of *Mycosphaerella fijiensis*. *Pest Management Science*, 65(8), 892–899. <https://doi.org/10.1002/ps.1770>
- Chimbo-Gándara, L. F., Granda-Albuja, G., Mora, J. R., Llumiquinga, E., Ruiz-Uriguen, M., Machado, A., Cisneros-Heredia, D. F., Abreu-Naranjo, R., Giampieri, F., Tejera, E., & Álvarez-Suárez, J. M. (2024). Nutritional, functional, and safety characterization of the edible larva of the South American palm weevil (chontacuro) *Rhynchophorus palmarum* L. from Amazonian Ecuador. *Journal of Food Composition and Analysis*, 134, 106507. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2024.106507>
- CHURCHILL, A. C. L. (2011). *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>

- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Mansilla, J. P., Alfenas, A. C., & Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic reassessment of *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs occurring on Eucalyptus. II. *Studies in Mycology*, *55*, 99–131. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.99>
- Darmadi, A. A. K., Sudirga, S. K., Suriani, N. L., & Wahyuni, I. G. A. S. (2019). Antifungal Activities Of Cinnamon Leaf Extracts Against Sigatoka Fungus (*Pseudocercospora Fijiensis*). *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, *347*(1), 012051. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/347/1/012051>
- Desbois, A. P., & Smith, V. J. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*(6), 1629–1642. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2355-3>
- Dnfouenr, G. R. (1993). *Hypothesizing About Palm Weevil and Palm Rhinoceros Beetle Larvae as Traditional Cuisine, Tropical Waste Recycling, and Pest and Disease Control on Coconut and Other Palms-Can They Be Integrated?* (Vol. 993).
- Eloff, J. (1998). A Sensitive and Quick Microplate Method to Determine the Minimal Inhibitory Concentration of Plant Extracts for Bacteria. *Planta Medica*, *64*(08), 711–713. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957563>
- Espinel-Ingroff, A., Bartlett, M., Bowden, R., Chin, N. X., Cooper, C., Fothergill, A., McGinnis, M. R., Menezes, P., Messer, S. A., Nelson, P. W., Odds, F. C., Pasarell, L., Peter, J., Pfaller, M. A., Rex, J. H., Rinaldi, M. G., Shankland, G. S., Walsh, T. J., & Weitzman, I. (1997). Multicenter evaluation of proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *Journal of Clinical Microbiology*, *35*(1), 139–143. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.1.139-143.1997>

- Gibbons, S. (2004). Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural Product Reports*, 21(2), 263. <https://doi.org/10.1039/b212695h>
- Giblin-Davis, R. M. F. J. R. J. J. A. F.-K. J. E. B.-D. Y. (2013). Biology and management of the red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus*. In J. E. Peña (Ed.), *Potential Invasive Pests of Agricultural Crops* (pp. 1–34). CABI.
- Gołębiowski, M., Boguś, M. I., Paszkiewicz, M., & Stepnowski, P. (2011). Cuticular lipids of insects as potential biofungicides: methods of lipid composition analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(9), 3177–3191. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4439-4>
- GOŁĘBIEWSKI, M., CERKOWNIAK, M., DAWGUL, M., KAMYSZ, W., BOGUŚ, M. I., & STEPNOWSKI, P. (2013). The antifungal activity of the cuticular and internal fatty acid methyl esters and alcohols in *Calliphora vomitoria*. *Parasitology*, 140(8), 972–985. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000267>
- Gullan, P. J. ., & Cranston, P. S. . (2010). *The insects : an outline of entomology* (5th ed.). Wiley-Blackwell.
- Hagley, E. A. C. (1965). On the Life History and Habits of the Palm Weevil, *Rhynchophorus palmarium*. *Annals of the Entomological Society of America*, 58(1), 22–28. <https://doi.org/10.1093/aesa/58.1.22>
- HOLLOMON, D. W. (2015). Fungicide resistance: facing the challenge - a review. *Plant Protection Science*, 51(4), 170–176. <https://doi.org/10.17221/42/2015-PPS>
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. (2013). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC-2012* |.

<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continua-espac-2012/>

Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2023). *Banano, plátano y otras musáceas*. INIAP. <https://www.iniap.gob.ec/banano-platano-y-otras-musaceas/>

Kett, S., Pathak, A., Turillazzi, S., Cavalieri, D., & Marvasi, M. (2021). Antifungals, arthropods and antifungal resistance prevention: lessons from ecological interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1944), 20202716. <https://doi.org/10.1098/rspb.2020.2716>

Laroche, M., Perreault, V., Marciniak, A., Gravel, A., Chamberland, J., & Doyen, A. (2019). Comparison of Conventional and Sustainable Lipid Extraction Methods for the Production of Oil and Protein Isolate from Edible Insect Meal. *Foods*, 8(11), 572. <https://doi.org/10.3390/foods8110572>

Lima, J. T., Souza, A. F. de, & França, H. S. (2022). *Ocimum gratissimum* L.: A natural alternative against fungi associated with bean and maize seeds during storage. *Agronomía Colombiana*, 40(3), 395–402. <https://doi.org/10.15446/agron.colomb.v40n3.105851>

Maceda-Santivañez, J. C. M.-M. J. B. V.-V. N. C. (2021). Larva de *Rhynchophorus palmarum* L. (Coleoptera: Curculionidae): Efecto de la dieta en la síntesis de ácidos grasos esenciales. *Revista Verde de Agroecología e Desenvolvimento Sustentável*, 16(2), 122–130.

Madigan, M. T. ., Martinko, J. M. ., Bender, K. S. ., Buckley, D. H. ., & Stahl, D. Allan. (2015). *Brock biology of microorganisms* (14th ed.). Pearson.

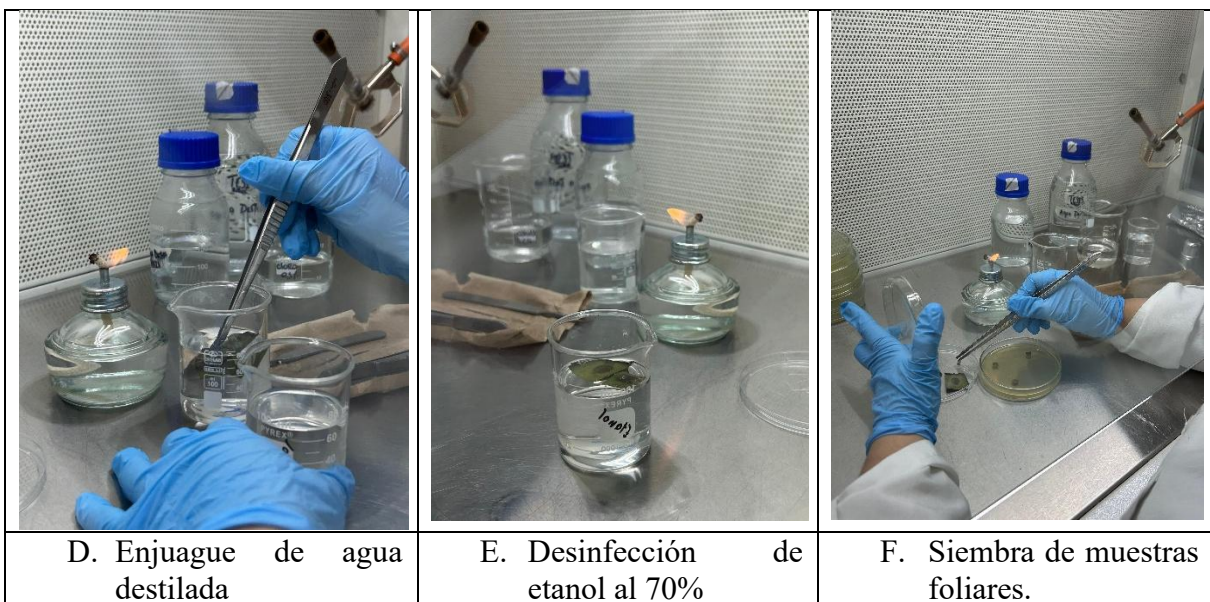
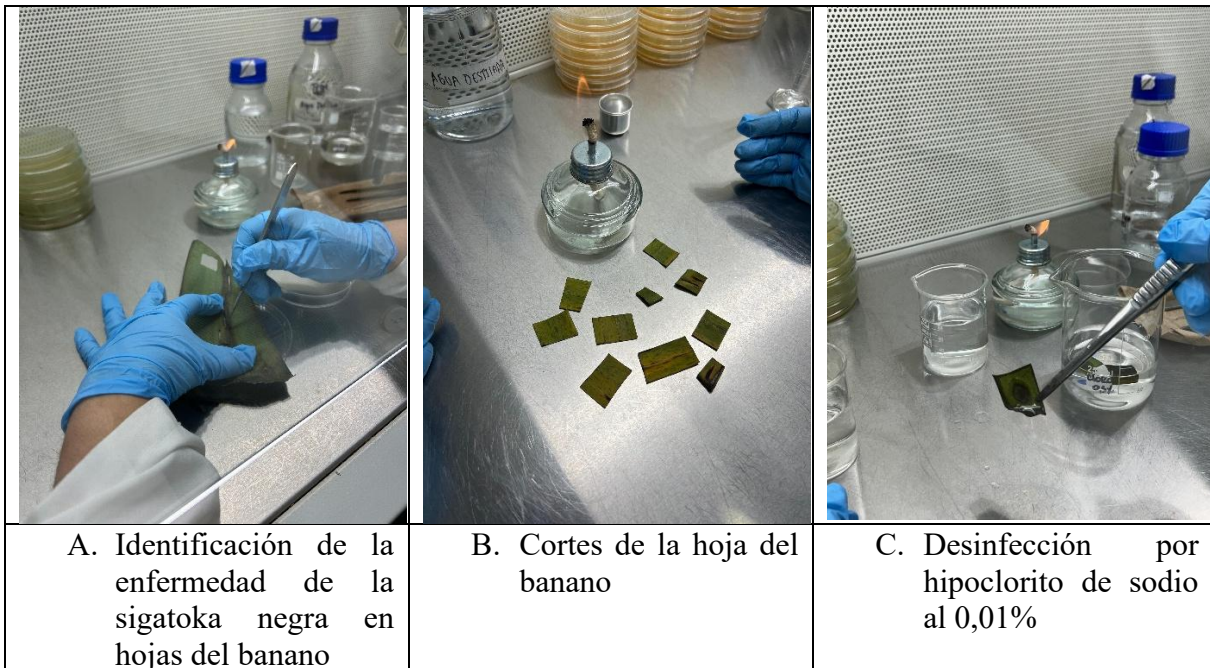
- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M., & Sutton, T. B. (2003). Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. *Plant Disease*, 87(3), 208–222. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2003.87.3.208>
- Millar, J. G., & Haynes, K. F. (Eds.). (1998). *Methods in Chemical Ecology: Chemical Methods* (Vol. 1). Chapman and Hall.
- Peláez Montoya, J. E. Vásquez, L. E. Díaz Brito, T. J. Castañeda Sánchez, D. A. Arango Isaza, & R. E. Giraldo, W. (2006). Uso de un ensayo de microdilución en placa para medir la actividad de compuestos antifúngicos contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 59(2), 3425–3433.
- Ploetz, R. C. (2001). Black Sigatoka of Banana. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2001-0126-01>
- Ratcliffe, N. A., Mello, C. B., Garcia, E. S., Butt, T. M., & Azambuja, P. (2011). Insect natural products and processes: New treatments for human disease. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(10), 747–769. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.05.007>
- Rex, J. H. . (2008). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts : approved standard*. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1–2), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>
- Sánchez, P. A., Jaffé, K. H., & J. V. Cerda, H. (1993). El complejo *Rhynchophorus palmarum* L. (L.) (Coleoptera: Curculionidae) - *Bursaphelenchus cocophilus* (Cobb) (Nematoda: Aphelenchoididae). *Boletín de Entomología Venezolana*, 8(1), 83–90.

- Sánchez, P., Cerda, H., Cabrera, A., & Caetano, F. (1993). Anatomía e histología del sistema digestivo de *Rhynchophorus palmarum* L. (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Boletín de Entomología Venezolana*, 8(1), 1–12.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321–324. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.006>
- Skoog, D. A. ., Holler, F. James., & Crouch, S. R. . (2018). *Principles of instrumental analysis* (7th ed.). Cengage Learning.
- Soares, J. M. S., Rocha, A. J., Nascimento, F. S., Santos, A. S., Miller, R. N. G., Ferreira, C. F., Haddad, F., Amorim, V. B. O., & Amorim, E. P. (2021). Genetic Improvement for Resistance to Black Sigatoka in Bananas: A Systematic Review. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.657916>
- Strobl, E., & Mohan, P. (2020). Climate and the Global Spread and Impact of Bananas' Black Leaf Sigatoka Disease. *Atmosphere*, 11(9), 947. <https://doi.org/10.3390/atmos11090947>
- Vargas, G. E., Espinoza, G., Ruiz, C., & Rojas, R. (2022). VALOR NUTRICIONAL DE LA LARVA DE *Rhynchophorus palmarum* L.: COMIDA TRADICIONAL EN NUTRITIONAL VALUE OF *Rhynchophorus palmarum* L. LARVAE: A TRADITIONAL FOOD FROM THE PERUVIAN AMAZON. In *Rev Soc Quím Perú* (Vol. 79, Number 1).
- Vásquez-Ordóñez, A. A., Löhr, B. L., & Marvaldi, A. E. (2020). Comparative morphology of the larvae of the palm weevils *Dynamis borassi* (Fabricius) and *Rhynchophorus*

palmarum (Linnaeus) (Curculionidae: Dryophthorinae): Two major pests of peach palms in the Neotropics. *Papéis Avulsos de Zoologia*. <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2020.60.special-issue.27>

Yi, H.-Y., Chowdhury, M., Huang, Y.-D., & Yu, X.-Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(13), 5807–5822. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>

## Anexos

Anexo 1. Desinfección de la hoja contaminada de *Pseudocercospora fijiensis*.

**Anexo 2.** Certificado de identificación morfológica de *Pseudocercospora fijiensis*.



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0969041335 /0998982450  
e-mail: [patricia.garrido@idgen.ec](mailto:patricia.garrido@idgen.ec)  
R.U.C. 1793227785001

Quito 09 de enero 2026

## Certificado

Por medio de la presente, quien suscribe certifica que la muestra código H987, entregada por la Srta. Gianella Aylin Robelli Cárdenas, fue analizada en el laboratorio IDgen.

Tras el análisis morfológico realizado, la cepa objeto de estudio ha sido identificada como *Pseudocercospora fijiensis*.

Se extiende el presente certificado para los fines que la interesada estime convenientes.

Atentamente,



**Francisco Javier Flores, PhD.**  
**Propietario IDgen.**

Nota. Extraído de los laboratorios de IDgen, por los autores (2026).

**Anexo 3.** Certificado de análisis molecular de *Pseudocercospora fijiensis*.



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro  
Teléfono: 0998982450  
e-mail: [servicios@idgen.ec](mailto:servicios@idgen.ec)  
R.U.C. 1793227785001

**Informe de Resultados**

**Nombre del Proyecto:** Identificación molecular de hongos – Gianella Robelli.

**Informe No.:** A-864

**Técnico Responsable:** Sofía Garrido, Ing.

**Fecha:** 16/01/2026

**Tabla Resumen de Resultados**

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Acesión
H906	Sigatoka	707	91.5	<i>Pseudocercospora fijiensis</i>	RPB2	99.86	<u>MK754071.1</u>

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.


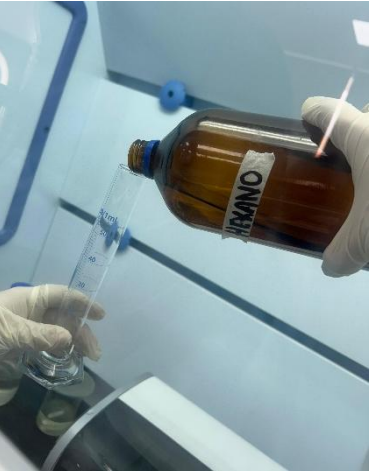



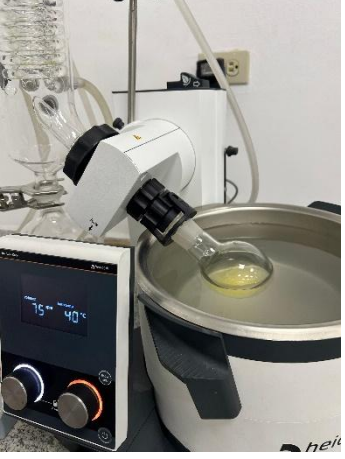
Propietario IDgen

Anexo 4. Procesamiento de muestras de *R. palmarum* L.

		
<p>A. Muestras de <i>R. palmarum</i> L.</p>	<p>B. Selección de especímenes vivos y en buen estado fisiológico.</p>	<p>C. Enjuague con agua destilada para eliminar el sustrato de sus cuerpos.</p>
		
<p>D. Secado de muestras</p>	<p>E. Se guardo los especímenes en fundas ziploc</p>	<p>F. En el congelador a 4° C, durante 24 horas</p>

Anexo 5. Extracción de lípidos cuticulares de *R. palmarum* L.

		
<p>A. Corte longitudinal de las larvas</p>	<p>B. Retirando la totalidad del contenido interno (vísceras, cuerpo graso y hemolinfa) para aislar exclusivamente la cutícula</p>	<p>C. Lavados de la cutícula con agua destilada estéril</p>
		
<p>D. Inmersión en solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5%</p>	<p>E. Enjuague final con alcohol al 70%</p>	<p>F. Peso de las cutículas secas</p>

		
<p>G. Peso de las cutículas trituradas</p>	<p>H. Medición del hexano</p>	<p>I. Maceración</p>
		
<p>J. Centrifugación del extracto</p>	<p>K. Filtración del extracto</p>	<p>L. Evaporación del solvente rotavapor</p>