



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

“Evaluación del carácter antioxidante y de compuestos fitoquímicos implicados en la defensa de plantas del género *Musa* (*Cavendish Valery*) frente a la enfermedad del Moko causada por *Ralstonia Solanacearum* raza 2”

Autora: Terán Maza, Vanessa Aracelly

Director: Mihai, Raluca Alexandra PhD.

Sangolquí, 2 de septiembre de 2022



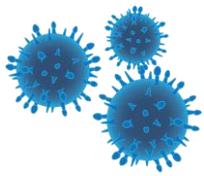
- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

INTRODUCCIÓN

- Primer lugar de frutas producidas
- Cultivada en más de 100 países
- 13% fruta se comercializa internacionalmente



Ecuador es el mayor exportador de banano con 6.45 millones de toneladas (FAO, 2019)



(Gordon, 2017)

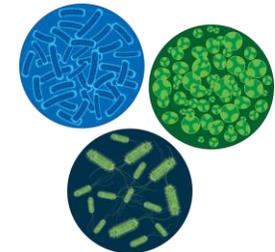


Marchitamiento causada por *Fusarium*



(Agrocalidad, 2014)

Enfermedad del Moko



Ralstonia Solanacearum raza 2

INTRODUCCIÓN



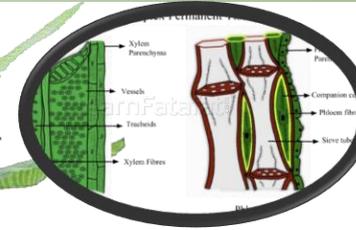
(Agrocalidad, 2014)

- Siglo XIX registros de devastación en los cultivos
- 1960 evidenciaron destrucción de las plantaciones



(Agrocalidad, 2014)

- 1840 se realizó los primeros registros de la enfermedad
- Edwin F. Smith caracterizó a la enfermedad y a la bacteria

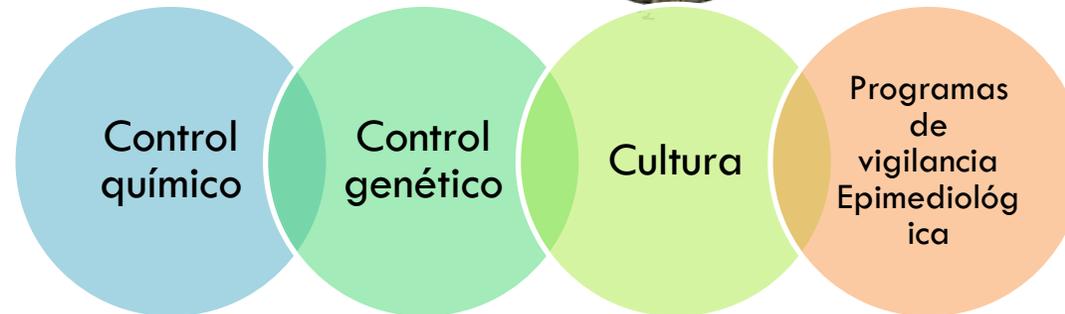


Sistemas de dispersión

- Herramientas contaminadas
- Corrientes de agua
- Plantas infectadas
- Animales
- Ser humano



Primer reporte de la enfermedad del Moko fue en el 2013 en la provincia de Manabí



No existe un método de erradicación de la enfermedad, sino medidas de prevención

INTRODUCCIÓN

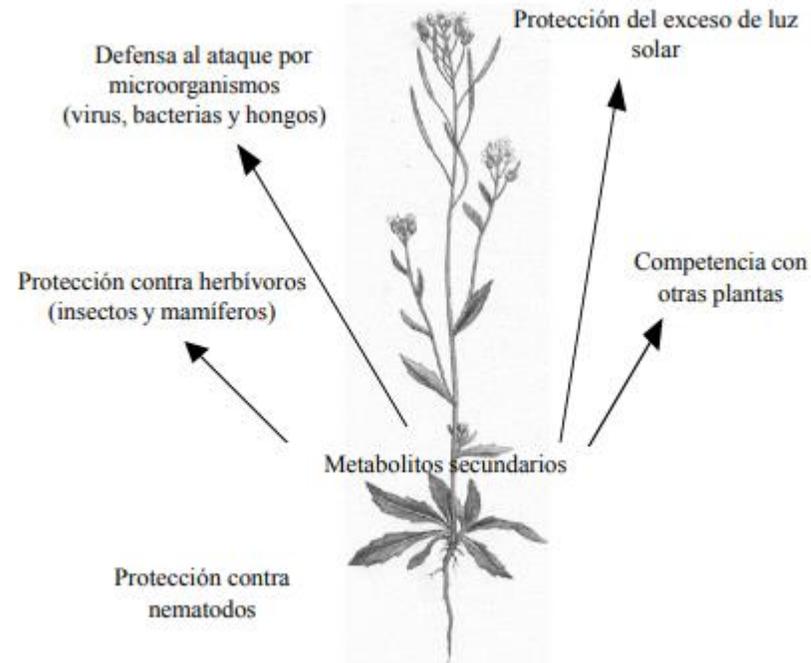
Mecanismo de defensa de las plantas

Las plantas tienen mecanismos de defensa que ralentizan el progreso del patógeno, alejan o incluso matan al invasor



Mecanismos estructurales

Compuestos bioquímicos



(Sepúlveda, 2003)

Metabolitos de la banana



Fitoalexinas

fenilfenalona

Fenilpropanoides

Flavonoides



Actividad Antioxidante

Antiulcerogénicas, antihipertensivos, anticancerígenos

Inhiben la propagación de reacciones oxidativas

Reparan el daño oxidativo

Oxidación celular

(Lopes *et al.*, 2020), (Isah & Isah, 2019)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

ÍNDICE DE CONTENIDOS



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



Objetivo General



Evaluar el carácter antioxidante y los compuestos fitoquímicos implicados en la defensa del género *Musa* (Cavendish Valery) frente a la enfermedad del Moko causada por *Ralstonia Solanacaerum* raza 2.

Objetivo Específicos



Recolectar muestras de cultivares *Musa* de la variedad Cavendish Valery en diferentes estados de desarrollo (estado vegetativo y fructificación) con sintomatología de la enfermedad del Moko.



Evaluar los compuestos fitoquímicos implicados en la defensa en función del estado fisiológico de la planta con sintomatología de la enfermedad del Moko mediante el ensayo Folin-Ciocalteu y el método colorimétrico de $AlCl_3$.



Evaluar el carácter antioxidante de extractos aislados de musáceas mediante el método DPPH, ABTS y FRAP.



Comparar el carácter antioxidante y los compuestos fitoquímicos de plantas del género *Musa* que presentan la enfermedad del Moko mediante el coeficiente de correlación de Pearson.





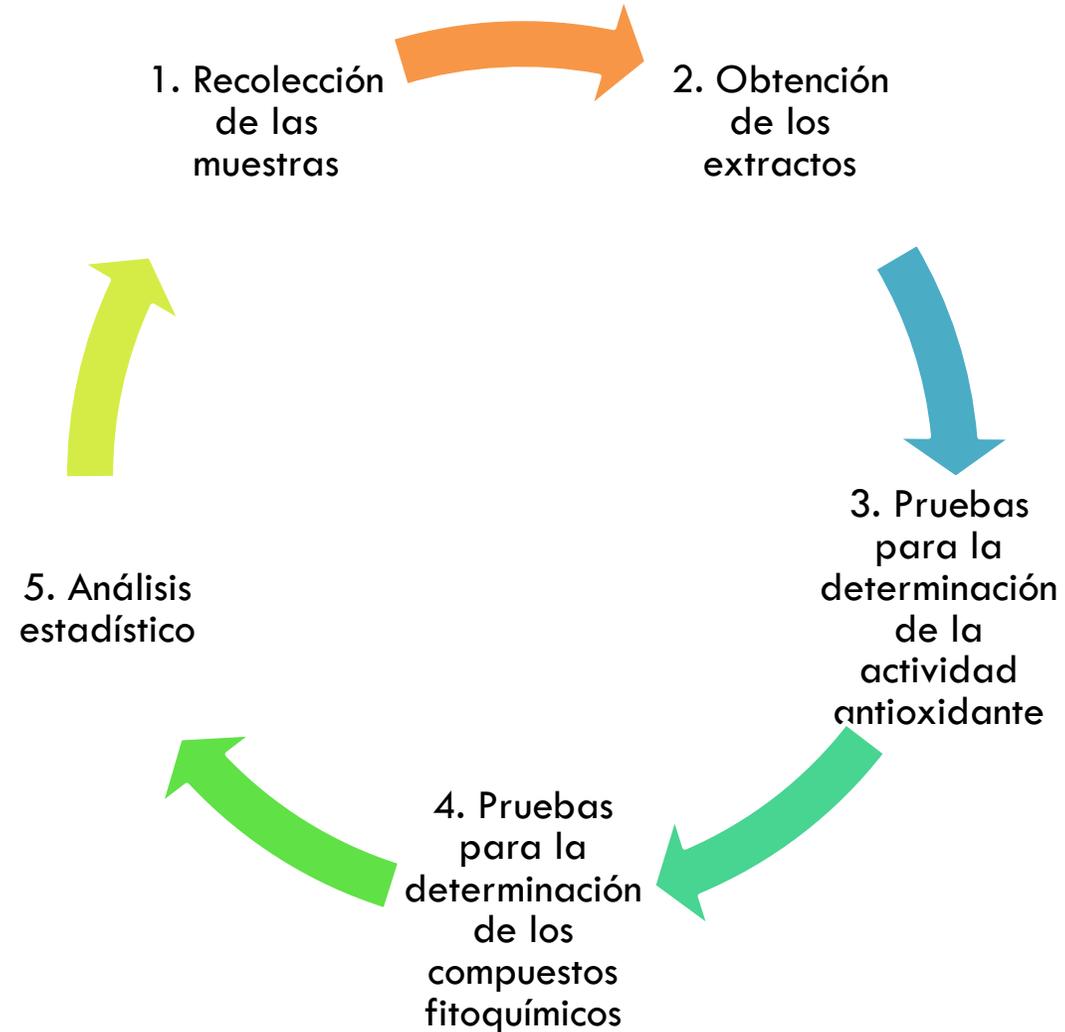
El carácter antioxidante y los compuestos fitoquímicos se encuentran implicados en la defensa de plantas del género *Musa* frente a la enfermedad del Moko causada por *Ralstonia Solanacearum* raza 2.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
-  Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos

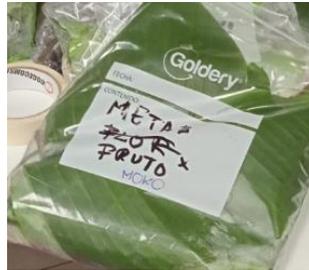


MATERIALES Y MÉTODOS



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Recolección de la muestra



Estación Experimental INIAP
Santo Domingo

Muestras almacenadas en hieleras
hasta su procesamiento

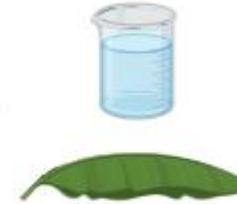
2. Obtención de los extractos



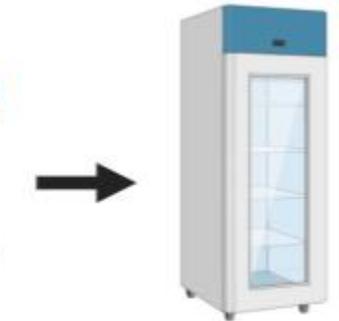
Trozaron
las hojas



Pesó 5g de
la muestra
fresca



Se colocó en Falcon
de 50 mL con 25 mL
del solvente (etanol)



Refrigeración

(Terán, 2022)

Tabla 1.

Nomenclatura de las muestras recolectadas de la variedad Cavendish Valery

Muestra	Nombre	Nomenclatura
Muestra 1	Estado vegetativo de planta sana	VS
Muestra 2	Estado vegetativo de planta con Moko R1	VMR1
Muestra 3	Estado vegetativo de planta con Moko R2	VMR2
Muestra 4	Estado de fructificación de planta sana	FS
Muestra 5	Estado de fructificación de planta con Moko R1	FMR1
Muestra 6	Estado de fructificación de planta con Moko R2	FMR2



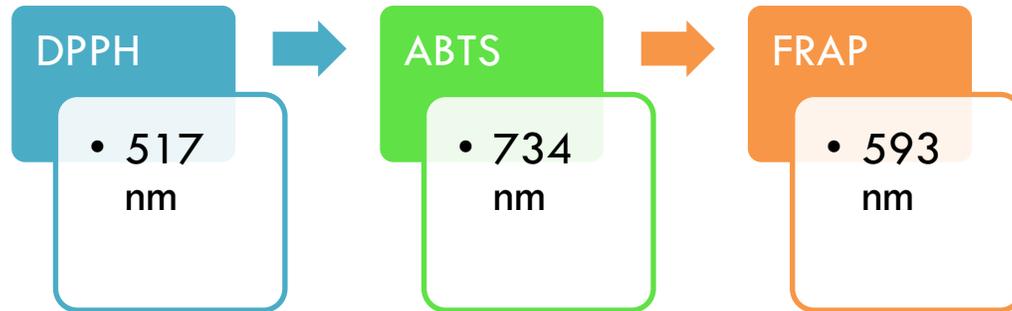
(Terán, 2022)



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

MATERIALES Y MÉTODOS

3. Pruebas para la determinación de la actividad antioxidante



4. Pruebas para la determinación de los compuestos fitoquímicos



5. Análisis estadístico



Análisis factorial

2x4

3x4



Prueba

estadística

Tukey



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
-  Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método DPPH

Tabla 2.

Método DPPH

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01315

Error: 0,0001 gl: 48

muestra	Medias	n	E.E.	
FMR2	0,17	9	3,1E-03	A
FMR1	0,22	9	3,1E-03	B
FS	0,46	9	3,1E-03	C
FMR1	0,53	9	3,1E-03	D
VMR2	0,54	9	3,1E-03	D
VS	0,62	9	3,1E-03	E

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

$$\%inhibición = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100$$

126,43 mg trolox/gmf
69,54% VMR1

136,97 mg trolox/gmf
75,45% FMR2

Método ABTS

Tabla 3.

Método ABTS

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02716

Error: 0,0004 gl: 48

Muestras	Medias	n	E.E.	
FMR2	0,31	9	0,01	A
VMR1	0,49	9	0,01	B
FS	0,67	9	0,01	C
FMR1	0,67	9	0,01	C
VMR2	0,69	9	0,01	C
VS	0,74	9	0,01	D

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

263,76 mg trolox/gmf
38,54% VMR1

380,41 mg trolox/gmf
53,109% FMR2

Porcentaje de inhibición por el Método DPPH

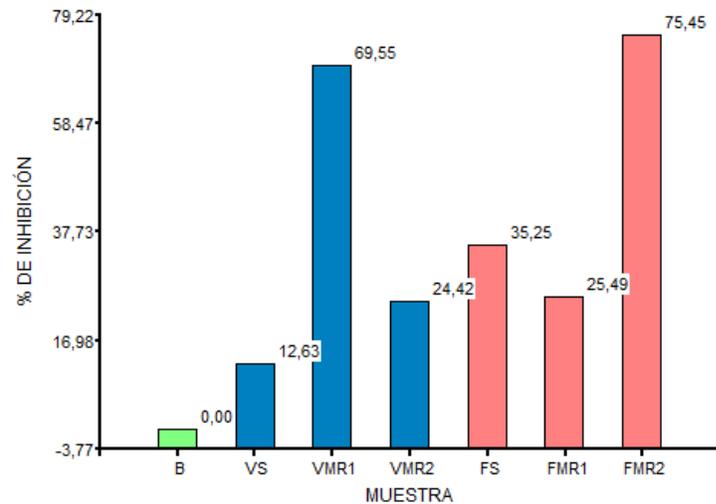


Figura 1. Porcentaje de inhibición por método DPPH (Terán, 2022).

Porcentaje de inhibición por el método ABTS

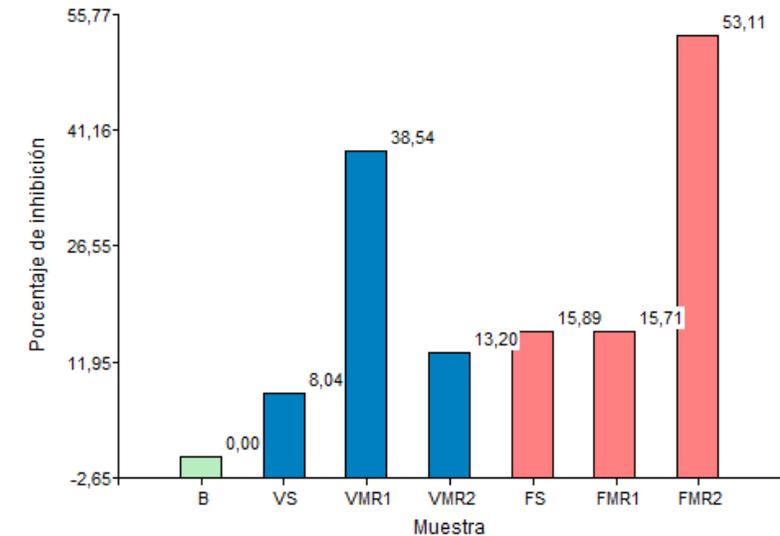


Figura 2. Porcentaje de inhibición por método ABTS (Terán, 2022).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método DPPH

Tabla 2.

Método DPPH

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,01315

Error: 0,0001 gl: 48

muestra	Medias	n	E.E.	
FMR2	0,17	9	3,1E-03	A
FMR1	0,22	9	3,1E-03	B
FS	0,46	9	3,1E-03	C
FMR1	0,53	9	3,1E-03	D
VMR2	0,54	9	3,1E-03	D
VS	0,62	9	3,1E-03	E

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

$$\%inhibición = \frac{A_c - A_s}{A_c} * 100$$

126,43 mg trolox/gmf
69,54% VMR1

136,97 mg trolox/gmf
75,45% FMR2

Método ABTS

Tabla 3.

Método ABTS

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02716

Error: 0,0004 gl: 48

Muestras	Medias	n	E.E.	
FMR2	0,31	9	0,01	A
VMR1	0,49	9	0,01	B
FS	0,67	9	0,01	C
FMR1	0,67	9	0,01	C
VMR2	0,69	9	0,01	C
VS	0,74	9	0,01	D

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

263,76 mg trolox/gmf
38,54% VMR1

380,41 mg trolox/gmf
53,109% FMR2

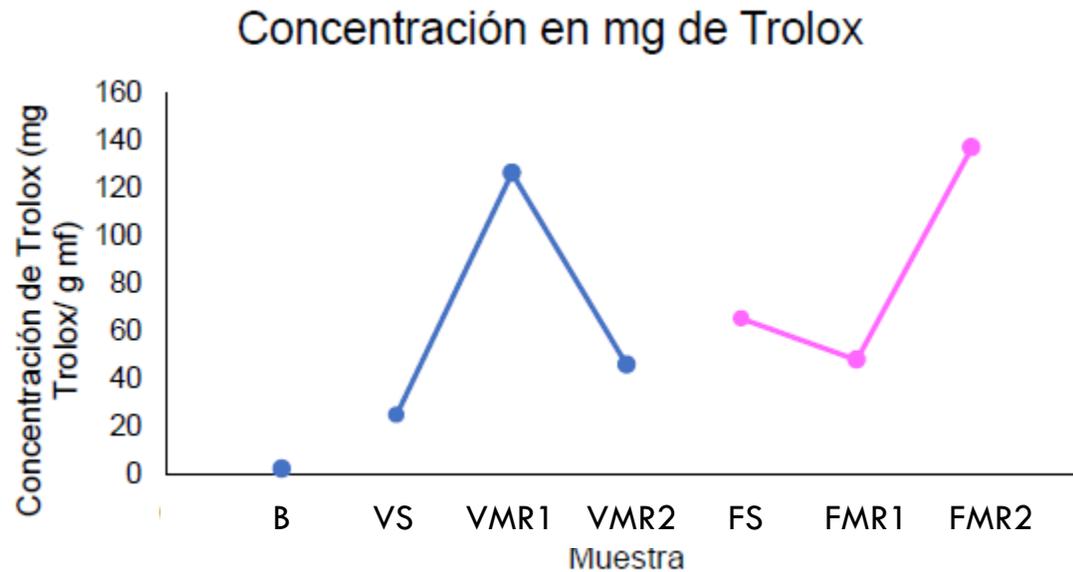


Figura 3. Comparación de medias por método DPPH (Terán, 2022).

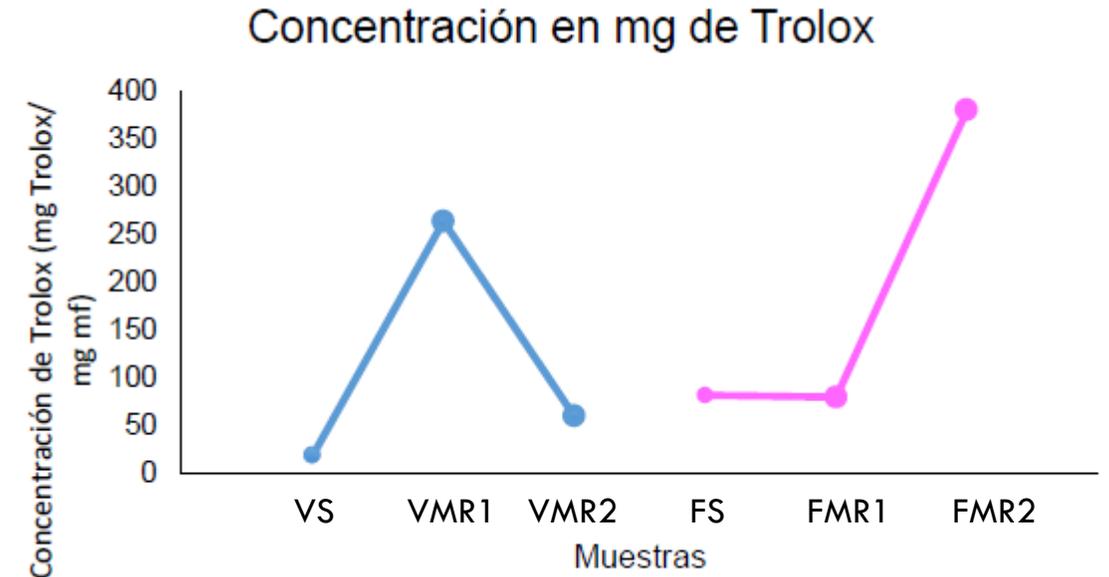


Figura 4. Comparación de medias por método ABTS (Terán, 2022).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Método FRAP

Tabla 4.

Método FRAP

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,04324

Error: 0,0010 gl: 48

Muestras	Medias	n	E.E.	
VMR2	1,05	9	0,01	A
VS	1,20	9	0,01	B
VMR1	1,38	9	0,01	C
FMR1	1,49	9	0,01	D
FS	1,67	9	0,01	E
FMR2	2,38	9	0,01	F

597,18 mg Fe₂SO₄/L
VMR1

1376,75 mg Fe₂SO₄/L
FMR2

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

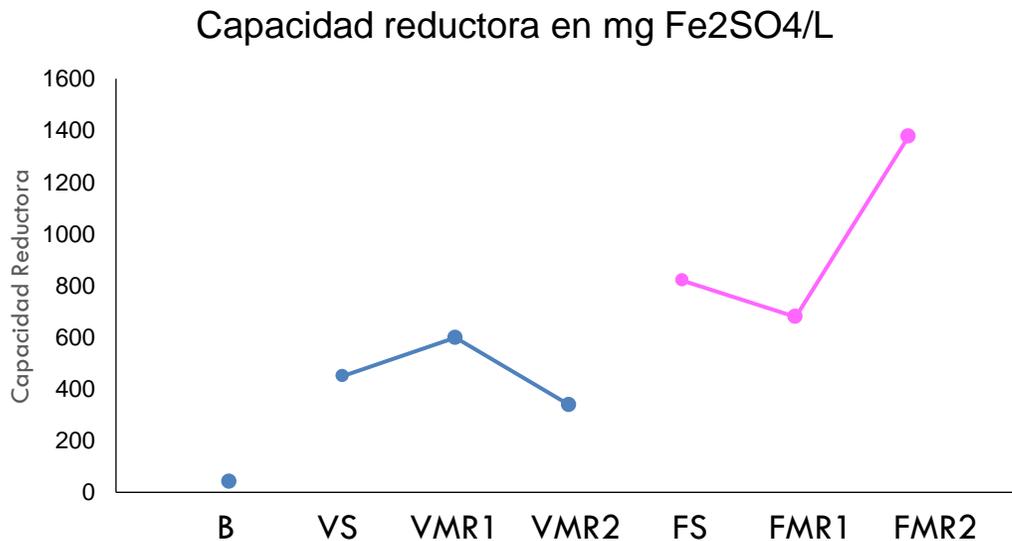


Figura 5. Comparación de medias por método FRAP (Terán, 2022).

Las plantas al encontrarse frente algún estrés sea biótico o abiótico deriva en la síntesis de metabolitos secundarios.

Las muestras que poseen la sintomatología de la enfermedad del Moko, presentan un mayor contenido en metabolitos secundarios.

Los compuestos fenólicos sintetizados como fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoles y dihidrocalconas son compuestos antibióticos que generan una respuesta contra patógenos.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Contenido de flavonoides

Tabla 6.

Prueba de Tukey para el contenido de flavonoides

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,11877

Error: 0,0072 gl: 48

Muestras	Medias	n	E.E.	
VS	0,70	9	0,03	A
VMR2	0,72	9	0,03	A
VMR1	1,01	9	0,03	B
FS	1,84	9	0,03	C
FMR1	2,09	9	0,03	D
FMR2	4,18	9	0,03	E

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

3,33 mg
Quercetina/gmf
VMR1

13,63 mg
Quercetina/gmf
FMR2

Contenido de fenoles

Tabla 5.

Prueba de Tukey para el contenido de fenoles

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14944

Error: 0,0114 gl: 48

Muestras	Medias	n	E.E.	
VMR2	0,71	9	0,04	A
VS	0,78	9	0,04	A
FMR1	1,30	9	0,04	B
VMR1	1,31	9	0,04	B
FS	1,55	9	0,04	C
FMR2	2,75	9	0,04	D

0,51 mg GAE/gmf
VMR1

1,5 mg GAE/gmf
FMR2

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

Contenido total de fenoles

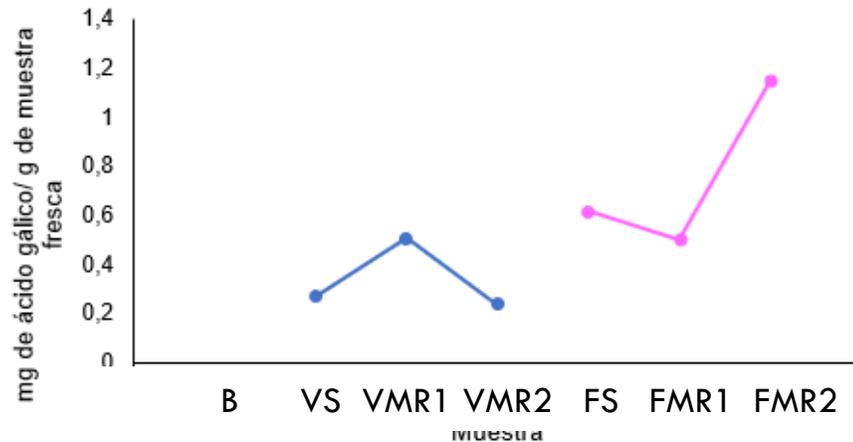


Figura 6. Comparación de medias por el método FC (Terán, 2022).

Contenido total de flavonoides

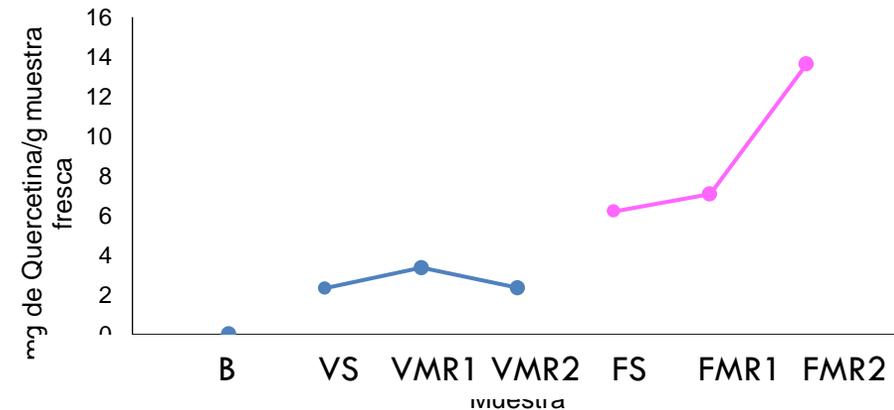


Figura 7. Comparación de medias para flavonoides (Terán, 2022).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 7.

Correlación de Pearson entre las pruebas

Correlación de Pearson: Coeficientes\probabilidades

	DPPH	FRAP	ABTS	Flavonoides1	Fenoles
DPPH	1,00	5,2E-09	0,00	0,04	2,0E-11
FRAP	-0,70	1,00	7,2E-12	0,64	0,00
ABTS	0,96	-0,77	1,00	0,01	0,00
Flavonoides1	0,29	-0,07	0,37	1,00	0,46
Fenoles	-0,76	0,98	-0,83	-0,10	1,00

Quando existe
correlación
positiva

Cantidad de
compuestos
fenólicos,
lípidos e
hidrofílicos.

Los fenoles y
la actividad
antioxidante
se relacionan

DPPH, ABTS y
FRAP difiere
en la
actividad de
eliminación de
los radicales.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



CONCLUSIONES

Las muestras de la variedad *Cavendish Valery* arrojaron que las muestras con más alto contenido de fenoles y flavonoides, así como la actividad antioxidante fueron FMR2 y VMR1 presentando un porcentaje de inhibición del 53.109% y 38.54% para la prueba de ABTS, 75.45% y 69.54% para la prueba de DPPH, la capacidad reductora 1376,75 mg Fe₂SO₄/L y 597,18 mg Fe₂SO₄/L. En el contenido de fenoles totales se obtuvo 0,51 mg GAE/g muestra fresca y 1,15 mg GAE/g muestra fresca para VMR1 y FMR2 respectivamente. Para el contenido de flavonoides totales 3,37 mg Quercetina/ g muestra fresca y 13,63 mg Quercetina/ g muestra fresca correspondientes a VMR1 y FMR2.

El estado fisiológico de la planta también influye en la variación de metabolitos secundarios. Una planta en estado de desarrollo vegetativo utiliza la fotosíntesis y la captura de carbono para redireccionar a procesos de nutrición, y de formación de la planta en donde la síntesis de los metabolitos secundarios se almacenará y permanecerán en diferentes tejidos vegetales

No hubo diferencia significativa en muestras de cultivares Musa de la variedad *Cavendish Valery* (VMR2, FMR1) con sintomatología de la enfermedad del Moko con las muestras sanas, debido al momento de recolección de las hojas no presentaban una notoria sintomatología de la enfermedad por lo que se deduce que la planta se encontraba en los inicios de la infección producida por la bacteria *Ralstonia solanacarum* raza 2.

La mejor correlación entre los métodos para la identificación de la actividad antioxidante y de los compuestos fitoquímicos en las plantas del género Musa fue la correlación positiva de ABTS con DPPH, fenoles con FRAP esto se debe a la presencia de compuestos fenólicos, lipofílicos e hidrofílicos presentes en las muestras.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



RECOMENDACIONES

Analizar los compuestos fitoquímicos y la actividad antioxidantes en diferentes temporadas de recolección y diferentes condiciones de extracción

Aplicar el método de quimioluminiscencia para una determinación más específica de la capacidad antioxidante y HPLC-MS para la identificación de la mayor variedad de metabolitos secundarios.

Realizar un análisis de los compuestos polares en ausencia de la clorofila, por lo que se ha visto que interfiere en la actividad antioxidante.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



- Introducción
- Objetivos
- Materiales y métodos
- Resultados y discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones
- Agradecimientos



AGRADECIMIENTOS



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



Raluca Alexandra Mihai, Ph. D.
Directora del proyecto

Familia y Amigos

¡Gracias!

Laboratorio de Biotecnología
del Centro de Investigación de
Aplicaciones Militares
“CICTE – ESPE”



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA