

Actividad antifúngica de compuestos volátiles producidos por especies endófitas de *Bacillus* sobre *Moniliophthora roreri* H.C Evans *et al.*



<https://eqrcode.co/a/KMblHn>

Antifungal activity of volatile compounds produced by endophytic *Bacillus* species against *Moniliophthora roreri* H.C Evans *et al.*

✉ María Aracely Vera Loo¹, ✉ Alexander Bernal Cabrera^{2*}, ✉ Danilo Vera Coello¹, ✉ Michel Leiva Mora³,
✉ Alan Rivero Aragón⁴, ✉ Lisbeth Morales Díaz de Villegas⁴

¹Estación Experimental Tropical Pichilingue, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Km 5 vía Quevedo, El Empalme, Cantón Mocache, Los Ríos, Ecuador, CP: 120224

²Departamento de Agronomía. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Carretera a Camajuani. Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP: 54830

³Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Técnica de Ambato, Cantón Cevallos vía a Quero, sector el Tambo-la Universidad, 1801334, Cevallos, Tungurahua, Ecuador.

⁴Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central “Marta Abreu” de las Villas. Carretera a Camajuani. Km 5.5, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP: 54830.

RESUMEN: El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* 9-2, *Bacillus mycooides* 29-2, *Bacillus* sp. 33 y 72, *Bacillus cereus* 45-1, 51-2, 53-4 y *Bacillus amyloliquefaciens* 24 sobre el crecimiento micelial y esporulación del hongo fitopatogénico *Moniliophthora roreri* H.C Evans *et al.* Los experimentos de enfrentamiento se realizaron en placas Petri con dos compartimentos. En una cara de la placa se añadió medio de cultivo PDA y en la otra TSA. Las cepas bacterianas se inocularon individualmente (100 µl; 1×10⁸ UFC ml⁻¹) sobre la cara de la tapa con medio de cultivo TSA; mientras que, sobre la otra tapa con medio de cultivo PDA, se colocó un disco de micelio (5 mm de diámetro) de la cepa del hongo fitopatogénico. Como control se usó agua destilada estéril. Todas las placas se sellaron con Parafilm e incubaron a 28°C durante 15 días. Los experimentos se repitieron dos veces. Todas las cepas de bacterias produjeron compuestos volátiles que inhibieron el crecimiento micelial y la formación de esporas de *M. roreri*. *B. subtilis* 9-2, *B. mycooides* 29-2, *B. sp.* 33, *Bacillus cereus* 45-1, 51-2 y *Bacillus amyloliquefaciens* 24 inhibieron en más de 60 % el crecimiento micelial y la esporulación de *M. roreri*. Estos hallazgos brindan nuevas posibilidades para controlar la moniliasis del cacao causada por *M. roreri* utilizando cepas endófitas de *Bacillus* capaces de emitir compuestos volátiles antifúngicos.

Palabras clave: antagonistas, antibiosis, control biológico.

ABSTRACT: The aim of this work was to determine the antifungal activity of *Bacillus subtilis* 9-2, *Bacillus mycooides* 29-2, *Bacillus* sp. 33 and 72, *Bacillus cereus* 45-1, 51-2, 53-4 and *Bacillus amyloliquefaciens* 24 on mycelial growth and sporulation of the phytopathogenic fungus *Moniliophthora roreri* H.C Evans *et al.* The confrontation experiments were carried out in Petri dishes with two compartments. PDA culture medium was added to one side of the plate and TSA to the other. The bacterial strains were individually inoculated (100 µl; 1×10⁸ CFU ml⁻¹) on the face of the cap with TSA culture medium; while on the other lid with PDA culture medium, a mycelial disk (5 mm in diameter) of the strain of the phytopathogenic fungus was placed. Sterile distilled water was used as a control. All plates were sealed with Parafilm and incubated at 28°C for 15 days. The experiments were repeated twice. All strains of bacteria produced volatile compounds that inhibited mycelial growth and the formation of *M. roreri* spores. *B. subtilis* 9-2, *B. mycooides* 29-2, *B. sp.* 33, *Bacillus cereus* 45-1, 51-2 and *Bacillus amyloliquefaciens* 24 inhibited mycelial growth and sporulation of *M. roreri* by more than 60%. These findings offer new possibilities to control frosty pod rot caused by *M. roreri* using *Bacillus* endophytes strains producing antifungal volatile compounds.

Key words: antagonists, antibiosis, biological control.

*Autor para correspondencia: Alexander Bernal Cabrera. E-mail: alexanderbc@uclv.edu.cu

Recibido: 10/12/2020

Aceptado: 25/02/2021

INTRODUCCIÓN

El hongo basidiomiceto *Moniliophthora roreri* H.C. Evans *et al.* es un patógeno hemibiotrófico que causa la enfermedad en el cultivo de *Theobroma cacao* L. conocida como moniliasis. Este microorganismo fitopatógeno ataca al fruto en cualquier edad de desarrollo y puede ocasionar pérdidas económicas de hasta el 90 % de la producción (1). En la literatura científica se describieron diferentes tácticas para el control de la enfermedad, entre las que se encuentran el control cultural, genético, químico y biológico (2).

En los últimos años, el control biológico llamó la atención de investigadores, como un medio eficaz para manejar los agentes patógenos de las plantas y preservar el medio ambiente (3). Se informó que los agentes de control biológico, particularmente los endófitos del género *Bacillus*, protegen a las plantas contra agentes fitopatógenos como hongos, bacterias y nematodos (4, 5).

La actividad de control biológico exhibida por los *Bacillus* endófitos se debe, con frecuencia, a la producción de compuestos orgánicos volátiles (COV), que pueden proteger directamente a las plantas contra los fitopatógenos y/o indirectamente a través de la inducción de resistencia de las plantas (6, 7). Estos compuestos se clasificaron químicamente en grupos de ésteres, alcanos, alquenos, alquinos, alcoholes, terpenoides, aldehídos, cetonas y compuestos que contienen azufre (8). Entre estos compuestos, se informó que nonanal, 2-undecanona, ciclohexanol, n-decanal, benzotiazol, 2-etil-1-hexanol, pirazina (2,5-dimetil) y dimetil trisulfuro poseen actividad de biocontrol contra *Ralstonia solanacearum* (Smith.) Yabuuchi *et al.* y *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings *et al.* (9).

El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de compuestos volátiles producidos por especies endófitas de *Bacillus* sobre el crecimiento micelial y esporulación de *M. roreri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Protección Vege-

tal de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, perteneciente al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Ecuador. La Estación se encuentra ubicada en el km 5 vía Quevedo, perteneciente al Cantón Mocache, provincia Los Ríos, geográficamente a 1° 05' de Latitud Sur y 79° 26' de Longitud Occidental, a una altitud promedio de 75 m.s.n.m.

Se utilizaron ocho cepas endófitas de *Bacillus* pertenecientes a la colección de cultivos microbianos del propio centro, seleccionadas a partir de su actividad antagonista *in vitro* frente a *Moniliophthora roreri* (10). (Tabla 1)

La cepa de *M. roreri* usada en el estudio se aisló a partir de mazorcas del clon de cacao EET-103 tipo Nacional (Susceptible), con síntomas típicos de moniliasis y pertenece a la colección de cultivos microbianos del laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Tropical Pichilingue.

Quince días antes de realizar los experimentos de confrontación, se multiplicó el hongo fitopatógeno *M. roreri* en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Difco) a 25±1°C y fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad. con el fin de obtener abundante micelio y esporas.

Las cepas bacterianas endófitas se sembraron en tubos de ensayo (150 x 22 mm) con medio de cultivo Caldo Triptona Soya (TSB) (Difco) a pH 7 e incubaron (Incubadora, Modelo: Precision Scientific) en la oscuridad a 28±1°C por tres días para permitir el crecimiento, esporulación y producción de metabolitos secundarios.

Posteriormente, el efecto de los compuestos volátiles emitidos por las cepas bacterianas endófitas sobre el crecimiento micelial de *M. roreri* se evaluó en cajas Petri (100 x 15mm). En la base de la caja se inoculó un disco de micelio (5 mm de diámetro) de *M. roreri* sobre el medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Difco), siete días antes de la confrontación, para asegurar el crecimiento del hongo. En la parte superior (tapa), se inoculó la bacteria sobre medio de cultivo Triptona Soya Agar (TSA) (Difco). Las bacterias se inocularon diseminando 100 µl de una suspensión de 1 x 10⁸ UFC ml⁻¹. Posteriormente, las placas Petri se sellaron con Parafilm e incubaron a 28±1°C y fotoperíodo de 12 h luz/ 12 h oscuridad durante 15 días (11).

Tabla 1. Especies endófitas de *Bacillus* procedentes de tejidos de mazorcas de cacao en parroquias de Ecuador / Endophytic *Bacillus* species from cocoa pod tissue in parishes of Ecuador

Código	Especie	Tipo de tejido	Parroquia
9-2	<i>B. subtilis</i>	Endocarpio	Malimpia
24	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Mesocarpio	Malimpia
29-2	<i>B. mycoides</i>	Endocarpio	Rosa Zarate
33	<i>Bacillus</i> sp.	Mesocarpio	Rosa Zarate
45-1	<i>B. cereus</i>	Endocarpio	Rosa Zarate
51-2	<i>B. cereus</i>	Mesocarpio	Rosa Zarate
53-4	<i>B. cereus</i>	Pedicelo de la flor	Rosa Zarate
72	<i>Bacillus</i> sp.	Endocarpio	La Unión

El tratamiento control se inoculó con 100 µl de agua desionizada estéril en lugar de la suspensión de las bacterias endófitas.

El porcentaje de inhibición del crecimiento radial se calculó usando la fórmula descrita por Arrebola *et al.* (12).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{D1 - D2}{D1} \times 100$$

D1: Diámetro del crecimiento micelial de *M. roleri* en el tratamiento control

D2: Diámetro del crecimiento micelial de *M. roleri* con la presencia de bacteria endófitas

Al concluir la confrontación, se evaluó el efecto de la emisión de compuestos volátiles de las bacterias sobre la esporulación. Para ello, se vertieron 10 ml de agua destilada sobre la tapa de la placa Petri donde creció *M. roleri* y se removió el micelio con una espátula Drigalsky metálica estéril hasta obtener una suspensión de esporas. La misma se cuantificó en cinco campos, usando una cámara de Neubauer, con la ayuda de un microscopio óptico (Carl Zeiss, aumento 400x).

Los experimentos se repitieron dos veces y se montaron bajo un diseño completamente aleatorizado con cinco repeticiones por tratamiento y control.

Los datos correspondientes al porcentaje de inhibición del crecimiento radial y esporulación de *M. ro-*

leri. producto del efecto de los compuestos volátiles bacterianos. se sometieron a la prueba de Kruskal-Wallis y comparación múltiple de medias no paramétrica. Se utilizó el paquete estadístico STATISTICA versión 12.0 sobre Windows (13).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se produjo inhibición del crecimiento micelial de *M. roleri* debido a los metabolitos volátiles emitidos por los aislados bacterianos durante 15 días de confrontación (Fig. 1 y 2), con diferencias estadísticas significativas entre los aislados bacterianos.

Los metabolitos de los aislados bacterianos 33, 45-1, 9-2, 24, 51-2 y 29-2 produjeron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *M. roleri*, con valores superiores al 62,5 %, sin diferencias significativas entre ellos; mientras que, el aislado 33 difirió con 53-4 y 72 y el 45-1 solo difirió del aislado 53-4. Este último fue el que tuvo el menor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con 56,25 %.

Los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial obtenidos en este trabajo fueron superiores a los informados por de la Cruz *et al.* (11); de acuerdo con sus resultados, los compuestos volátiles emitidos por las bacterias endófitas *B. pumilus* CFFSUR-B34 y *B. muralis* CFFSUR-B38, solo alcanzaron una inhibición

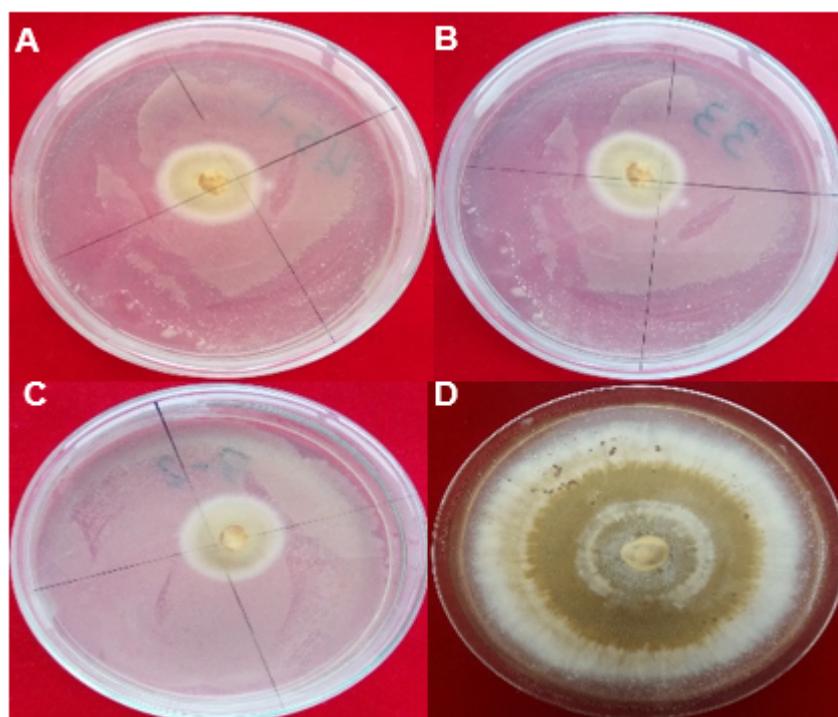


Fig. 1. Inhibición del crecimiento micelial de *M. roleri* inducido por los metabolitos volátiles emitidos por las bacterias endófitas (*Bacillus* spp.) de cacao durante 15 días de confrontación A) *M. roleri* con aislado # 45-1; B) *M. roleri* con aislado # 33; C) *M. roleri* con aislado # 9-2; D) Control (*M. roleri* sin bacteria) / Inhibition of mycelial growth of *M. roleri* induced by volatile metabolites emitted by endophytic cocoa bacteria during 15 days of confrontation A) *M. roleri* with isolate # 45-1; B) *M. roleri* with isolate # 33; C) *M. roleri* with isolate # 9-2; D) Control (*M. roleri* without bacteria)

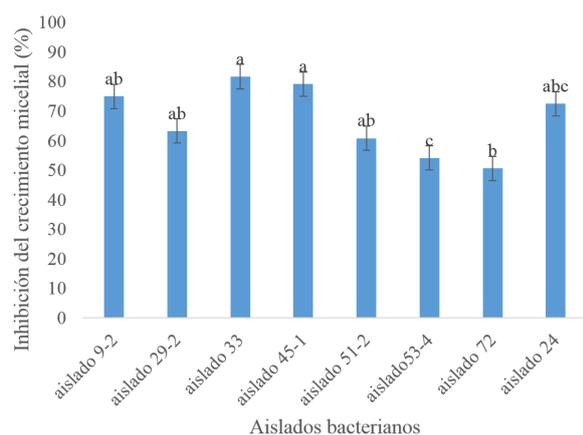


Fig. 2. Porcentaje de Inhibición del crecimiento micelial de *M. royeri* inducido por los metabolitos volátiles emitidos por los aislados bacterianos endófitos de *Bacillus* spp. durante 15 días de confrontación / Percentage of Inhibition of mycelial growth of *M. royeri* induced by volatile metabolites emitted by endophytic bacterial isolates of *Bacillus* spp. during 15 days of confrontation. Medianas con letras distintas para los aislados difieren significativamente según la prueba de Kruskal-Wallis $H(7, N=32)=30,96502$ $p=0,0001$ y comparación múltiple de medias no paramétrica ($p < 0,008$)

máxima de 37,5 % en *M. royeri*. Esto podría deberse, fundamentalmente, a las cepas utilizadas y el tipo de especie.

Por otro lado, estos resultados demostraron la actividad antifúngica de las bacterias endófitas provenientes de mazorcas de cacao sobre *M. royeri*, debido a la emisión de compuestos volátiles. En nuestro estudio no se identificaron los mismos; sin embargo, diversos investigadores informaron acerca de la emisión de compuestos volátiles (benzaldehído, el 1,2-bencisotiazol-3 (2 H) y el 1,3-butadieno) en cepas de *Bacillus* spp., con capacidad para inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos (4, 14).

Wu *et al.* (15) informaron que los compuestos volátiles emitidos por *B. amyloliquefaciens* poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen, *Fusarium oxysporum* Schleicher Fr. f.sp. *niveum* (E. Smith) W. C. Snyder & H. N. Hans., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.), W.C. Snyder & H.N. Hansen y *Verticillium dahliae* Kleb. Años más tarde, Tahir *et al.* (14) encontraron que los compuestos volátiles emitidos por *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *Bacillus artrophaeus* LSSC22 protegieron las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) obtenidas *in vitro* y crecidas en macetas contra *Ralstonia solanacearum* (Smith.) Yabuuchi *et al.*

Con respecto a la inhibición de la esporulación de *M. royeri*, los aislados bacterianos 33, 45-1, 9-2, 24, 29-2 y 51-2 produjeron valores superiores al 60,85 %, sin diferencias significativas entre ellos; mientras que el aislado 33 difirió con el 53-4 y 72, y el 45-1 solo difirió del aislado 72. Este último fue el que tuvo el

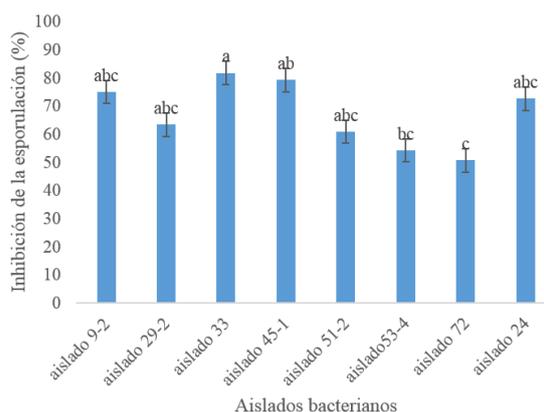


Fig. 3. Porcentaje de Inhibición de la esporulación de *M. royeri* inducido por los metabolitos volátiles emitidos por los aislados bacterianos endófitos de *Bacillus* spp. durante 15 días de confrontación / Percentage of Inhibition of *M. royeri* sporulation induced by volatile metabolites emitted by endophytic bacterial isolates of *Bacillus* spp. during 15 days of confrontation. (Medianas con letras distintas para los aislados difieren significativamente según la prueba de Kruskal-Wallis: $H(7, N=32)=30,58469$ $p=0,0001$ y comparación múltiple de medias no paramétrica ($p < 0,008$).

menor porcentaje de inhibición de esporulación con 50,6 %. (Fig. 3)

Los resultados del presente trabajo, respecto al efecto de los metabolitos volátiles emitidos por las bacterias endófitas sobre la inhibición de la esporulación de *M. royeri*, son un hallazgo que proporciona nuevas posibilidades de control de la enfermedad. Además, concuerdan con los informes de la Cruz *et al.* (11), quienes encontraron otros aislados endófitos del género *Bacillus* (*B. muralis* CFFSUR-B38, *B. pumilus* CFFS81UR-B34) aislados de hojas de cacao, capaces de emitir volátiles que disminuyeron en más de 81 % la formación de esporas de *M. royeri*.

Diferentes investigaciones demostraron el efecto negativo que provocan los compuestos volátiles de *Bacillus* sobre las funciones fisiológicas de los hongos, tales como la esporulación y germinación de esporas. Massawe *et al.* (16) determinaron que ocho compuestos volátiles de *Bacillus velezensis* VM 11 redujeron la producción de esclerocios del hongo ascomycete *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. y provocaron cambios morfológicos en las células miceliales.

Otros autores, como Nawaz *et al.* (17), evaluaron la actividad de los metabolitos antifúngicos producidos por *Bacillus licheniformis* OE04 contra *Colletotrichum gossypii* Southw. Estos investigadores hallaron que la cepa en estudio inhibió *in vitro* de la germinación de esporas de *C. gossypii*. Ese estudio demostró el efecto potencial de *B. licheniformis*, como alternativa para el control de la antracnosis del algodón.

Recientemente, Rong *et al.* (18) informaron a la bacteria endofítica *Bacillus safensis* B21 con potencialidades bioplaguicidas para el control del añublo del arroz causado por el hongo fitopatógeno *Magnaporthe*

grisea (T.T. Hebert) M.E. Barr. Estos autores adjudican ese efecto, principalmente, a la producción de compuestos antifúngicos bioactivos como las iturinas.

El presente trabajo demuestra la actividad antifúngica *in vitro* que ejercieron los metabolitos volátiles emitidos por las especies endófitas del género *Bacillus*, aisladas de mazorcas de cacao, sobre el crecimiento micelial y esporulación de *M. royeri*. Este resultado proporciona nuevas posibilidades para el control de la moniliasis.

REFERENCIAS

- Bailey BA, Evans HC, Phillips-Mora W, Ali SS, Meinhardt LW. *Moniliophthora royeri*, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 2018; 19(7):1580-1594. Doi: 10.1111/mpp.12648.
- Ten Hoopen GM, Krauss U. Biological control of cacao diseases. In: B. A. Bailey.; L.W. Meinhardt (eds.). *Cacao Diseases: A History of Old Enemies and New Encounters*. Springer International Publishing Switzerland, 2016; p. 511-566.
- Choudhary M, Ghasal PC, Yadav RP, Meena VS, Mondal T, Bisht JK. Towards Plant-Beneficiary Rhizobacteria and Agricultural Sustainability. In: V. S. Meena (ed.). *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*. Springer Nature Singapore Pte Ltd., 2018; p. 1-46.
- Hong CE, Park JM. Endophytic bacteria as biocontrol agents against plant pathogens: current state-of-the-art. *Plant Biotechnology Reports*, 2016; 10(6): 353-357. Doi: 10.1007/s11816-016-0423-6.
- Rabiey M, Hailey LE, Roy SR, Grenz K, Al-Zadjali MAS, Barrett GA, *et al.* Endophytes vs tree pathogens and pests: can they be used as biological control agents to improve tree health? *European Journal of Plant Pathology*, 2019; 155:711-729. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01814-y>.
- Lim SM, Yoon MY, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Shin TS, *et al.* Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathol. J.* 2017; 33(5): 488-498. Doi: 10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073.
- Xing M, Zheng L, Deng Y, Xu D, Xi P, Li M, *et al.* Antifungal activity of natural volatile organic compounds against litchi downy blight pathogen *Peronophythora litchi*. *Molecules*, 2018; 23:358. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23020358>.
- Avalos M, van Wezel GP, Raaijmakers JM, Garbeva P. Healthy scents: microbial volatiles as new frontier in antibiotic research? *Current opinion in microbiology*, 2018; 45:84-91. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.02.011>.
- Xie S, Zang H, Wu H, Uddin Rajer F, Gao X. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular plant pathology*, 2018; 19(1): 49-58. Doi: <https://doi.org/10.1111/mpp.12494>.
- Vera MA. Selección de bacterias endófitas asociadas a *Theobroma cacao*, antagonistas de *Moniliophthora royeri* en Quinindé, Esmeraldas, Ecuador. [Tesis en Opción al Título Académico de Master en Agricultura Sostenible. Mención Sanidad Vegetal]. Universidad Central Marta Abreu de las Villas, 2019; 54p.
- de la Cruz NL. Volátiles de bacterias endófitas de cacao y su efecto sobre *Moniliophthora royeri*. [Tesis para optar por el grado de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural], El Colegio de la Frontera Sur, Chiapas, México, 2014; 57 pp.
- Arrebola E, Sivakumar D, Korsten L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus. *Biological Control*, 2010; 53: 122-128. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.11.010>.
- StatSoft, Inc. STATISTICA (data analysis software system), version 12. 2014, www.statsoft.com
- Tahir HAS, Gu Q, Wu H, Niu Y, Huo R, Gao X. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt. *Scientific reports*, 2017; 7(1): 1-15. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep40481>.
- Wu Y, Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2014; 24:1327. Doi: <http://dx.doi.org/10.4014/jmb.1402.02061>.
- Massawe VC, Hanif A, Farzand A, Mburu DK, Ochola SO, Wu L, *et al.* Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathology*, 2018; 108 (12):1373-1385. Doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-18-0118-R>
- Nawaz HH, Rajaofera MN, He Q, Anam U, Lin C, Miao W. Evaluation of antifungal metabolites activity from *Bacillus licheniformis* OE-04 against *Colletotrichum gossypii*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018; 146: 33-42. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.007>.
- Rong S, Xu H, Li L, Chen R, Gao X, Xu Z. Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020; 162: 69-77. Doi: 10.1016/j.pestbp.2019.09.003.

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses

María Aracely Vera Loo: concibió la idea de la investigación. Colaboró en el diseño de la investigación. Participó en la búsqueda de información. Participó en el análisis e interpretación de los resultados. **Alexander Bernal Cabrera**: concibió la idea de la investigación. Realizó contribuciones en el análisis e interpretación de los datos. Participó en la búsqueda de información, en el diseño de la investigación, en la recolección de los datos. Realizó pruebas para evaluar los resultados. Participó en el análisis, revisión y redacción del manuscrito final. **Danilo Vera Coello**: participó en el diseño de la investigación. Participó en el análisis de los resultados y la revisión crítica del contenido del manuscrito para la aprobación final. **Michel Leiva Mora**: participó en la búsqueda de información. Participó en el análisis de los resultados y la revisión crítica del contenido del manuscrito para la aprobación final. **Alan Rivero Aragón**: participó en el procesamiento estadístico de los datos e interpretación de los resultados. **Lisbeth Morales Díaz de Villegas**: colaboró en la investigación. Participó en la búsqueda de información, en el diseño de la investigación.

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)