



**“ACCIÓN ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS
QUÍMICOS SOBRE HONGOS
FITOPATÓGENOS QUE AFECTAN FRUTOS
DE INTERÉS REGIONAL”**



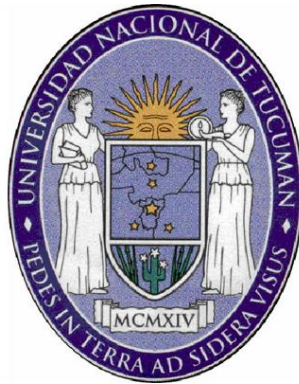
Lic. Gabriela María Olmedo



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA,
QUÍMICA Y FARMACIA

- 2017-

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y
FARMACIA



“Acción antifúngica de compuestos químicos sobre
hongos fitopatógenos que afectan frutos de interés regional”

Lic. Gabriela María Olmedo

2017



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUCUMÁN
FACULTAD DE BIOQUÍMICA, QUÍMICA Y FARMACIA**

AUTORIDADES

HONORABLE CONSEJO DIRECTIVO

Dra. Patricia Eugenia Álvarez
Dra. Gabriela Perdigón
Bioq. Farm. Ana María del Valle González
Dra. María Eugenia Mónaco
Dra. Carolina Serra Barcelona
Dra. María José Rodríguez Vaquero
Farm. Verónica Pastoriza
Sr. Walter Ricardo Gómez
Sr. Francisco Andrés Díaz
Srta. Ivana Micaela Núñez
Sr. Gonzalo Andrés Lascano

DECANA

Dra. Silvia Nelina González

VICE-DECANO

Dr. Edgardo Hugo Cutin

SECRETARIA DE ASUNTOS ACADEMICOS

Dra. Marta Elena Cecilia

JEFA DEL DEPARTAMENTO POSGRADO

Lic. Marta Quinteros

DEPARTAMENTO DE POSGRADO

AUTORIDADES

DIRECTOR:

Dr. Sergio Enrique Pasteris

CONSEJO TITULAR:

Dra. Inés del Carmen Ramos

Dra. María Carolina Navarro

Dra. María Cristina Gaudioso

Dra. Paula Andrea Vincent

Dra. María Cristina Rubio

Suplentes

Dra. María Graciela Benzal

Dra. Clara del Valle Silva de Ruiz

Dra. María Inés Nieva Moreno

REPRESENTANTE DE POSGRADO

ANTE LA SECRETARÍA DE POSGRADO DE LA UNT

Dra. Paula Andrea Vincent



**TRABAJO DE POSGRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO
SUPERIOR DE DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

CARRERA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU) Resolución n°: 615/07

Acreditado y Categorizado A ante la
Comisión Nacional de Acreditación Universitaria (CONEAU)
Resolución n°: 750/13

DIRECTOR

Dr. Atilio Pedro Castagnaro

VICE-DIRECTORA

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

COMITÉ ACADÉMICO

Dr. Alfredo Grau
Dr. Raúl Pedraza
Dra. Lucía Claps
Dra. Silvina Fadda

TRABAJO DE POSGRADO TITULADO:

“Acción antifúngica de compuestos químicos sobre hongos fitopatógenos que afectan frutos de interés regional”

TESISTA

Lic. Gabriela María Olmedo

DIRECTOR

Dra. Sabrina Inés Volentini

DIRECTOR ASOCIADO

Dra. Viviana Andrea Rapisarda

COMISIÓN DE SUPERVISIÓN

Dr. Sergio Miguel Salazar
Dra. María Guadalupe Vizoso Pinto



Este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en el Instituto Superior de Investigaciones Biológicas (INSIBIO), CONICET-UNT, e Instituto de Química Biológica “Dr. Bernabé Bloj” de la Facultad de Bioquímica Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán.

PUBLICACIONES

Olmedo, GM; Cerioni, L; González, MM; Cabrerizo, FM; Rapisarda, VA; Volentini, SI. 2017. "Antifungal Activity of β -carboline On *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea*". Food microbiology 6: 9-14. doi: 10.1016/j.fm.2016.09.011.

Olmedo, GM; Cerioni, L; González, MM; Cabrerizo, FM; Volentini, SI; Rapisarda, VA. 2017. "UVA Photoactivation of Harmol Enhances Its Antifungal Activity against the Phytopathogens *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea*". Frontiers in Microbiology. doi: 10.3389/fmicb.2017.00347. ISSN: 1664-302X.

Olmedo, GM; Cerioni, L; Sepúlveda, M; Ramallo, JC; Rapisarda, VA; Volentini, SI. 2017. "Polyhexamethylene guanidine as a fungicide, disinfectant and wound protector in lemons challenged with *Penicillium digitatum*". Postharvest Biology and Technology. En consideración.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

1. "Inhibición de la germinación de conidias de *Botrytis cinerea* por β -carbolineas".

Olmedo, GM; Cerioni, L; González, MM, Cabrerizo, FM; Rapisarda, VA; Volentini, SI. 3° Congreso Argentino de Fitopatología. Tucumán, Argentina. Junio de 2014.

2. "Actividad antifúngica de harmol sobre los hongos fitopatógenos *Penicillium digitatum* y *Botrytis cinerea*".

Olmedo, GM; Cerioni, L; González, MM, Cabrerizo, FM; Rapisarda, VA; Volentini, SI. X Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO. Tucumán, Argentina. Septiembre de 2015.

3. "Cellular damage induced by harmol on *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea*".

Olmedo, GM; Cerioni, L; González, MM, Cabrerizo, FM; Rapisarda, VA; Volentini, SI. LI Reunión SAIB. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2015.

4. "Antifungal activity of polyhexamethylene guanidine hydrochloride against *Penicillium digitatum*".

Olmedo, GM; Cerioni, L; Ramallo, J; Rapisarda, VA; Volentini, SI. XIII International Citrus Congress. Foz do Iguaçu, Brasil. Septiembre de 2016.

5. “Acción antifúngica de cloruro de polihexametilen guanidina sobre *Botrytis cinerea*”.
Olmedo, GM; Cerioni, L; Sepulveda, M; Ramallo, J; Rapisarda, VA; Volentini, SI.
4° Congreso Argentino de Fitopatología.
Mendoza, Argentina. Abril de 2017.

6. “Control de podredumbre verde en limones por cloruro de polihexametilen guanidina”
Olmedo, GM; Cerioni, L; Rapisarda, VA; Volentini, SI.
4° Congreso Argentino de Fitopatología.
Mendoza, Argentina. Abril de 2017.

Agradecimientos

Doy gracias a Dios y a la Virgen, por ser la esencia de cada etapa de mi vida. Por ser mi fortaleza, mi refugio y mi paz.

Para mis ángeles, Lelo, Ñaña, Porito y tía Gorda. Su luz ilumina mi camino en el éxito y en el fracaso, y me entrego a sus ejemplos de vida para decidir, emprender y luchar.

Gracias eternas a mi familia: a papá y mamá, por su testimonio de honestidad y lucha, por su apoyo incondicional, por darme una vida tan hermosa y feliz. A mis hermanos, Sol, Juan y Luchi, por ser mis mejores amigos, mis primeros aliados. A mi Lela, por tu amor y ternura. A mis tíos y primos, por estar presentes y alegrar mis días. A Mirito y Pailito, mis queridos cuñados. Gracias familia, por alentarme siempre, por entender mis malos momentos y por ayudarme a superarlos. Gracias por ser todo.

A mis directoras Sabri y Vivi: gracias por guiarme desde su conocimiento y experiencia respetando mis ideas y opiniones. Gracias por haberme comprendido en momentos difíciles, en los que me inundó la duda y el temor. Gracias por su tiempo y esfuerzo aún fuera del horario laboral, para que este proyecto avance y dé frutos. Gracias por demostrarme que la ciencia es hermosa, siempre que se trabaje con pasión y perseverancia.

Gracias a Franco Cabrerizo y Mica González, por su hospitalidad durante mis estadías en Chascomús, por su paciencia y dedicación al enseñarme, por su gran predisposición y sus valiosos aportes durante la discusión de los trabajos.

A los miembros de mi comisión de supervisión, Dr. Sergio Salazar y Dra. Guadalupe Vizoso Pinto, quienes hicieron aportes muy valiosos para la interpretación de mis resultados, la toma de decisiones y la corrección de este trabajo.

Agradezco a mis compañeros y amigos del lab por compartir con alegría las tareas diarias, por disfrutar, festejar y reflexionar la vida y el trabajo entre mates y cafés. A Lu Cerioni: tu aporte desde lo científico fue valiosísimo, pero tu mirada, consejo y contención fueron indispensables para llegar al final de esta etapa; gracias Ciri por tu ejemplo y tu cariño. A Marianita: gracias por ser mi cómplice en el humor, la competencia y la maldad, gracias porque aún pensando tan diferente a mí, me entendiste y aconsejaste siempre. A Jose: no te entendí una sola palabra en estos 5 años, pero gracias porque tus consejos y opiniones (las que tuve que descifrar) fueron super valiosos para mí. A Emi M.: gracias por tantas charlas y eventos de los profundos y de los superficiales (la mancha anzoarena no se quita), gracias por tu consejo, compañía y comprensión. A Juan: tus continuos ataques fueron pintorescos la verdad.. sos un ser insoportable, pero gracias por formar parte de este círculo íntimo pero no tan íntimo. A Marisa: logramos mantener el sentido del humor ante el apocalipsis de nuestras tesis, nunca olvidaré las incontables horas de catarsis en los escalones de tu lab. A los que estuvieron Vero R., Lui, Gini, Omar, Ana R., y a los que están Memi, Cari, Marito. Gracias también a los grupos con los que comparto piso, Frutilla

y Salmonella. Trabajar en un ambiente tan ameno es un placer. Gracias a los demás becarios, investigadores, docentes y no docentes del Instituto.

Quería agradecer también a mis amigos por acompañarme y regalarme tantas anécdotas hermosas, recuerdos que me dieron la estabilidad espiritual, emocional y psíquica en momentos clave. Gracias a Lucía, mi mejor amiga; a mis amigos del colegio y de la facultad, a las Caruñitas, a mi querido Team GH, a mis amigos de la vida. Sin dudas son fundamentales para mí. Gracias Lau por ayudarme también con la portada y separadores de mi Tesis.

A la Ing. Agr. Mg. Sc. Jacqueline Ramallo: gracias por permitirme desarrollar experimentos en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de SA San Miguel. A Mile y Miguelito quienes me ayudaron siempre y se bancaron mis cajas de podridos.

Finalmente agradezco a las Autoridades del INSIBIO e Instituto de Química Biológica Dr “Bernabé Bloj” por permitirme realizar este trabajo facilitando las instalaciones y los equipos adecuados.

A Marta Quinteros, Carlos Puig, Ana Atonur, Mariana Araoz y Florencia Garzón por su absoluta predisposición y la eficiente gestión de mis papeles.

A la Universidad Nacional de Tucumán por ser el espacio de mi formación académica desde la etapa de grado, permitiéndome convertirme en profesional y perfeccionarme.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas que me otorgó la beca que hizo posible este trabajo de doctorado.

A mi país, la República Argentina, que permite la formación universitaria libre y gratuita, tanto de grado como de posgrado.

ÍNDICE GENERAL

Abreviaturas	1
Resumen	2
Abstract	4
<i>Introducción</i>	6
Producción agrícola en Tucumán	6
Limón.....	6
Generalidades.....	6
El cultivo del limonero	8
Aspectos económicos de la producción de cítricos en el mundo y en Argentina.....	9
La citricultura en Tucumán.....	12
Esquema del complejo limonero tucumano.....	13
Procesamiento poscosecha del limón	14
Arándano.....	16
Generalidades.....	16
El cultivo del arándano	18
Aspectos económicos de la producción de arándanos	18
La producción de arándanos en Tucumán	20
Procesamiento del arándano	21
Problemática relacionada con la comercialización del limón y del arándano: enfermedades y su control	22
Enfermedades poscosecha y cuarentenarias	23
- <i>Podredumbre verde</i>	23
- <i>Podredumbre gris</i>	26
Tratamientos poscosecha de frutos	28
<i>Convencionales</i>	28
- <i>Fungicidas</i>	28
<i>No convencionales</i>	29
- <i>Métodos físicos</i>	30
- <i>Métodos biológicos</i>	30
- <i>Métodos químicos</i>	31

Problemática asociada al uso de fungicidas.....	31
β-carbolinas (βCs).....	32
Polihexametilen guanidina (PHMG).....	32
Antecedentes del grupo de trabajo	33
<i>Materiales y métodos</i>	35
Microorganismos utilizados en este estudio: aislamiento, caracterización e identificación de hongos	35
Aislamiento e identificación de aislados de <i>B. cinerea</i>	35
Reactivos.....	36
Beta carbolinas (βCs).....	36
Polihexametilen guanidina (PHMG)	37
Otros reactivos utilizados.....	37
Medios de cultivo	37
Medio líquido Papa Glucosa (PG)	37
Medio Agar Papa Glucosa (APG)	37
Frutos.....	38
Tratamientos <i>in vitro</i> de hongos con compuestos químicos	38
Preparación de las suspensiones conidiales	38
Estudio de la germinación de conidias expuestas a compuestos químicos.....	39
Estudio del efecto del pH sobre la actividad antifúngica del harmol	39
Determinación del efecto tipo fungistático o fungicida de los compuestos	40
Estudio del crecimiento micelial en presencia de compuestos químicos	40
Estudio del efecto del los compuestos sobre la morfología y fisiología de las conidias 40	
Estudios de permeabilización de la membrana conidial	40
Ensayos de integridad de la pared celular de las conidias	41
Estudio de la ultraestructura de las conidias	41
Determinación de formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) en conidias.....	42
Determinación de proteínas	42
Determinación de la infectividad residual de conidias	43
Estudio del efecto de la radiación UV-A sobre la actividad antifúngica de harmol.....	44
- <i>Estudio del efecto de la radiación UV-A sobre la viabilidad conidial</i>	44
- <i>Estudio del efecto fotodinámico de harmol</i>	44

Estudio de la efectividad de PHMG en el control de podredumbre verde en limones	44
Evaluación de la acción desinfectante de PHMG	45
Evaluación de la protección de heridas en la piel del limón.....	45
Evaluación de la acción curativa de PHMG	45
Evaluación de la acción preventiva de PHMG	46
Estudio de parámetros fisiológicos en limones.....	46
- <i>Peso</i>	46
- <i>Color</i>	46
- <i>Firmeza</i>	47
- <i>Sólidos solubles totales</i>	47
- <i>Acidez titulable</i>	47
Estudio de la efectividad de PHMG en el control de podredumbres en arándano	47
Evaluación de la acción curativa de PHMG	48
Análisis estadístico.....	48
CAPITULO I: β-carbolinas (βCs).....	49
Efecto <i>in vitro</i> de β Cs sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos.....	49
- <i>Efecto sobre la germinación de conidias</i>	49
- <i>Efecto del pH del medio en la actividad antifúngica del harmol</i>	51
- <i>Inhibición del crecimiento micelial por harmol</i>	53
Estudio de la morfología y el estado fisiológico de las conidias después de la exposición a harmol	54
- <i>Morfología de las conidias expuestas a harmol</i>	54
- <i>Permeabilización de la membrana por harmol</i>	55
- <i>Modificaciones en la pared conidial provocadas por harmol</i>	56
- <i>Modificaciones en la ultraestructura de las conidias por harmol</i>	57
- <i>Disminución de la infectividad de las conidias tratadas con harmol</i>	58
<i>Potenciación de la actividad antifúngica de harmol por fotoactivación con UV-A</i>	60
- <i>Acumulación de ERO provocada por la exposición a harmol. Generación de estrés oxidativo</i>	61
CAPÍTULO II: Polihexametilen guanidina (PHMG)	64
Efecto <i>in vitro</i> de PHMG sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos	64
- <i>Efecto sobre la germinación de conidias</i>	64
- <i>Inhibición del crecimiento del micelio fúngico por PHMG</i>	65

Estudio de la morfología y el estado fisiológico de las conidias después de la exposición a PHMG	66
- <i>Permeabilización de la membrana por PHMG</i>	66
- <i>Modificaciones en la pared conidial provocadas por PHMG</i>	67
- <i>Modificaciones en la ultraestructura de conidias por el tratamiento con PHMG</i> .	68
- <i>Estrés oxidativo por la exposición a PHMG</i>	69
- <i>Disminución de la capacidad infectiva de las conidias tratadas con PHMG</i>	71
Evaluación del PHMG para el control de podredumbre verde en limones	72
- <i>Acción desinfectante</i>	72
- <i>Protección de heridas</i>	73
- <i>Acción fungicida</i>	74
- <i>Estudio de los parámetros de calidad del limón</i>	75
Evaluación del PHMG como fungicida para el control de podredumbres en arándanos	76
- <i>Control de podredumbre gris en arándanos inoculados con B. cinerea</i>	76
- <i>Control de infecciones naturales en arándanos</i>	78
<i>Discusión</i>	80
Inhibición del crecimiento <i>in vitro</i> de <i>P. digitatum</i> y <i>B. cinerea</i>	80
Mecanismo de acción antifúngica de harmol y PHMG	81
Control de podredumbres fúngicas en frutos	86
- <i>PHMG en el proceso poscosecha de limones</i>	86
- <i>PHMG en el proceso poscosecha de arándanos</i>	90
<i>Conclusiones y proyecciones</i>	92
<i>Referencias</i>	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del fruto cítrico.	7
Figura 2. Principales países productores de cítricos en el mundo.	9
Figura 3. Etapas de la producción de cítricos en Argentina.	10
Figura 4. Evolución de la producción argentina de cítricos por especie.	11
Figura 5. Zona citrícola de la provincia de Tucumán.	12
Figura 6. Esquema del complejo citrícola en Argentina.	13
Figura 7. Principales países importadores del limón tucumano.	13
Figura 8. Estructura del fruto de arándano.	16
Figura 9. Evolución de la producción de arándanos en Tucumán.	20
Figura 10. <i>Pallet</i> con cajas de arándanos embaladas para exportación en cámara de frío. ...	22
Figura 11. Morfología y aspecto de <i>P. digitatum</i>	24
Figura 12. Ciclo biológico de <i>P. digitatum</i>	25
Figura 13. Limones afectados por podredumbre verde.	25
Figura 14. Aspecto macroscópico y morfología celular de <i>B. cinerea</i>	26
Figura 15. Ciclo biológico de <i>B. cinerea</i>	27
Figura 16. Estructura química base de las β Cs.	32
Figura 17. Estructura química del PHMG.	33
Figura 18. Identificación morfológica del aislado B01y confirmación molecular de su identidad.	36
Figura 19. Estructura de las seis β Cs estudiadas.	49
Figura 20. Efecto de las β Cs sobre la germinación de conidias.	50
Figura 21. Efecto del pH sobre la estructura química y el equilibrio ácido-base del harmol.	51
Figura 22. Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de harmol.	52
Figura 23. Efecto de harmol sobre el crecimiento micelial y la esporulación.	54
Figura 24. Efecto del harmol en la morfología celular.	55
Figura 25. Efecto del harmol sobre la permeabilidad de la membrana plasmática.	56
Figura 26. Efecto del harmol en la integridad de la pared celular.	57
Figura 27. Efecto del harmol en la ultraestructura de conidias.	58
Figura 28. Capacidad infectiva de conidias tratadas con harmol.	59

Figura 29. Efecto del harmol en la producción intracelular de ERO.	62
Figura 30. Efecto del PHMG sobre la germinación de conidias.	64
Figura 31. Efecto del PHMG sobre la morfología y la viabilidad de los hongos.....	65
Figura 32. Efecto del PHMG sobre el crecimiento micelial.....	66
Figura 33. Efecto de PHMG sobre la permeabilidad de la membrana de las conidias.	67
Figura 34. Efecto del PHMG sobre la integridad de la pared celular.....	68
Figura 35. Efecto de PHMG en la ultraestructura de conidias.	69
Figura 36. Efecto de PHMG en la producción intracelular de ERO.	70
Figura 37. Capacidad infectiva de conidias tratadas con PHMG.	71
Figura 38. PHMG como desinfectante.	73
Figura 39. PHMG como protector de heridas en la cáscara de limón.	74
Figura 40. PHMG como fungicida contra infecciones primarias y secundarias en limones.	75
Figura 41. PHMG como fungicida en arándanos inoculados con <i>B. cinerea</i>	77
Figura 42. PHMG como fungicida en arándanos no inoculados.....	78
Figura 43. Esquema del daño provocado por los compuestos en la conidia.	85
Figura 44. Etapas del procesamiento del limón en las que se propone el uso del PHMG. ..	90

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valor nutricional (VN) del limón	8
Tabla 2. Producción mundial y argentina por especie cítrica en 2016	11
Tabla 3. Valor nutricional (VN) del arándano.....	17
Tabla 4. Principales países productores de arándanos en 2016.....	19
Tabla 5. Efecto de la irradiación con luz UV-A sobre la viabilidad de las conidias	61
Tabla 6. Efecto fotodinámico del harmol sobre la viabilidad de las conidias	61
Tabla 7. Efecto del tratamiento con PHMG sobre los parámetros de calidad de limones ..	76

Abreviaturas

APG: agar papa glucosa
CFW: calco fluor White
c.s.p: cantidad suficiente para
DCF: diclorofluoresceína
ERO: especies reactivas del oxígeno
H₂DCFDA: diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HR: humedad relativa
ICC: índice de color de citrus
IMZ: imazalil
LMR: límite máximo de residuo
MET: microscopía electrónica de transmisión
PG: papa glucosa
PHMG: polihexametilen guanidina
ppm: partes por millón
PYR: pirimetanil
SG: Sytox Green
TBZ: tiabendazol
tn: toneladas
UAF: unidades arbitrarias de fluorescencia
UFC: unidades formadoras de colonias
UV-A: ultravioleta A
βC: beta carbolina

Resumen

Los cultivos de limón y arándano representan dos de las principales cadenas productivas de la provincia de Tucumán, principalmente por los recursos económicos que generan. Debido a su alto contenido de humedad, las frutas son susceptibles al ataque por bacterias y hongos fitopatógenos en el campo y durante su procesamiento poscosecha, generando grandes pérdidas económicas en el sector. Entre los hongos se destacan *Penicillium digitatum*, microorganismo causante de la podredumbre verde en los cítricos, y *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris en más de 200 especies vegetales, entre ellas el arándano. Estas enfermedades son normalmente controladas mediante la aplicación de fungicidas sintéticos. El uso continuo de estos productos a altas dosis generó la aparición de cepas resistentes. Además, esta práctica puede llevar a exceder el límite máximo de residuos permitido por los mercados importadores de la fruta. Por ello, existe una necesidad creciente de encontrar compuestos químicos alternativos que posean acción sobre hongos fitopatógenos. El estudio de moléculas conocidas como nuevos fungicidas es una estrategia eficiente que permite su introducción de forma rápida y segura en el mercado. Así, este trabajo tuvo como objetivo estudiar la actividad antimicrobiana y el mecanismo de acción sobre *P. digitatum* y *B. cinerea* de β -carbolicinas (β Cs), un grupo de alcaloides derivados de plantas, y de polihexametilen guanidina (PHMG), un polímero comercial conocido como desinfectante.

Los resultados indican que las seis β Cs ensayadas (norharmano, harmano, harmina, harmol, harmalina y harmalol) exhiben toxicidad frente a los microorganismos de forma dosis-dependiente, siendo más efectivas las β Cs completamente aromáticas que los dihidro derivados. El harmol protonado resultó ser el compuesto más activo. La irradiación de harmol con UV-A durante 30 min potenció su efecto antifúngico. Por otro lado, el PHMG logró inhibir *in vitro* la germinación y el crecimiento micelial de ambos hongos. Los tratamientos con harmol y con PHMG provocaron permeabilización de membrana plasmática, disrupción de la pared y daño ultraestructural de las conidias, lo que llevó a la pérdida de su capacidad infectiva sobre limones y arándanos. Además, la actividad fungicida del harmol se correlacionó con la acumulación intracelular de especies reactivas del oxígeno.

En ensayos realizados *in vivo*, el PHMG exhibió acción fungicida, desinfectante y cicatrizante de heridas en limones, sin provocar cambios en sus parámetros de calidad (peso, color y firmeza de los frutos, y contenido de sólidos solubles y acidez titulable del jugo). Por otro lado, la aplicación de PHMG sobre arándanos inoculados con *B. cinerea* fue capaz de reducir parcialmente la incidencia de podredumbre gris. Asimismo, el polímero controló significativamente la infección natural de arándanos sin inocular. Por esto, el PHMG resulta un compuesto alternativo que podría ser aplicado en distintas etapas del procesamiento poscosecha de limones y arándanos para el control de podredumbres. Además, al provocar un daño generalizado en las conidias de los hongos, existe un bajo riesgo de aparición de cepas resistentes.

El estudio llevado a cabo en este trabajo de Tesis aporta datos sobre compuestos con actividad antifúngica que resultan prometedores para el control de podredumbres causadas por *P. digitatum* y *B. cinerea*, patógenos poscosecha de importancia para la región.

Palabras clave: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, tratamiento poscosecha

Abstract

Lemon and blueberry crops represent two of the main production chains in the province of Tucumán, mainly because of the economic resources that generate. Due to their high-moisture content, fruit are susceptible to the attack by bacteria and fungi both during pre- and post-harvest processing. Among fungi, *Penicillium digitatum* is a phytopathogenic fungus that causes green mold in citrus, and *Botrytis cinerea* is the causal agent of gray mold in more than 200 plant species, including blueberry. Both diseases are usually controlled by the application of synthetic fungicides. Further, the continuous use of these products at high doses generated the emergence of fungal resistant strains. In addition, this practice results in high levels of residues on the fruit, which may go beyond established limits in some of the importing countries. Therefore, there is an increasing need to find alternative chemical compounds with activity against phytopathogenic fungi. The study of known molecules as new fungicides is an efficient strategy that allows their safe and quick introduction into the market. The aim of this work was to investigate the antimicrobial activity and mechanism of action of β -carbolines (β Cs), a group of plant-derived alkaloids, and polyhexamethylene guanidine (PHMG), a commercial polymer known as a disinfectant, on *P. digitatum* and *B. cinerea*.

The six β Cs tested in this study (norharmane, harmane, harmine, harmol, harmaline and harmalol) exhibited a dose-dependent toxicity to microorganisms, being completely aromatic β Cs more effective than dihydro-derivatives. Harmol in its protonated form was the most active compound. The irradiation of harmol with UV-A for 30 min enhanced its antifungal effect. On the other hand, PHMG was able to inhibit germination and mycelial growth of both fungi. Harmol and PHMG treatments caused membrane permeabilization, cell wall disruption, and ultrastructural damage of conidia, resulting in a loss of infective capacity on lemons and blueberries. In addition, the fungicidal activity of harmol correlated with an intracellular accumulation of reactive oxygen species.

In vivo assays demonstrated that PHMG exhibits fungicidal, disinfectant and wound protection activity in lemons, without affecting their quality parameters (weight, color and fruit firmness, soluble solid content and juice acidity). On the other hand, the application of PHMG was able to partially reduce the incidence of gray mold in blueberries inoculated

with *B. cinerea*. Also, the polymer significantly controlled the natural infection of uninoculated blueberries. Therefore, PHMG is an alternative compound that could be applied in different stages of fruit post-harvest processing to control molds. In addition, by causing inespecific damage to conidia, there is a low risk of emergence of resistant strains.

The study carried out in this thesis provides data on compounds with antifungal activity that are promising for the control of molds caused by *P. digitatum* and *B. cinerea*, important regional post-harvest pathogens.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum*, postharvest treatment



INTRODUCCIÓN

Producción agrícola en Tucumán

Tucumán es una pequeña provincia de Argentina cuyo territorio posee una particular diversidad agroecológica. El clima dominante es subtropical con estación seca, con microclimas variados que le confieren un importante potencial productivo. Este potencial se ve favorecido por la disponibilidad de recursos hídricos superficiales y subterráneos, lo que facilita el desarrollo agropecuario e industrial (Bonacia y Danón, 2012).

Dentro de la estructura productiva de la provincia, la actividad primaria tiene gran relevancia. Los complejos agroindustriales abarcan desde la producción agrícola a campo hasta el producto final obteniéndose fruta en fresco, clasificada y empacada, y diversos productos industriales (SSPE, 2016). Dentro de este sector, los cultivos de **limón** y **arándano** representan dos de las principales cadenas productivas.

Limón

Generalidades

El limonero pertenece a la familia *Rutaceae*, género *Citrus* y especie *Citrus limon*. El género botánico *Citrus* es el más importante del grupo y consta de unas 20 especies con frutos comestibles. Es considerado uno de los frutales más importantes en el mundo y ha experimentado numerosas modificaciones a lo largo del tiempo. Algunas de ellas ocurrieron debido a la selección natural, mediante hibridaciones espontáneas, y otras fueron generadas por el hombre en busca de satisfacer las necesidades del mercado (Saunt, 1992). La gran diversidad de especies y sus distintas propiedades organolépticas hacen del limón un producto de gran aceptación por parte de los consumidores.

Como se muestra en la **Figura 1**, la estructura del fruto cítrico consta de tres partes bien diferenciadas. El epicarpio o flavedo, el mesocarpio o albedo y el endocarpio, constituido por varios gajos o carpelos que contienen las vesículas de jugo y las semillas. El epicarpio y el mesocarpio conforman la cáscara de la fruta.

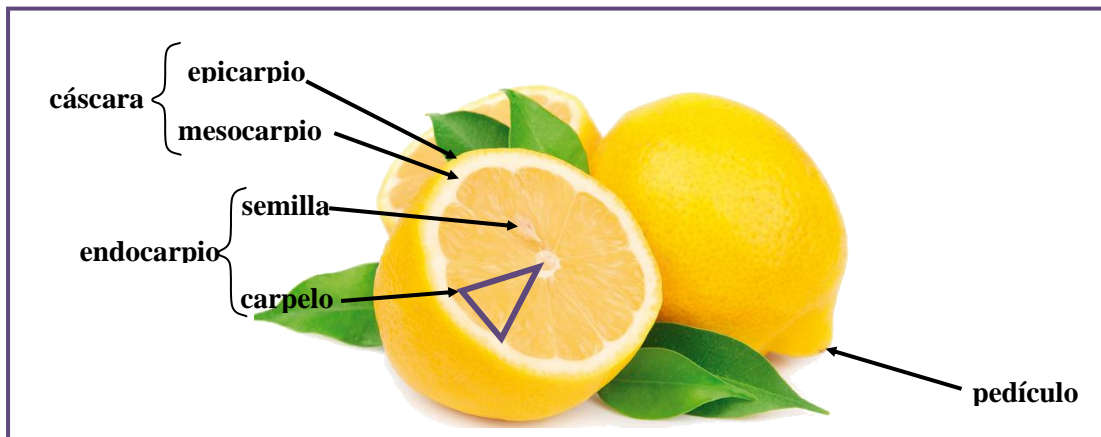


Figura 1. Estructura del fruto cítrico.

En la fotografía se muestra un corte transversal del limón en donde se señalan las diferentes partes.

El fruto del limonero posee un amplio espectro de usos, entre los que se destacan el gastronómico y el farmacológico por sus propiedades digestivas, astringentes, dermatológicas, antigripales y antiescorbúticas (Pérez Trueba y Martínez Sánchez, 2001). En la **Tabla 1** se detalla el valor nutricional que posee el limón, fruto constituido en su mayor parte por agua y que contiene hidratos de carbono, proteínas, grasas y minerales tales como potasio, magnesio, calcio, fósforo, cobre, cinc, hierro y manganeso. Las sustancias con acción antioxidante presentes en la fruta son la vitamina C, vitamina E, β -caroteno, licopeno, luteína, flavonoides y antocianinas, entre otras.

Dentro de las vitaminas que contiene el limón, se destaca el alto contenido de vitamina C (ácido ascórbico), necesaria para el funcionamiento de la mayoría de los organismos (Halliwell, 2006). El limón también se caracteriza por poseer una gran cantidad de ácidos, entre los que se encuentran el málico y el cítrico. Este último participa activamente en la asimilación de calcio y a él se deben las propiedades astringentes y desinfectantes del fruto (Infoagro, 2010).

Tabla 1. Valor nutricional (VN) del limón

VN del limón en 100 g de sustancia comestible	
Agua (g)	90,10
Proteínas (g)	1,10
Lípidos (g)	0,03
Carbohidratos (g)	8,20
Vitamina B1 (mg)	0,04
Vitamina B2 (mg)	0,02
Ácido pantoténico (mg)	0,20
Vitamina C (mg)	45,00
Ácido cítrico (g)	3,84
Sodio (mg)	6,00
Potasio (mg)	148,00
Calcio (mg)	26,00
Magnesio (mg)	9,00
Manganeso (mg)	0,04
Hierro (mg)	0,60
Cobre (mg)	0,26
Fósforo (mg)	16,00
Azufre (mg)	8,00
Cloro (mg)	4,00

Extraído de Infoagro (2010)

El cultivo del limonero

Los citrus son frutales de origen subtropical, lo que convierte a la región del Noroeste Argentino (NOA) en una zona ideal para su cultivo. Las especies comerciales del género *Citrus* son árboles pequeños, de 3 a 7 m de altura, dependiendo de la variedad y de la edad. Usualmente son espinosos y tienen follaje verde. El limonero es una planta que demanda mucha fertilización, mostrando rápidamente signos de deficiencia en caso de que no se realice la correcta aplicación de productos químicos. Además, algunos genotipos demandan grandes cantidades de agua (Joublan y Cordero, 2002, Morín, 1980).

En Argentina, tradicionalmente se conocían los cultivares Eureka, Lisboa y Génova, los que por décadas representaron más del 90% de la producción nacional. Posteriormente, se introdujo nuevo material genético, mejorando sensiblemente la oferta de estas frutas. En la actualidad, las variedades existentes en el mercado obedecen a una selección encaminada a mejorar su calidad, priorizando principalmente el mayor contenido de jugo (Joublan y Cordero, 2002).

Aspectos económicos de la producción de cítricos en el mundo y en Argentina

La producción de cítricos a escala mundial resulta importante tanto por sus volúmenes como por los recursos económicos que genera. Argentina y Brasil se encuentran entre los mayores productores del Hemisferio Sur (*Figura 2*).

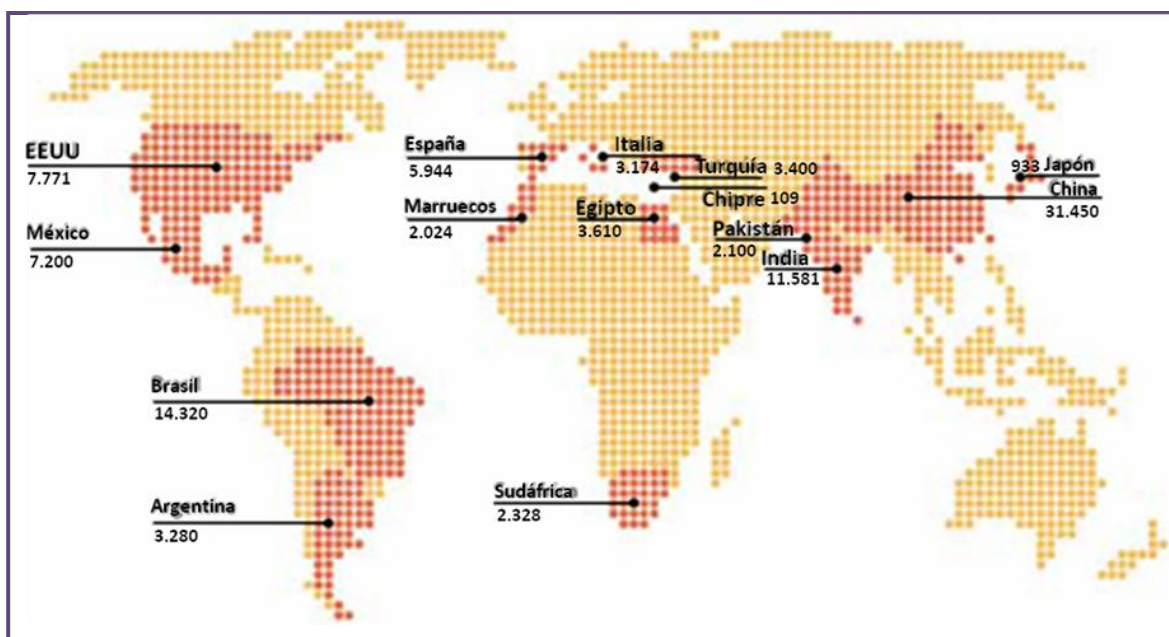


Figura 2. Principales países productores de cítricos en el mundo.

Se muestran los principales países productores de cítricos, con sus respectivas producciones en miles de toneladas (campaña 2015/2016). Elaboración propia en base a datos de FEDERCITRUS (2017).

En nuestro país la citricultura se caracteriza por ser una de las actividades frutícolas más importantes, representando alrededor de la cuarta parte de la superficie cultivada. La posición geográfica del país permite posicionar a Argentina como un importante proveedor de frutas cítricas, abasteciendo principalmente a los países del hemisferio norte en los periodos de contraestación. Así, las exportaciones argentinas de cítricos tienen las mejores

posibilidades de colocación en los mercados de la Unión Europea, Europa oriental, EEUU y el Sudeste de Asia (FEDERCITRUS, 2017).

La importancia del sector cítrico en las economías regionales queda plasmada en la cantidad de agentes que intervienen en la cadena. Según el último relevamiento del sector, realizado en el año 2014, la cadena está integrada por 5300 productores, 440 empaques y 20 plantas industriales de jugo. El sector presenta una gran demanda de mano de obra y empleo especializado. Por ejemplo, en 2014, los eslabones del complejo (campo, cosecha, empaque e industria) generaron 91961 empleos directos. A esto hay que sumar los empleos indirectos, como servicios de asesoramiento y reparación o provisión de bienes e insumos, los que representa 1,5 empleos indirectos por cada empleo directo (CAME, 2015).

Como la mayoría de las producciones agropecuarias, la citricultura es una actividad cíclica dependiente de factores exógenos (clima, precios, oferta y demanda mundial), y también permeable a cuestiones coyunturales del país (tipo de cambio, costos internos, decisiones de los productores y políticas de gobierno de turno). Desde que comenzó su expansión, la citricultura atravesó períodos de crecimiento con altibajos, pudiéndose identificar dos grandes etapas: una etapa de “crecimiento serrucho pero alto y sostenido” (1985-2007), y otra etapa de “altibajos con estancamiento” (2008-2015) (*Figura 3*).

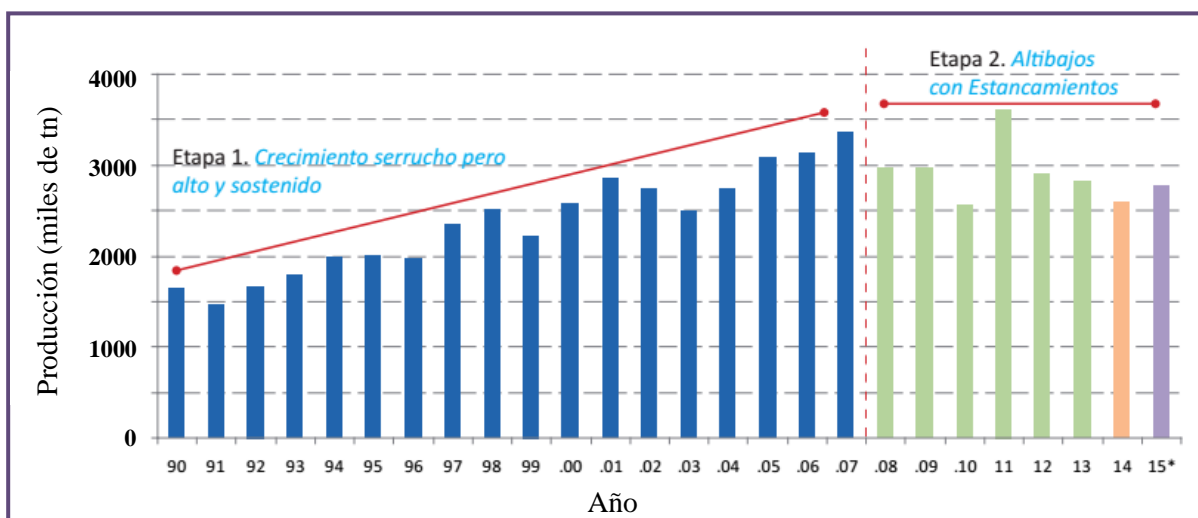


Figura 3. Etapas de la producción de cítricos en Argentina.

Producción de cítricos desde 1990 a 2015, en miles de toneladas Fuente: FEDERCITRUS (2017), estimado en base a USDA.

En 2014 la producción de cítricos frescos sufrió una caída de un 8,2% debido a condiciones climáticas adversas. En 2015 la actividad se mantuvo por debajo de sus niveles

históricos de rendimiento. La producción de 2016 fue de 3,28 millones de tn, acercándose a los valores promedio de la etapa 2008-2013. (FEDERCITRUS, 2017).

Entre las exportaciones nacionales de cítricos, la participación del limón se ha mantenido por arriba de la producción de los otros cítricos desde sus inicios (FEDERCITRUS, 2017) (*Figura 4*).

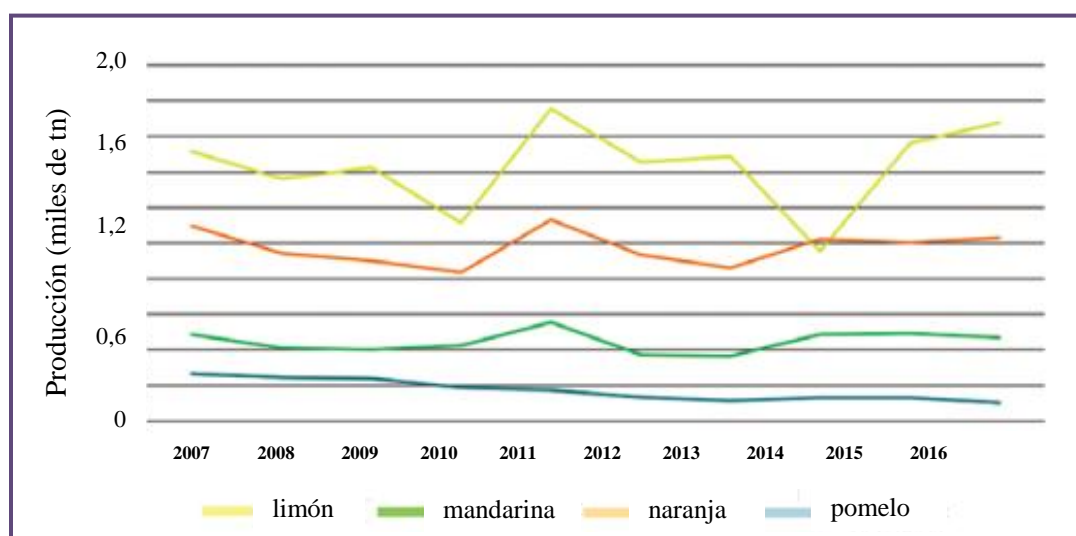


Figura 4. Evolución de la producción argentina de cítricos por especie.

Se muestra la producción de limones, mandarinas, naranjas y pomelos entre 2007 y 2016 en miles de tn. Fuente: FEDERCITRUS (2017).

De las mandarinas, naranjas y pomelos que se cultivan en el mundo, Argentina produce menos del 6% (*Tabla 2*). En cambio, nuestra producción de limón representa el 20,35% de la producción mundial, lo que nos posiciona como el primer país productor a dicha escala.

Tabla 2. Producción mundial y argentina por especie cítrica en 2016

Especie	Producción		Porcentaje
	Mundial	Argentina	
Limón	8244	1678	20,35
Mandarina	30202	468	1,55
Naranja	47137	1032	2,19
Pomelo	6515	102	1,57
Total	92098	3280	3,56

Se muestra la producción argentina por especie cítrica (en miles de tn) y el porcentaje que representa frente a la producción mundial. Fuente: FEDERCITRUS (2017), en base a USDA, EEAOC y SENASA.

La citricultura en Tucumán

La actividad citrícola argentina se desarrolla principalmente en zonas bien definidas:

- Zona del Noroeste (NOA): en Salta, Jujuy, Tucumán y Catamarca.
- Zona del Noreste: en Misiones y Corrientes, incluyendo Entre Ríos y Buenos Aires.
- Resto del país: en Formosa, Santa Fe y Chaco.

En Tucumán, la superficie plantada con frutas cítricas es de 40.930 ha, extendiéndose desde Burruyacú, al nordeste de la provincia, hasta La Cocha, al sur (**Figura 5**). Del total de esta superficie, más del 95% corresponde a plantaciones de limón (FEDERCITRUS, 2017). La actividad industrial se localiza cerca de la actividad primaria, concentrándose en torno al aglomerado San Miguel de Tucumán.

Tucumán produce el 95% del limón en fresco, el 85% de los aceites esenciales y el 82% del jugo de limón que exporta el país. El 6% de la población económicamente activa de la provincia está ocupada en esta actividad (CAME, 2015).

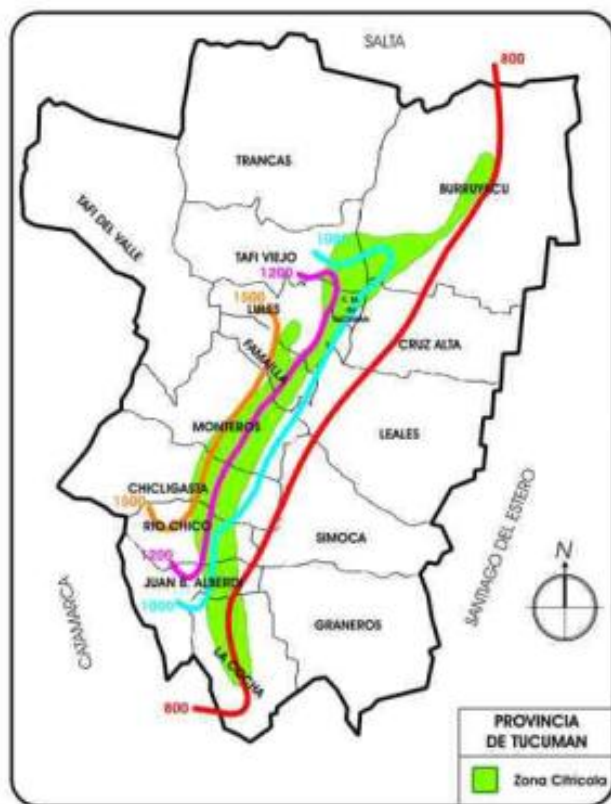


Figura 5. Zona citrícola de la provincia de Tucumán.

Las líneas de color corresponden a las isohietas anuales. Imagen cedida por la ATC. Realizada por Foguet (2003).

Esquema del complejo limonero tucumano

Hay dos modalidades de comercialización del limón (*Figura 6*):

1) Comercialización de fruta en fresco: se vende para consumo tanto en mercado interno como externo.

2) Comercialización de productos industrializados: se producen jugos concentrados, aceites esenciales y cáscara deshidratada, para mercado interno y externo.

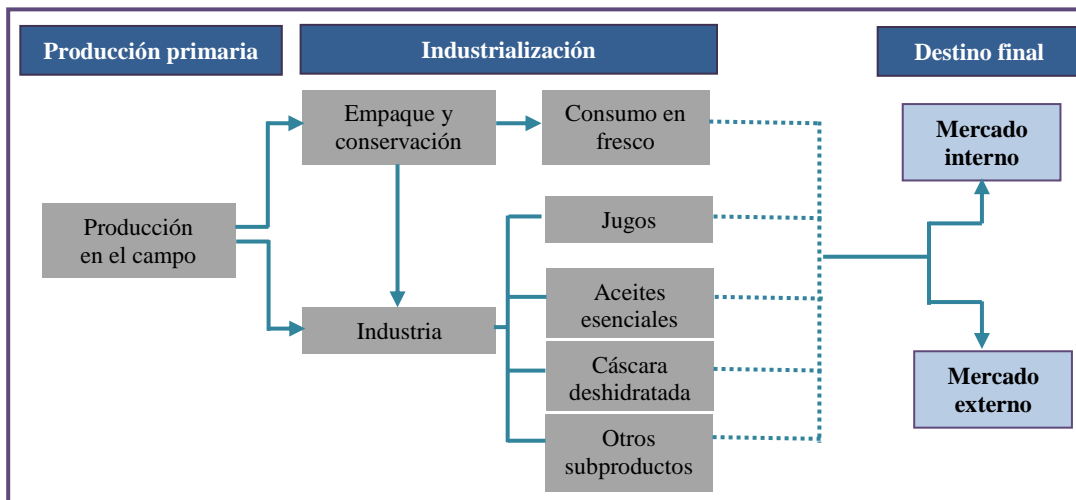


Figura 6. Esquema del complejo citrícola en Argentina.

Fuente: MECON (2011).

En 2016, alrededor del 50% de la producción tucumana se destinó a la industria, el 23% al consumo interno y el 12% para su exportación como fruta fresca. Los principales destinos de exportación fueron España, Rusia, Italia, Canadá y Ucrania los cuales, en conjunto, representaron el 75% de las exportaciones (*Figura 7*) (FEDERCITRUS, 2017).

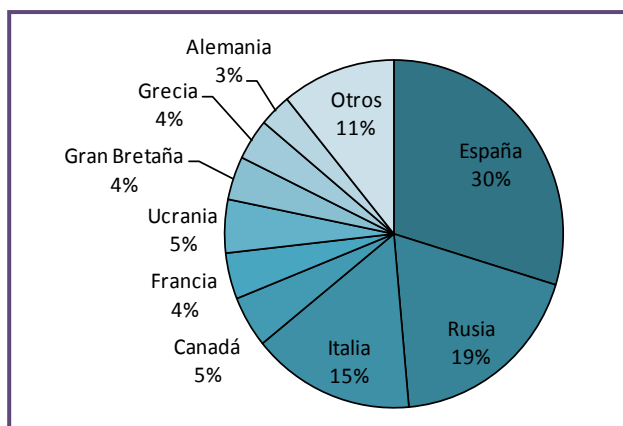


Figura 7. Principales países importadores del limón tucumano.

Elaborado a partir de datos de La Actividad Citrícola Argentina (FEDERCITRUS, 2017).

Procesamiento poscosecha del limón

En la mayoría de los empaques de nuestra provincia, luego de la cosecha y del transporte de la fruta al empaque, su procesamiento se divide en dos etapas:

- **Preselección:** consiste en el descarte de frutos que no se encuentran dentro de los parámetros de calidad para su exportación como fruta fresca, principalmente en cuanto a tamaño, color y forma. La fruta aceptada se clasifica según tonos de color: la que está en el punto adecuado sigue la vía de empaque y la que aún está verde se dirige al proceso de desverdizado. La fruta descartada es destinada a la industria y no recibe tratamiento químico.

- **Empaque:** en esta etapa se realiza el acondicionamiento de la fruta para que mantenga sus atributos hasta llegar al consumidor. Se aplican fungicidas y cera para evitar pudriciones y deshidratación.

Con ciertas variantes según cada planta de empaque, el procesamiento general es el siguiente:

Identificación, volcado de “bins” y descarga de la fruta: se vuelca el bin (cajón contenedor) en una pileta con agua clorada (NaClO 200 ppm), cuya concentración se mantiene en forma automática y se renueva cada 8 h.

Descarte manual, enjuague y escurrido: se descartan las frutas en mal estado, se enjuaga con agua y se escurre por ventilación sobre cepillos. También se separa la fruta demasiado pequeña, grande o de forma anómala y se envía a la industria.

Aplicación de químicos: se aplican productos de acción fungicida contra infecciones causadas por hongos.

Secado de la fruta: por un sistema con “flaps” (banderas de caucho) se traslada la fruta hasta un túnel de secado donde se aplica aire caliente a 40°C durante 55 s, sobre un sistema de traslación a rodillos.

Aplicación de cera: se aplican fungicidas (IMZ, TBZ, PYR y otros) y cera mediante nebulización. Luego se realiza un secado similar al anterior.

Selección y descarte: se separa manualmente la fruta según tamaño, color y calidad. La fruta con características fuera de ciertos estándares es destinada a mercado interno.

Embalaje e identificación: la fruta seleccionada se coloca manualmente en su embalaje para la venta. Cada caja lleva un código de barras, que relaciona la fruta con el

INTRODUCCIÓN

productor, finca y lote del que proviene el “bin” lo que asegura la trazabilidad del producto.

Control de calidad: las cajas terminadas pasan a un sector de control automático donde se toman muestras aleatorias para controlar su calidad. También se toman algunas cajas que se dejan en cámaras testigo a 7°C durante 45 d para seguir la evolución del producto hasta su destino final.

Arándano

Generalidades

El arándano pertenece al género *Vaccinium*, familia *Ericaceae*. Las especies cultivadas son cuatro: *V. corymbosum* (“arándanos altos”), *V. myrtilloides* y *V. angustifolium* (“arándanos bajos”) y *V. ashei* (“ojos de conejo”) (Caruso y Ramsdell, 1995). Los arándanos altos están incluidos en el grupo de las “frutas finas”, denominación vinculada al aspecto comercial y no al botánico. El arándano es un arbusto perenne de hoja caduca, nativo del Hemisferio Norte. Su fruto se consume tanto fresco como procesado y se utiliza en medicina (es antioxidante, vásculo-protector, antiséptico urinario), en la industria de colorantes, en pastelería, mermeladas, conservas y golosinas, entre otros.

El fruto del arándano madura 2 o 3 meses después de la floración dependiendo de la variedad, condiciones climáticas y vigor de las plantas. Es una baya de forma casi esférica de sabor dulce y ácido a la vez. Puede contener entre 20 y 100 semillas, su tamaño varía de 1 a 2 cm de diámetro, y su color desde azul claro hasta negro (**Figura 8**). El epicarpio del fruto está recubierto de secreciones cerosas que constituyen una capa conocida como “pruina”. Esta capa no debe ser afectada al manipular el arándano ya que tiene efectos beneficiosos para su conservación, le confiere una terminación atractiva y constituye un importante parámetro de calidad (de Sebastián Palomares, 2011).

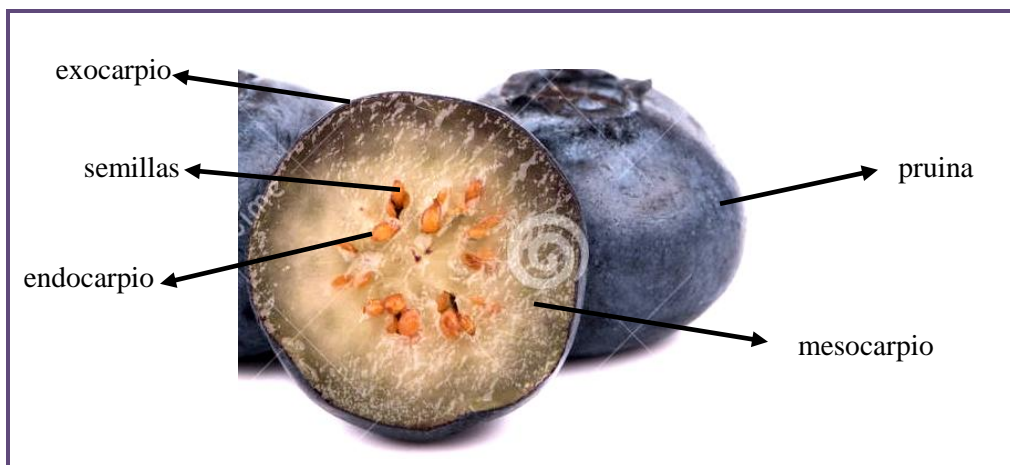


Figura 8. Estructura del fruto de arándano.
Corte transversal del fruto.

El arándano es un fruto bajo en calorías y sodio, y contiene fibras, pectinas y vitamina C. Los frutos verdes tienen aproximadamente un 6% de azúcares y las frutas maduras, un 15%. El tamaño de los frutos aumenta un 35% luego de la adquisición del color azulado, debido al movimiento de agua hacia los mismos (Pritts y col., 1992).

El valor nutricional del arándano se resume en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Valor nutricional (VN) del arándano

VN del arándano en 100 g de sustancia comestible	
Calorías (Kcal)	30,1
Agua (g)	85
Proteínas (g)	0,7
Lípidos (g)	0,6
Fibra (g)	4,9
Carbohidratos (g)	6
Vitamina A (mcg)	12
Vitamina C (mg)	17
Vitamina E (mg)	5
Vitamina K (mg)	12
Ácido fólico (µg)	10
Betacaroteno (mg)	32
Folato (mg)	6
Magnesio (mg)	6
Hierro (mg)	0,74
Colesterol (mg)	0
Sodio (mg)	1
Potasio (mg)	88
Calcio (mg)	10

Extraído de Alimentos Argentinos (<http://alimentos.org.es/arandanos>).

El arándano es considerado el “superfruto” debido a las múltiples propiedades nutricionales antes mencionadas, y a que es refrescante, tónico, astringente y diurético. El color de los arándanos es causado por un grupo de flavonoides de alto poder antioxidante llamados antocianinas. Muchos reportes atribuyen los efectos benéficos del fruto a estos compuestos, relacionando su presencia con la prevención de enfermedades crónicas que incluyen trastornos cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, diabetes y cáncer (Liu, 2013, Routray y Orsat, 2011, Szajdek y Borowska, 2008).

El cultivo del arándano

Cada variedad de arándano tiene un requerimiento de horas de frío particular, es decir, el número de horas con temperaturas menores a 7°C necesarias para romper el receso invernal y permitir el crecimiento vigoroso de las yemas vegetativas y el correcto desarrollo de las yemas reproductivas. Esta particularidad es la que define las variedades aptas para una región según su latitud geográfica (Undurraga y Vargas, 2013).

Los arándanos altos de bajo requerimiento de frío comprenden variedades que requieren entre 100 y 400 h de frío, lo que permite su cultivo en latitudes bajas como ser el norte de Argentina, Chile, México y Perú (Heredia, 2015). Las variedades de arándanos cultivadas actualmente en Argentina son O’Neal, Misty, Biloxi, Blue Crisp, Millenia, Emereald, Jewel, Star, Springhigh, Primadonna, Snowchaser, Abundance, Sweet Crisp, San Joaquín, Farthing, Scintilla y Rebel. Presentan buena calidad de fruta y son de maduración temprana. Muchas de ellas tienen la ventaja de no tener derechos de propiedad y pueden ser cultivadas porque fueron recientemente liberadas de los programas de mejoramiento genético de la Universidad de Florida y de la Universidad de Georgia (Rivadeneira y Kirschbaum, 2010, Undurraga y Vargas, 2013).

Aspectos económicos de la producción de arándanos

En el mundo hay plantadas 93577 ha de arándanos, de las cuales el 53% se encuentra en América del Norte, el 19% en América del Sur, el 10% en Europa y el 18% en Asia. El principal país consumidor de arándanos es Estados Unidos, que es al mismo tiempo el mayor productor e importador. Chile es el segundo país productor en el mundo y Argentina se encuentra en el sexto lugar. La producción por países en el año 2016 se muestra en la

*Tabla 4.***Tabla 4.** Principales países productores de arándanos en 2016

País	2016		
	Fresco	Procesado	Total
EEUU	133,1	123,5	256,6
Chile	91,4	33,9	125,3
Canadá	22,7	49,9	72,6
España	28,0	2,0	30,0
China	20,0	8,0	28,0
Argentina	14,9	3,0	17,9
Polonia	15,0	1,0	16,0
Perú	15,4	0,4	15,8
México	16,5	0,6	17,1
Marruecos	11,4	0,3	11,7
Total mundial	425,5	229,5	655

Se muestra la producción de arándano fresco, procesado y total en 2016, por país, en miles de tn. Fuente: IBO (2017)

El cultivo de arándano en el hemisferio sur tiene la ventaja de que la mayor parte de la producción se inicia en octubre, precisamente cuando el hemisferio norte terminó la cosecha y carece de frutos. Empleando variedades tempranas, los países australes tienen la posibilidad de insertar sus frutos a un precio muy competitivo (Heredia, 2015).

La producción de arándanos es una actividad relativamente nueva en Argentina. Su difusión se inició a inicios de la década del 90. Sin embargo, toma real importancia al habilitarse el ingreso de fruta nacional a Estados Unidos en 1994 (Fabiani y col., 2001). En los últimos años, la producción argentina se ha incrementado, con una variación positiva del 12% entre las temporadas 2015 y 2016.

El cultivo está distribuido en numerosas provincias, entre las que destacan Buenos Aires, Entre Ríos y Tucumán, provincias que concentran más del 90% de la superficie

nacional plantada. La región NOA es poseedora del 47% de la superficie productiva de arándanos del país, ubicándose la mayor parte en Tucumán (APRATUC, 2017a).

La producción de arándanos en Tucumán

Con un crecimiento positivo y sostenido, la provincia de Tucumán pasó de exportar 132 tn en 2006 a 5440 tn en 2016. La **Figura 9** muestra la evolución del cultivo, en la que se observa una caída en las exportaciones en el año 2015. Esta reducción se debió a un fuerte recambio varietal por el que optaron los productores locales a fin de plantar variedades más tempranas comparadas con las que trabajaban hasta 2014. En 2016 el volumen de exportaciones se recuperó. La producción de ese año demandó el envío de 78 vuelos de carga llevando el 97% de la producción a países boreales, mientras que el 3% restante se envió mediante transporte marítimo (APRATUC, 2017a).

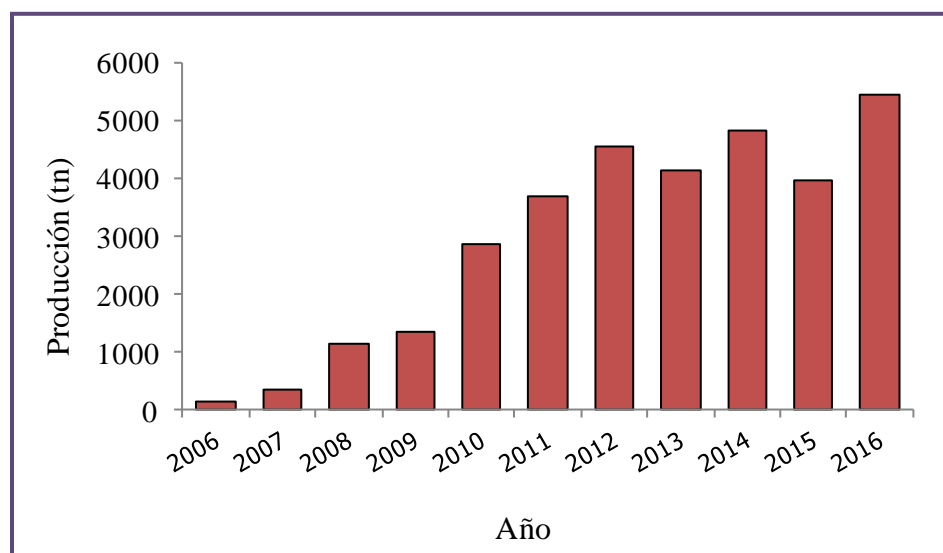


Figura 9. Evolución de la producción de arándanos en Tucumán.
Se muestra la producción de arándanos en tn durante el periodo 2006-2016.

Hasta 2016, el transporte de arándanos se realizó en forma casi exclusiva mediante vuelos directos de Tucumán a Estados Unidos y Europa. Este tipo de transporte se justifica cuando el precio del arándano es elevado, cuando es óptima la calidad de las bayas y cuando se están cosechando variedades que perecen rápidamente. Sin embargo, debido a la gran diferencia que existe entre los costos de transporte aéreo y marítimo, los productores

locales consideran que a partir de la campaña 2017 el porcentaje de fruta enviada por barco aumentará notablemente. Esto permitiría bajar los costos de producción y darle mayor rentabilidad a la actividad (APRATUC, 2017a). Otra estrategia que deben plantearse los exportadores tucumanos es la apertura a nuevos mercados, entre los que se encuentra China. El país asiático conlleva el inconveniente de alargar aún más el periodo de tránsito de la producción argentina hasta su destino final. Sin embargo, constituye un destino capaz de absorber grandes volúmenes de arándanos en contraestación. Por esto, el Comité Argentino de Arándanos inició tratativas para poner en marcha este canal comercial (APRATUC, 2017b).

Procesamiento del arándano

Las etapas del procesamiento del arándano son:

Cosecha: la recolección se realiza en forma manual y selectivamente en base al índice de madurez de la fruta.

Recepción y pre-enfriado: al llegar al empaque, la fruta se pesa y se envía a una cámara de pre-frío para quitar el calor que trae del campo, reduciendo su temperatura hasta 0-1°C en menos de 1 h (Deflippi y col., 2013). Esta reducción de temperatura prolonga la vida útil de los frutos y reduce la incidencia de microorganismos deteriorantes.

Descarte, clasificación y envasado: la fruta pasa por una cinta de selección donde los operarios descartan arándanos que no cumplen con ciertos requisitos de calidad. Luego, la fruta se envasa en cajas reciclables o “clamshells” (de 170 g para EEUU y de 125 g para mercados europeos), las cuales se colocan en cajas de cartón y, finalmente, se apilan formando *pallets* (**Figura 10**).

Fumigación con bromuro de metilo: este procedimiento se aplica únicamente para arándanos destinados a EEUU, dado que el país norteamericano se declara libre de la mosca de la fruta (*Ceratitis capitata* y *Anastrepha fraterculus*). La fruta ya envasada recibe un tratamiento cuarentenario con bromuro de metilo durante 5 h a 21°C.

Almacenamiento: la fruta se mantiene en una cámara frigorífica hasta ser despachada. La temperatura de almacenamiento es de entre -0,6 y 0°C con una HR del 95%, la que se consigue con un humidificador.



Figura 10. *Pallet* con cajas de arándanos embaladas para exportación en cámara de frío.

Problemática relacionada con la comercialización del limón y del arándano: enfermedades y su control

Los frutos se encuentran en contacto con microorganismos a lo largo de todos los eslabones de la cadena de producción, la cual abarca desde el campo hasta el consumidor final. Durante este proceso, el producto puede contaminarse con patógenos humanos y/o infectarse por microorganismos fitopatógenos (Crisosto y col., 2003, Deflippi y col., 2013).

Como consecuencia del elevado crecimiento de las industrias limonera y arandanera en nuestra región, la densidad de los cultivos se ha incrementado significativamente. Este aumento conduce a un crecimiento deficiente de los árboles y arbustos, lo que deja a los frutos potencialmente desprotegidos ante posibles golpes y heridas. Por otro lado, las condiciones ambientales que se registran durante el período de fructificación y crecimiento de los frutos generan zonas húmedas persistentes en el campo. En conjunto, este escenario es ideal para el desarrollo de enfermedades que pueden afectar tanto a las plantas en el campo como a los frutos poscosecha (Crisosto y col., 2003, Deflippi y col., 2013).

La aplicación de Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura (BPA y BPM) durante las operaciones de cultivo, cosecha, selección, embalaje, almacenamiento y transporte de la fruta es fundamental para prevenir o minimizar todo tipo de contaminaciones. (ASOEX, 2012, Manual de Formación para Instructores, 2002).

Enfermedades poscosecha y cuarentenarias

Las agencias internacionales que monitorean los recursos mundiales de alimentos reconocieron que una de las formas más eficaces para solventar la necesidad de alimentos del futuro es la reducción de las pérdidas poscosecha (Eckert y Eaks, 1989), las cuales representan entre un 5 y un 10% del total de pérdidas en frutas y hortalizas en los países en desarrollo (FAO, 2012). Una importante causa de las pérdidas poscosecha son las enfermedades causadas por hongos. Estas patologías son muy variables en función de las especies y variedades que se utilizan y de la zona productora. Además, las condiciones climáticas, forma de recolección, manejo poscosecha y condiciones de conservación de la producción influyen significativamente (FAO, 2012).

Entre los problemas fitosanitarios poscosecha más importantes que presenta el limón se encuentra la podredumbre producida por *Penicillium digitatum* (*P. digitatum*) agente causal del moho verde. *Penicillium italicum* (*P. italicum*) y *Geotrichum citri aurantii* (*G. citri aurantii*), hongos causantes de las podredumbres azul y amarga, respectivamente, son también importantes, aunque sus incidencias suelen ser significativamente inferiores a las de *P. digitatum*. Con respecto al arándano, las podredumbres poscosecha causadas por *Botrytis cinerea* (*B. cinerea*) y *Alternaria tenuissima* (*A. tenuissima*) son las de mayor incidencia. *B. cinerea* es un patógeno particularmente complicado debido a que puede crecer aun a las bajas temperaturas de almacenamiento del arándano y es capaz de infectar más de 200 especies vegetales. Los arándanos también son susceptibles a la infección por muchos otros patógenos entre los que se encuentran *Colletotrichum* spp., *Cladosporium herbarum*, *Stemphylium botryosum* y *Rhizopus stolonifer* (Hongn y col., 2011, Pitt y Hocking, 1997, Smilanick y col., 2002, Wright y col., 2005).

- *Podredumbre verde*

La podredumbre verde es la enfermedad fúngica de poscosecha que genera las mayores pérdidas económicas para la producción de cítricos a nivel global (Palou y col., 2002). En Tucumán, es causante de hasta el 80% de las podredumbres de los frutos (Farias y col., 2016). *Penicillium digitatum*, su agente causal, es un patógeno necrotrófico estricto de heridas capaz de infectar frutos cuya piel se encuentra lastimada por el roce con espinas

y por la manipulación de la fruta durante la cosecha (tijeras, clavos o astillas en los *bins*) (Eckert y Eaks, 1989).

El género *Penicillium* pertenece a la Clase *Deuteromycetes* del Reino *Fungi*. *P. digitatum* es una especie filamentosa, con hifas septadas, cuyo poro de comunicación no es visible al microscopio óptico. Las conidias o esporas asexuales se forman a partir de los extremos de un conidióforo poliverticilado de paredes lisas, semejante a un pincel, que termina en métulas, sobre las que posan las células conidiógenas o fiálides (**Figura 11A**). Las conidias son externas, esféricas o elipsoidales, unicelulares, hialinas y concatenadas (**Figura 11B**) (Carrillo, 2003). La conidiogénesis de este patógeno es moderada a fuerte, con conidias verde grisáceo u oliváceo, lo que puede observarse tanto en placa de *Petri* como en frutos infectados (**Figura 11C y D**). *In vitro*, las colonias de *P. digitatum* son planas, con márgenes frecuentemente irregulares, alcanzan entre 4 y 5 cm de diámetro a los 7 días (Pitt y Hocking, 1997).

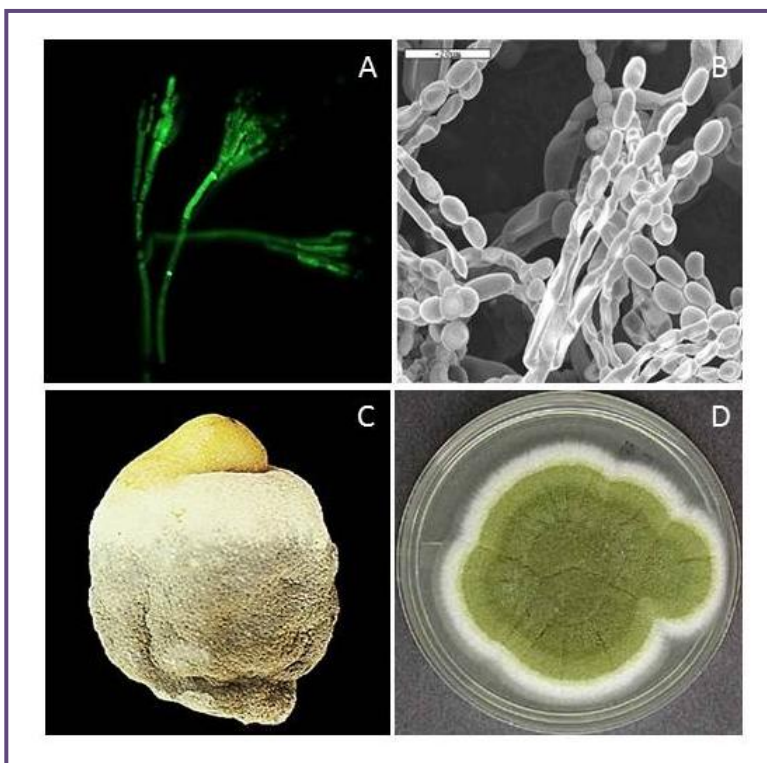


Figura 11. Morfología y aspecto de *P. digitatum*

A. Microscopía de fluorescencia de conidióforos. **B.** Microscopía electrónica de barrido de conidias unidas al conidióforo. **C.** Aspecto del patógeno colonizando un limón. **D.** Aspecto de la colonia *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

El ciclo reproductivo de *P. digitatum* es asexual y se observa en la **Figura 12**. El talo micelial del hongo se diferencia en conidióforos. Las conidias originadas por las fiálides son dispersadas por el agua, el viento y los insectos. Una vez que se depositan en un sustrato vegetal, germinan dando lugar a hifas vegetativas, reiniciando el ciclo.

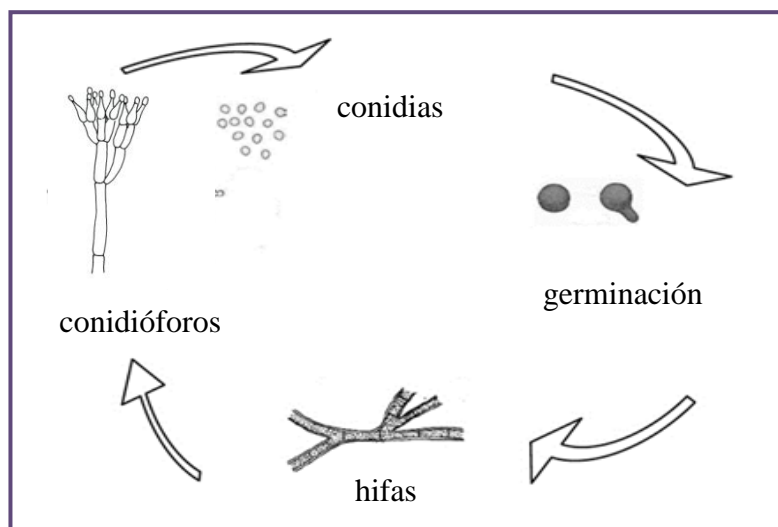


Figura 12. Ciclo biológico de *P. digitatum*. Se muestran el ciclo biológico (asexual) del hongo, con sus estructuras fúngicas típicas.

Las conidias de *P. digitatum* son abundantes en la atmósfera y en las superficies de frutas y pueden ser diseminadas por corrientes de aire y de agua. La cosecha en condiciones de humedad acelera el desarrollo de este moho (Palacios, 2005). Si bien, es considerada una enfermedad poscosecha, puede manifestarse además en frutas precosecha (**Figura 13A y B**).



Figura 13. Limones afectados por podredumbre verde. A) en cajones en el empaque; B) en el limonero.

- *Podredumbre gris*

Botrytis cinerea (forma anamórfica) o *Botryotinia fuckeliana* (forma teleomórfica) es un patógeno fúngico muy importante debido a su capacidad de realizar su ciclo infeccioso sobre las plantas causando la enfermedad conocida como podredumbre gris, y a su naturaleza saprófita que le permite vivir sobre material vegetal senescente, muerto o previamente infectado por otros patógenos (Staats y van Kan, 2012). *B. cinerea* pertenece al reino *Fungi*, filo *Ascomycota*, clase *Leotiomycetes*, familia *Sclerotiniaceae* y género *Botryotinia*. Este hongo se caracteriza por presentar micelio gris (**Figura 14A, B y D**) con hifas cilíndricas y tabicadas, conidióforos largos y ramificados que producen grupos de macroconidias ovoides o esféricas unicelulares hialinas o levemente coloreadas (**Figura 14C**). La principal característica de estas estructuras es su semejanza a un racimo de uvas. El patógeno también presenta otras estructuras, como ser microconidias, clamidosporas, apotecios, esclerocios y ascosporas (Elad y col., 2007).

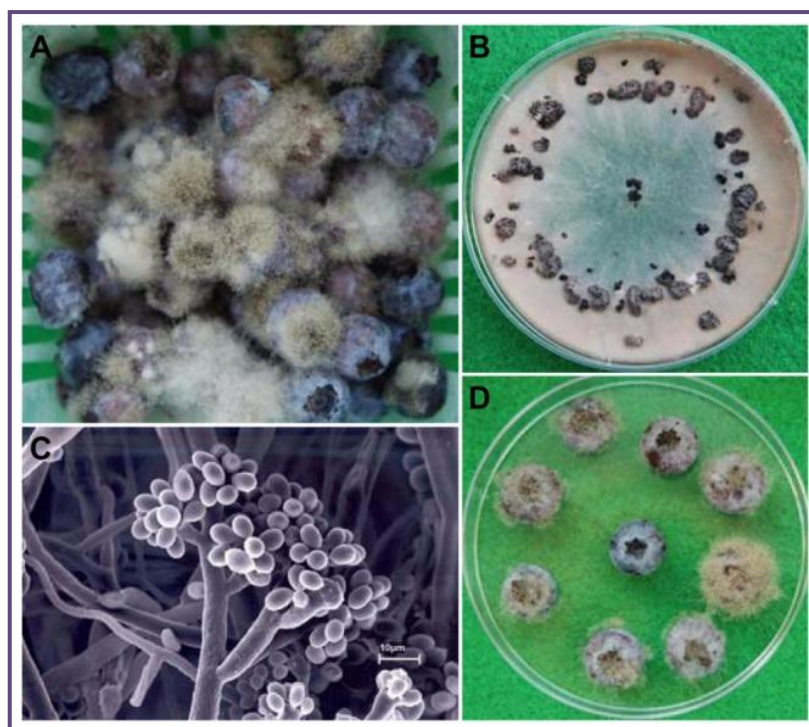


Figura 14. Aspecto macroscópico y morfología celular de *B. cinerea*.
A. *Clamshell* con arándanos afectados principalmente por podredumbre gris. **B.** Aspecto de la colonia crecida en medio de cultivo APG. Las aglomeraciones negras corresponden a esclerocios. **C.** Microscopía electrónica de barrido de conidióforos y conidias. **D.** Arándanos infectados *in vitro* con aislamientos de *B. cinerea*.

La reproducción de *B. cinerea* puede ser sexual o asexual (**Figura 15**):

El *ciclo sexual del hongo* se da por copulación gametangial heterotálica. Esto implica la fecundación del cuerpo ascógeno por parte de los microconidios (que actúan como gametos masculinos) de cepas que sean sexualmente compatibles entre sí, a partir de la cual se desarrolla el apotecio o esporofito.

El *estado asexual o imperfecto* es el más frecuente en este patógeno. Se caracteriza por la proliferación de hifas sobre el sustrato que coloniza, hasta dar lugar a la formación de micelio. De este último surgen los macroconidióforos que dan lugar a las macroconidias o conidas, las que al entrar en contacto con el sustrato en condiciones adecuadas, germinan para dar lugar a nuevo micelio (Elad y col., 2007).

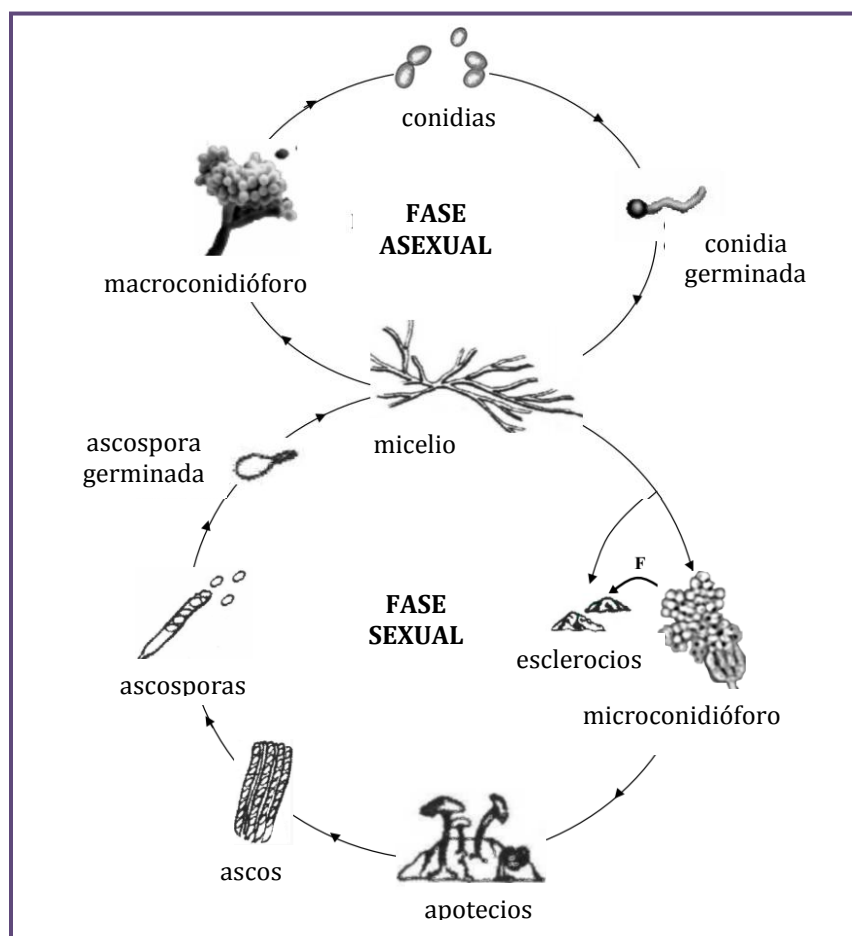


Figura 15. Ciclo biológico de *B. cinerea*.

Se muestran las fases sexual y asexual del hongo, con las estructuras fúngicas típicas del ciclo. F: fecundación.

B. cinerea es un hongo necrotrófico capaz de infectar al menos 235 especies de plantas

distintas, incluyendo un rango de cultivos agrónomicamente importantes como frutas finas, manzanas, peras, tomates, pepinos, flores y plantas ornamentales (O'Neill y col., 1997). En cada uno de estos cultivos y bajo condiciones de humedad relativamente alta, la podredumbre gris puede afectar a frutos, flores, tallos, plántulas, hojas, bulbos, raíces y semillas. Además, el ataque no sólo se produce sobre cultivos en el campo o en invernaderos, donde el hongo destruye rápidamente los tejidos y coloniza la planta, sino que también provoca enfermedades poscosecha, comenzando con una infección latente en el campo y desarrollándose posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (Coley-Smith y col., 1980). Este hongo supone un peligro de relevancia, ya que es capaz de desarrollarse en regiones de clima templado, en áreas secas y desérticas (Yunis & Elad, 1989) y en zonas frías (Anderson, 1924). Se estima que el 20% de las cosechas a nivel mundial están afectadas por *B. cinerea*, lo que se traduce en un coste de 10 a 100 billones de euros al año (Carbú Espinosa, 2006).

Tratamientos poscosecha de frutos

Existen varios métodos para reducir la carga microbiana de los frutos durante su procesamiento poscosecha. Cada tratamiento tiene sus ventajas y desventajas, dependiendo tanto del tipo y destino del producto como del modo de aplicación.

Convencionales

- *Fungicidas*

Actualmente son el sistema más utilizado para el control de las podredumbres fúngicas. En general estos métodos se basan en el uso de sustancias antifúngicas de síntesis química.

En los países importadores, los fungicidas autorizados tienen fijado un Límite Máximo de Residuos (LMR) determinado según criterios toxicológicos (para proteger la salud del consumidor) y agrónomicos (según las Buenas Prácticas Agrícolas). Esto es de vital importancia en la producción de limones y de arándanos ya que gran parte de la producción se destina a la exportación. Existen numerosas discrepancias en las legislaciones sobre productos autorizados y la tolerancia de residuos de los principales

mercados de destino (Unión Europea y Estados Unidos). Por lo tanto, durante el manejo de la producción es necesario seguir los protocolos y cumplir con las exigencias que demanda el comprador (USDA, 2017).

En la etapa poscosecha de cítricos, los fungicidas autorizados son imazalil (IMZ), ortofenilfenato de sodio (SOOP), fludioxonil (FLU), azoxistrobin, metiltiofanato, miclobutanil, procloraz, pyraclostrobin, pyrimetanil, ortofenilfenol, procloraz y tiabendazol (TBZ), entre otros (Montesanto, 2017). Estos fungicidas, en general, se aplican en conjunto con compuestos clorados como el hipoclorito o el dióxido de cloro (FDA, 2001). Las técnicas más usadas para la aplicación de estos fungicidas son la inmersión y la aspersión, ya que con ellas se consigue una buena distribución del producto (Holmes y Eckert, 1995).

Con respecto al arándano, la aplicación de fungicidas en poscosecha está aún en etapa experimental en Argentina. Se ha demostrado que la aplicación de ciertos ingredientes activos a concentraciones inferiores a sus LMR permitidos tiene un considerable efecto en el control de podredumbres poscosecha. Los tratamientos ensayados consisten en aplicaciones en cámaras de almacenamiento (en forma de gas) o aplicaciones líquidas en la línea de selección (mediante aspersión). En este último caso, la aplicación del fungicida fludioxonil mediante un sistema de aspersión sobre los frutos resultó en una considerable disminución de la incidencia de podredumbres (Heredia, 2015).

En general, los tratamientos poscosecha con fungicidas apuntan a una acción curativa sobre infecciones preexistentes y a una acción preventiva contra nuevas infecciones que puedan ocurrir después del tratamiento en el empaque. Además, muchos compuestos tienen acción antiesporulante, lo que reduce la fuente de inóculo e interrumpe el ciclo de infección.

No convencionales

Estos métodos consisten en estrategias físicas, químicas y biológicas para el control de podredumbres. Sin embargo, con esta metodología se suele controlar parcialmente las enfermedades, por lo que no puede sustituir a los fungicidas sintéticos. Por este motivo, los métodos no convencionales son menos utilizados que los compuestos de síntesis química.

De acuerdo con su naturaleza, los métodos de control alternativos pueden ser físicos, biológicos o químicos.

- *Métodos físicos*

Entre los tratamientos físicos encontramos los tratamientos térmicos, la irradiación y la remoción mecánica.

El calor, dentro de ciertos límites, estimula los mecanismos de defensa natural propios del fruto activando la síntesis de lignina y otras sustancias, como las fitoalexinas, que inhiben el desarrollo de los hongos. Los tratamientos térmicos se realizan solos o en combinación con sustancias químicas de baja toxicidad (Cerioni y col., 2013b, Palou y col., 2002). Estudios recientes demostraron la eficacia de baños con agua caliente en el control de las podredumbres verde, azul y gris (Marquenie y col., 2002, Pan y col., 2004).

El uso de radiación UV como tratamiento poscosecha ha sido estudiado para numerosos frutos debido a que no deja residuos químicos (Ruiz y col., 2016, Ruiz y col., 2017, Zoratti y col., 2014). Es un proceso simple, seco y de bajo costo de mantenimiento (Bachmann, 1975, Morgan, 1989). Se ha demostrado que la aplicación de luz UV sobre productos frescos es capaz de controlar podredumbres causadas por *B. cinerea* y por *P. digitatum*, retrasar la senescencia, mantener la calidad y prolongar la vida útil de los productos (Marquenie y col., 2003, Marquenie y col., 2002, Ruiz y col., 2017). Además, diversos autores reportaron que este tipo de radiación es capaz de inducir las defensas naturales de los frutos. Esto se explica por la activación de la vía fenilalanina amonio liasa (PAL) cuyo papel es clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos con actividad antifúngica (Cote y col., 2013, Ensminger, 1993, Johann y col., 2007, Nguyen y col., 2014, Ruiz y col., 2016).

- *Métodos biológicos*

La utilización de microorganismos antagónicos presentes de forma natural en el entorno del fruto es otra alternativa para el control de las enfermedades poscosecha. Estos microorganismos deben cumplir una serie de requisitos: *a*) no ser perjudiciales para los frutos ni para el hombre, *b*) ser capaces de controlar un amplio espectro de patógenos actuando a bajos inóculos y *c*) sus metabolitos deben ser inocuos para la salud humana y animal.

Los principales géneros microbianos que han mostrado potencial para el control de las podredumbres verde y gris incluyen los hongos filamentosos *Trichoderma*, *Gliocladium* y

Ulocladium, las bacterias *Bacillus* y *Pseudomonas* y las levaduras *Pichia* y *Candida* (Elad y col., 2007, Metz y col., 2002, Sharma y col., 2009).

- *Métodos químicos*

Consisten en la aplicación de sustancias químicas que presentan muy baja toxicidad para los humanos y el medio ambiente, pero son efectivos contra algunos microorganismos. Estas sustancias pueden ser extractos de plantas, aceites esenciales, ácido acético, peróxido de hidrógeno, sales de carbonato y bicarbonato, sorbatos y propionatos, entre otros. Muchos de estos compuestos están siendo intensamente estudiadas en el control de podredumbres poscosecha (Cerioni y col., 2013b, D'Aquino y col., 2013b). Por lo general se trata de sustancias cuya acción fungicida es limitada. El beneficio de su aplicación radica en que pueden aplicarse en combinación con los fungicidas comerciales a fin de disminuir las dosis necesarias de estos últimos.

Problemática asociada al uso de fungicidas

La aplicación de fungicidas sintéticos en poscosecha es el procedimiento más extendido en la mayoría de los empaques de fruta fresca debido a su alta eficiencia en el control de podredumbres. Sin embargo, en los últimos años ha surgido un nuevo concepto de calidad. Los consumidores han tomado conciencia acerca del peligro que representa el uso de ciertos compuestos para el medio ambiente y para la salud humana y animal. Así, el comprador ya no repara solamente en la estética del producto, sino que exige que el mismo esté libre de residuos tóxicos. Como consecuencia, la presencia de residuos de fungicidas en los productos agrícolas surge como una barrera no arancelaria cada vez más estricta durante su comercialización. Los países importadores reconsideran periódicamente los valores de los LMR, exigiendo cada vez menores niveles de fungicidas en las frutas.

Otro inconveniente asociado al uso intensivo de fungicidas es la aparición de cepas de hongos fitopatógenos resistentes. Tanto en el campo como en los empaques comerciales, se han encontrado aislados fúngicos con doble y hasta triple resistencia a fungicidas, lo que compromete seriamente la eficacia de los tratamientos (Avenot y Michailides, 2010, Ballester y col., 2010, D'Aquino y col., 2013a, Kretschmer y col., 2009).

β -carbolinas (β Cs)

Las β Cs comprenden una clase de alcaloides naturales y sintéticos que están ampliamente distribuidos en plantas, alimentos, criaturas marinas, insectos, mamíferos y seres humanos, entre otros. Son un gran grupo de compuestos heterocíclicos que originalmente se aislaron de *Peganum harmala* (Zygophyllaceae, Rue Siria), y cuya unidad estructural es el 9H-pirido [3,4-b] indol (**Figura 16**). Actualmente, cobran cada vez más interés debido a que se ha reportado que tienen actividad antitumoral, antiviral, antibacteriana y antiparasitaria (Alomar y col., 2013, Cao y col., 2007).

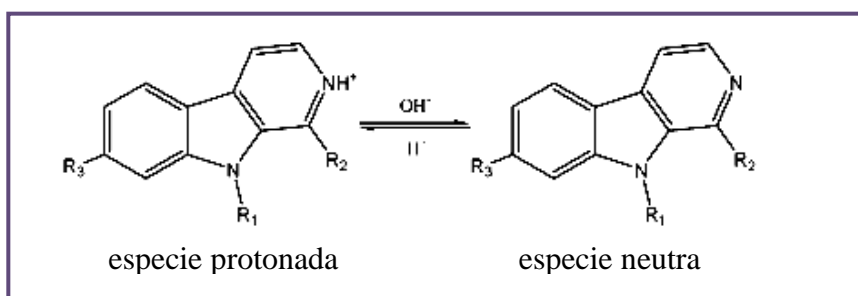


Figura 16. Estructura química base de las β Cs.

La actividad antimicrobiana de las β Cs ha sido estudiada contra una amplia variedad de organismos. Por ejemplo, el norharmano mostró efecto inhibitor sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Metarhizium anisopliae* y *Aspergillus nomius* (Chouvenc y col., 2008, Volk y Furkert, 2006, Xing y col., 2012); la harmalina inhibe el crecimiento de *Candida albicans* y *S. aureus* (Schmeller y Wink, 1998); harmol es activo contra *Trypanosoma cruzi* (Rivas y col., 1999); y el norharmano, harmano y harmina actúan contra *Toxoplasma gondii* (Alomar y col., 2013).

Polihexametilen guanidina (PHMG)

El PHMG es un polímero miembro de la familia de los polímeros de guanidina (**Figura 17**) que ha recibido gran atención como desinfectante para múltiples propósitos. En la actualidad, se utiliza como antiséptico para evitar infecciones oculares (Das y col., 2010), en la impregnación de telas para evitar el crecimiento microbiano (Cazzaniga y col.,

2002), en tratamientos de agua (Kusnetsov y col., 1997) y para la desinfección de diversas superficies sólidas (Allen y col., 2006). Se ha encontrado que PHMG tiene actividad antimicrobiana *in vitro* contra bacterias y hongos (Allen y col., 2006, Kratzer y col., 2006, Razzaghi-Abyaneh y col., 2006). Sin embargo, hay pocos informes sobre su efecto antimicrobiano contra los agentes causales de las enfermedades poscosecha en los productos agrícolas (Feng y col., 2011, Razzaghi-Abyaneh y col., 2006).

Estudios toxicológicos recientes realizados en animales de experimentación han revelado que Akacid plus®, un desinfectante comercial a base de polímeros de guanidinas, es un compuesto seguro con baja toxicidad oral y dérmica (Buxbaum y col., 2006).

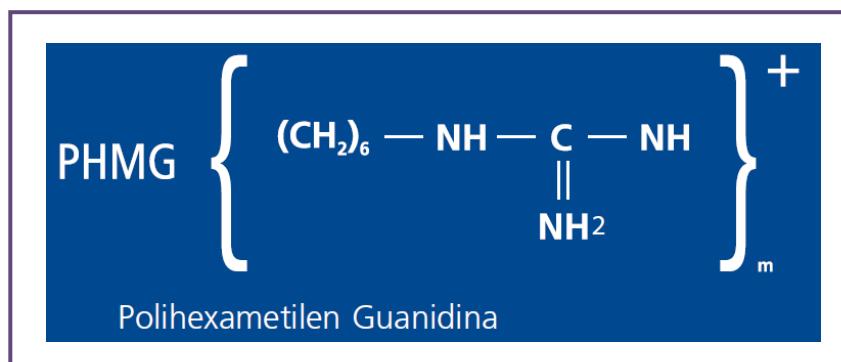


Figura 17. Estructura química del PHMG.

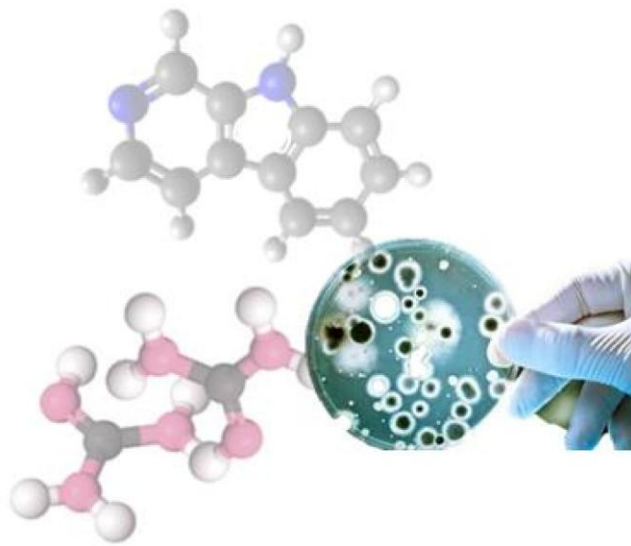
Antecedentes del grupo de trabajo

Nuestro grupo de trabajo está dedicado al desarrollo de estrategias alternativas de alta eficiencia para el control de podredumbres poscosecha, reduciendo el impacto ambiental y los residuos sobre las frutas, mejorando la aceptabilidad de mercados importadores y generando soluciones económicamente viables para los productores locales. En este marco se han estudiado y desarrollado estrategias de control utilizando compuestos oxidantes (Cerioni y col., 2009, Cerioni y col., 2010), sales de baja toxicidad (Cerioni y col., 2013a), calor (Cerioni y col., 2013b) y radiación UV-B (Ruiz y col., 2016, Ruiz y col., 2017), las cuales demostraron eficiencia en el control de enfermedades poscosecha tanto *in vitro* como *in vivo*. Para continuar aportando herramientas alternativas al control de las podredumbres

poscosecha en frutos de interés regional, en este trabajo de tesis se planteó como objetivo general estudiar la actividad antimicrobiana y el mecanismo de acción de compuestos químicos sobre hongos fitopatógenos causantes de enfermedades poscosecha.

- Los objetivos específicos fueron:

- ✓ Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de las β -carbolicinas (β Cs) sobre hongos fitopatógenos.
- ✓ Estudiar la morfología, el estado fisiológico y la infectividad de las conidias luego de los tratamientos que resultaron efectivos.
- ✓ Determinar el efecto de la fotoactivación con UV-A sobre la acción antimicrobiana de β Cs.
- ✓ Caracterizar *in vitro* e *in vivo* la actividad antifúngica de polihexametilen guandina (PHMG) sobre hongos fitopatógenos.



MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos utilizados en este estudio: aislamiento, caracterización e identificación de hongos

En este trabajo de Tesis se utilizaron dos aislados de hongos fitopatógenos:

- *P. digitatum*, obtenido a partir de un limón naturalmente infectado (Cerioni y col., 2009) y depositado como “PD-A” en la colección de cepas fúngicas de INSIBIO.

B. cinerea. Se obtuvieron siete aislamientos a partir de frutas finas (arándanos y frutillas) cosechadas en fincas ubicadas en Famaillá (Tucumán, Argentina). Todos los aislamientos se depositaron en la colección de cepas fúngicas de INSIBIO. Para la realización de los ensayos se eligió al aislado más virulento en frutos de arándano y se lo depositó como B01 en una colección propia de hongos.

- Se utilizó además la cepa “B05.10” como cepa de referencia para *B. cinerea*. Esta cepa fue cedida por el Laboratorio de Fitopatología Molecular de la Fundación Pablo Cassará (CABA, Buenos Aires, Argentina).

Para mantener la capacidad infectiva de los aislados, se realizaron pasajes por fruta cada 3 meses, inoculando limones con *P. digitatum* y arándanos con *B. cinerea*. Luego, a partir de las frutas enfermas, se realizaron nuevos aislamientos de conidias. Las suspensiones conidiales de *B. cinerea* se conservaron en leche estéril al 20% a -20°C. En estas condiciones las conidias fueron viables durante 3 años. La conservación de suspensiones conidiales de *P. digitatum* se llevó a cabo a 4°C en agua destilada, manteniéndose su viabilidad durante 6 meses.

Aislamiento e identificación de aislados de *B. cinerea*

El aislamiento de *B. cinerea* de frutas finas se realizó a partir de frutos de arándano y frutilla que no habían sido sometidos a ningún tratamiento poscosecha y que presentaban síntomas característicos de podredumbre gris. Estos frutos se incubaron en cámara húmeda (25°C y 95% HR) durante 5 d para favorecer el desarrollo fúngico sobre el tejido vegetal. Transcurrida esa incubación, se obtuvieron aislados que fueron purificándose mediante repiques sucesivos y cultivos monospóricos.

El aislado elegido para la realización de los ensayos (B01) se identificó siguiendo las claves de Pitt y Hocking (Pitt y Hocking, 1997), observándose características de la colonia

crecida en APG y detalles micro-morfológicos en el microscopio óptico (**Figura 18A y B**). Luego se realizó la confirmación de género y especie mediante técnicas moleculares, obteniéndose ADN genómico por lisis alcalina (Moller y col., 1992) a partir de micelio crecido en medio PG durante 4 d. Para ello, se utilizaron los cebadores específicos C729⁺ (5'-AGCTCGAGAGAGATCTCTGA-3') y C729⁻, (5'-CTGCAATGTTCTGCGTGGAA-3'), cuyo producto de PCR corresponde a una banda única de 750 pb que amplifica solo en *B. cinerea* (Rigotti y col., 2002). Como se observa en la **Figura 18C**, se amplificó una banda de 0,7 kb que es específica de *B. cinerea*. Esta banda fue también obtenida para B05.10, utilizada como cepa de referencia.

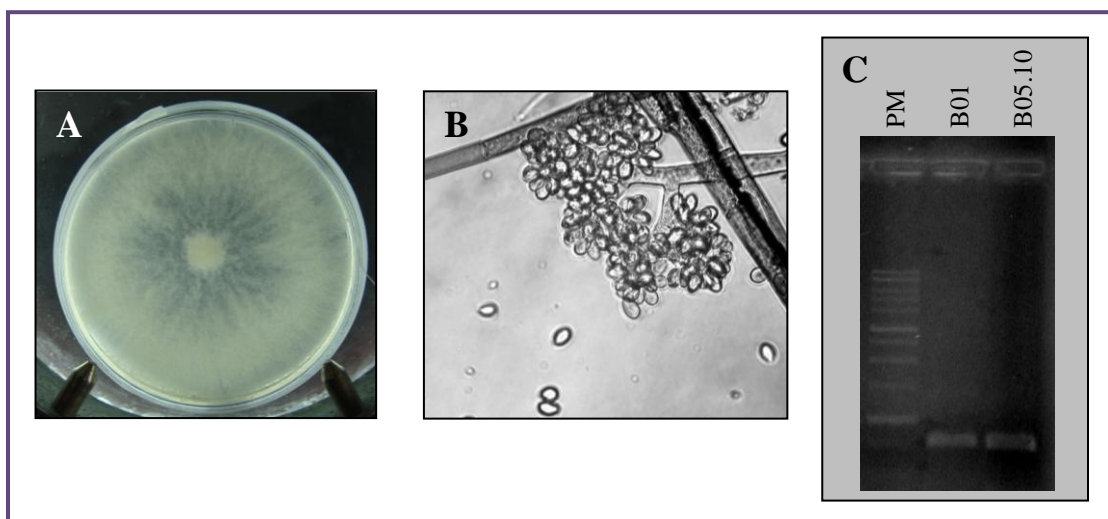


Figura 18. Identificación morfológica del aislado B01y confirmación molecular de su identidad.

A: Aspecto de la colonia del aislado de *B. cinerea* crecido en APG. **B.** Hifas septadas, conidióforos, macroconidias y microconidias observadas en microscopio óptico (40X). **C.** Fragmento de 0,7 kb, específico de *B. cinerea*, obtenido mediante PCR con los cebadores C729^{+/−}.

Reactivos

Beta carbolinas (β Cs)

Las β Cs norharmano, harmano, harmina, harmol, harmalina y harmalol (> 98% de pureza, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) se disolvieron en DMSO (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). Se determinó la concentración exacta de estas soluciones realizando barridos a longitudes de onda entre 200 y 600 nm mediante espectrofotometría UV-visible de diluciones apropiadas preparadas en agua destilada a pH 5. Para el cálculo de la

concentración de las soluciones stock se utilizaron los valores de épsilon (ϵ) reportados previamente por Alomar y col. (2013) y Gonzalez y col. (2009a). Dichas soluciones se guardaron a temperatura ambiente en oscuridad hasta su uso, durante no más de 15 d.

Polihexametilen guanidina (PHMG)

Se utilizó el producto comercial Hygisoft v20 (Diransa San Luis S.A, Argentina) cuyo ingrediente activo es PHMG al 20% (200000 ppm). Para su utilización, se diluyó el producto en agua destilada estéril.

Otros reactivos utilizados

Las soluciones de los siguientes reactivos se prepararon en DMSO:

- Diacetato de diclorofluoresceína (H_2DCFDA) (Sigma-Aldrich).
- Sytox Green (SG) (Molecular Probes).

Las soluciones de los siguientes reactivos se prepararon en agua destilada:

- Calcofluor White (CFW) (Sigma-Aldrich).
- Tween 80 (Sigma-Aldrich).
- 3,3'-diaminobencidina (Sigma Aldrich).
- Sulfato de imazalil (IMZ) (75%, Fungaflor 75SP[®], Janssen PMP).
- Graduate A+ (fludioxonil 20% + azoxistrobin 20%, Syngenta, Argentina).
- Hipoclorito de sodio ($NaClO$), solución comercial de 55 g Cl/L.
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 100 vol. (Cicarelli).
- Bicarbonato de sodio ($NaHCO_3$) (Sigma Aldrich).

Medios de cultivo

Medio líquido Papa Glucosa (PG)

-Papas (lavadas y peladas)	200g
-Glucosa	20 g
-Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Medio Agar Papa Glucosa (APG)

-Papas (lavadas y peladas)	200g
----------------------------	------

MATERIALES Y MÉTODOS

-Glucosa	20 g
-Agar	15 g
-Agua destilada c.s.p.	1000 mL

Los medios PG y APG se prepararon a partir de ingredientes naturales y son adecuados para el crecimiento de los hongos con los que se trabajó. Las papas fueron lavadas, peladas, cortadas y hervidas durante 20 min en 1000 mL de agua destilada. Se quitaron los trozos de papa y el agua de hervor se filtró. Luego se le agregó la glucosa, y en el caso del APG también agar. Se llevó a volumen final de 1 L y se esterilizó a 120°C durante 15 min. El medio resultante tiene un pH 5,5 y se guarda a temperatura ambiente.

Frutos

Los limones y arándanos que se utilizaron en esta Tesis se recolectaron de quintas comerciales en Tucumán y se almacenaron a 23°C (limones) y 5°C (arándanos) hasta su uso, durante no más de 24 h después de la cosecha. Los frutos no recibieron ningún tipo de tratamiento poscosecha.

Limones de la variedad Eureka (*C. limon*) se seleccionaron a fin de trabajar con una muestra homogénea en cuanto a tamaño y color, se desinfectaron superficialmente con etanol, se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente.

Arándanos de la variedad O'Neal (*V. corymbosum*) se cosecharon en dos etapas de madurez distinta según el ensayo a realizar: para evaluar capacidad infectiva de las conidias, se colectaron entre la caída de pétalos y la fruta verde temprana, ya que esta es la etapa más vulnerable a *B. cinerea*; para los ensayos de tratamientos poscosecha, se utilizaron arándanos en madurez comercial. Los frutos se desinfectaron superficialmente mediante su inmersión en una solución de NaClO al 2% durante 2 min, se enjuagaron con agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Tratamientos *in vitro* de hongos con compuestos químicos

Preparación de las suspensiones conidiales

Se trabajó a partir de colonias de cultivos de los hongos *P. digitatum* y *B. cinerea* crecidos en placas con APG durante 7-10 d. Las conidias se extrajeron por arrastre y se

resuspendieron en agua bidestilada estéril con Tween 80 al 0,1%. La suspensión se agitó y filtró a través de gasa estéril para retirar los restos de micelio. Realizando un recuento al microscopio en cámara de Neubauer, se ajustaron las suspensiones a una concentración de 1×10^6 conidias mL^{-1} , diluyendo en agua destilada o en medio PG, según se indica en cada ensayo. La concentración de conidias utilizada es la recomendada para la evaluación de tratamientos poscosecha (Eckert y Brown, 1986, Liu y col., 2016).

Estudio de la germinación de conidias expuestas a compuestos químicos

Las suspensiones de conidias se colocaron en los pocillos de placas de poliestireno de 96 pocillos (Orange Scientific, EEUU) y se trataron con distintas concentraciones de harmol y de PHMG, agregando alícuotas de las soluciones stock en cada pocillo. En el caso de los ensayos con β Cs, los controles consistieron en suspensiones conidiales tratadas con agua y con DMSO, ya que este solvente es el medio de dilución de las drogas. La máxima concentración de DMSO a la que se expusieron las conidias fue 2% ya que hasta esa concentración no se afecta la viabilidad. Con respecto al PHMG, los controles consistieron en suspensiones conidiales tratadas con agua estéril. En todos los casos, las placas se incubaron a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ en la oscuridad el tiempo indicado en cada experimento. La germinación se evaluó mediante observación en un microscopio invertido (Olympus IX51 equipado con una cámara digital Olympus, QColor5 (Q-imaging)) y el porcentaje de germinación se estimó contando el número de conidias germinadas por cada 300 conidias. El criterio para considerar a una conidia como germinada fue que el largo de su tubo germinativo fuera igual o mayor al diámetro de la conidia.

Estudio del efecto del pH sobre la actividad antifúngica del harmol

Las suspensiones conidiales se prepararon en solución tampón acetato de sodio – ácido acético (pH 5) o en solución tampón Tris – HCl (pH 9) y se trataron con harmol 1 mM durante 24 h. Luego de la incubación, se removió el compuesto por centrifugación a 10000 rpm durante 10 min y se resuspendió en agua destilada estéril. Se sembraron gotas de 5 μL de cada muestra en placas con APG. A la vez se realizó un recuento de UFC mL^{-1} a distintos tiempos por diseminación de diluciones seriadas en medio APG. Estas placas se

evaluaron luego de 4 d de incubación a $22\pm 1^\circ\text{C}$. Se incluyeron controles con DMSO en ausencia de harmol.

Determinación del efecto tipo fungistático o fungicida de los compuestos

Después de 24 h de exposición de las conidias a harmol y a PHMG, se evaluó su la viabilidad. Para ello, los compuestos se removieron mediante centrifugación a 10000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se reemplazó con el mismo volumen de agua destilada estéril. Las suspensiones resultantes se diluyeron en forma seriada y se diseminaron en placas con APG. Se cuantificó la viabilidad conidial haciendo recuento de UFC mL^{-1} luego de 4 d de incubación de las placas a $22\pm 1^\circ\text{C}$.

Estudio del crecimiento micelial en presencia de compuestos químicos

Suspensiones conidiales en PG se incubaron en placas multipocillo a $22\pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones estáticas durante 24 h, para permitir el desarrollo de micelio. El crecimiento producido hasta las 24 h se cuantificó mediante espectrofotometría por determinación de su densidad óptica (DO) a 420 nm en un lector de microplacas (SpectraMax Plus384, US). Luego, se agregaron los compuestos antifúngicos a ensayar en los pocillos, incluyendo controles con DMSO o agua, según corresponda. La placa se incubó durante 24 h mas y la $\text{DO}_{420\text{nm}}$ se determinó nuevamente. El crecimiento micelial en presencia de los compuestos se expresó como la diferencia entre las $\text{DO}_{420\text{nm}}$ final e inicial.

Estudio del efecto de los compuestos sobre la morfología y fisiología de las conidias

Estudios de permeabilización de la membrana conidial

La integridad de la membrana conidial se estudió mediante el seguimiento de la incorporación de la sonda fluorescente Sytox Green (SG). Cuando las células son expuestas a algún factor que aumenta la permeabilidad de sus membranas plasmáticas, esta sonda es capaz de ingresar y unirse a los ácidos nucleicos, lo que resulta en un aumento en su emisión de fluorescencia (Roth y col., 1997). Las suspensiones conidiales de *P. digitatum* y

de *B. cinerea* tratadas con los compuestos antifúngicos se incubaron durante 30 min con SG a una concentración final de 0,5 μ M en oscuridad. Luego se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus IX51) equipado con una cámara digital Olympus utilizando un filtro de luz azul correspondiente a la λ excitación y emisión de la sonda (λ_{exc} = 450-490 nm / λ_{em} = 515-565 nm).

Ensayos de integridad de la pared celular de las conidias

La integridad de la pared celular de las conidias se evaluó usando el fluoróforo Calcofluor White (CFW) (Pringle, 1991). Este compuesto es un fluorocromo inespecífico que se une a los β -1,3 and β -1,4 polisacáridos presentes en la pared celular de los hongos (Ramos y col., 2006). Al visualizarse mediante microscopía de fluorescencia, las modificaciones ultraestructurales en la pared conidial se traducen en variaciones en la intensidad o en el patrón de fluorescencia. Luego de los tratamientos de las suspensiones conidiales en condiciones letales y subletales, las células se centrifugaron, se lavaron con agua destilada y se resuspendieron al volumen original con una solución acuosa conteniendo 0,05 μ g/ mL de CFW. Las muestras se incubaron durante 15 min en la oscuridad y se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX51TF, con λ_{exc} = 330-385 nm y λ_{em} = 440 nm.

Estudio de la ultraestructura de las conidias

Las conidias fueron analizadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) luego de los tratamientos con los compuestos antifúngicos. Para ello, las conidias tratadas y sus respectivos controles se lavaron con agua destilada y se procesaron siguiendo el protocolo indicado por el Centro Integral de Microscopía Electrónica (CIME, CONICET-UNT). Las muestras se fijaron y transfirieron a una solución de tetróxido de osmio, luego se deshidrataron e incluyeron en resinas Spurr. Secciones finas, cortadas con ultramicrotomo, fueron montadas sobre grillas de cobre y observadas con un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 109.

Determinación de formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) en conidias

El contenido intracelular de ERO se determinó utilizando la sonda fluorescente diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) (Davidson y col., 1996, Halliwell y Whiteman, 2004). Esta sonda entra a las células y se acumula en el citosol donde es desacetilada por ciertas esterasas a la forma de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF). Este compuesto no fluorescente es oxidado por las ERO a diclorofluoresceína (DCF), originando un compuesto que fluoresce y emite a 525 nm cuando es excitado a 488 nm. Para realizar este estudio, las suspensiones de conidias fueron tratadas con harmol y con PHMG durante 24 h, y luego fueron lavadas y resuspendidas en el mismo volumen de agua destilada estéril. Se agregó la sonda H₂DCFDA (10 µM de concentración final) y se incubó durante 30 min en la oscuridad. Luego, las células se lavaron y se rompieron mediante tres pasajes a través de una prensa francesa a 13000 *psi* obteniéndose un extracto conidial. Se realizó una centrifugación (10 min a 10000 rpm) para eliminar los restos celulares y se procedió a la medición de la intensidad de fluorescencia usando un fluorómetro ISS-PCI (Champaign, IL, EE.UU.). La fluorescencia fue normalizada por la concentración de proteínas de los extractos. En forma paralela, se procesó un ensayo control, con conidias tratadas sólo con agua destilada estéril o con DMSO al 2%.

También se realizó la detección *in situ* de H₂O₂ utilizando el método de incorporación de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) (Thordal-Christensen y col., 1997). Las suspensiones tratadas con los compuestos químicos se expusieron a una solución de DAB (0,5 mg/mL) y se incubaron durante 8 h en la oscuridad. Luego, las conidias se visualizaron con un microscopio invertido (Olympus IX51 equipado con una cámara digital Olympus, QColor5 (Q-imaging)). La presencia de una coloración marrón o rojiza en las conidias indica la presencia de H₂O₂.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas en los extractos celulares se realizó por el método de Waddel (1956), el cual se fundamenta en que todas las proteínas absorben a longitudes de onda inferiores a 230 nm, debido a sus enlaces peptídicos.

La concentración de proteínas en las muestras se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g/mL}) = 144 (A_{215} - A_{225})$$

Se realizó una curva patrón de seroalbúmina bovina.

Determinación de la infectividad residual de conidias

Para evaluar la capacidad infectiva de las conidias luego de los tratamientos, limones y arándanos se inocularon con conidias tratadas de *P. digitatum* y de *B. cinerea*, respectivamente. En limones se determinó la incidencia de podredumbre verde y en arándanos la de podredumbre gris.

Para la inoculación de limones con conidias de *P. digitatum*, se realizó una herida superficial en el fruto (1 mm de diámetro y 2 mm de profundidad), utilizando un punzón de acero inoxidable que había sido previamente sumergido en la suspensión conidial a evaluar. Mediante esta técnica se produce un daño a nivel de albedo y flavedo, sin llegar a la pulpa del fruto. Esta herida constituye una vía de entrada óptima para el patógeno. Las frutas se almacenaron en cajas con alvéolos plásticos a 23°C y 95% HR. Luego de 5 d se calculó la incidencia de la enfermedad.

Para el estudio de la capacidad infectiva de *B. cinerea*, la inoculación de los arándanos se realizó mediante la inmersión de 25 frutos en 50 mL de suspensión conidial en 10^6 conidias mL^{-1} , y su posterior agitación durante 10 min a temperatura ambiente. Los frutos se dejaron secar y se colocaron en bandejas plásticas con colchón de papel y gasa humedecida. Las bandejas se colocaron en bolsas plásticas y se almacenaron a 18°C y 95% HR. Luego de 14 d se calculó la incidencia de la enfermedad.

En todos los casos, los controles consistieron en fruta inoculada con conidias de *P. digitatum* o de *B. cinerea*, según corresponda, tratadas con DMSO o con agua destilada estéril.

Estudio del efecto de la radiación UV-A sobre la actividad antifúngica de harmol

- Estudio del efecto de la radiación UV-A sobre la viabilidad conidial

Se colocaron alícuotas de 100 μL de una suspensión conidial en los pocillos de una placa de poliestireno. Se ubicó una lámpara Philips HPW 8 W con λ_{em} a 365 nm (con ancho a media altura del pico (FWHM, por sus siglas en inglés) de ± 40 nm) a una distancia de 5 cm por encima de la placa. Las suspensiones se irradiaron durante distintos tiempos a $22\pm 1^\circ\text{C}$ y se determinó la viabilidad mediante recuento de UFC mL^{-1} . Se estableció así la máxima dosis de UV-A que resultó inocua para las conidias de los hongos fitopatógenos.

- Estudio del efecto fotodinámico de harmol

Se estudió el efecto de la irradiación con luz UV-A sobre la actividad antifúngica de harmol, ya que este es un compuesto excitable por radiación UV-A. Para ello, las suspensiones de *P. digitatum* y de *B. cinerea* se colocaron en placas multipocillo conteniendo el compuesto a ensayar a distintas concentraciones. Esta placa se irradió durante 30 min a $22\pm 1^\circ\text{C}$ con una lámpara Philips HPW 8 W (λ_{em} a 365 nm) ubicada 5 cm por encima de la placa. En estas condiciones, la radiación en el punto donde se encontraban los pocillos correspondía a una dosis de UV-A de 8 W/m^2 (radiómetro Spectrosense 2+ UV, Skye Instruments Ltd). En forma paralela, una microplaca conteniendo los mismos tratamientos se incubó en oscuridad. Luego de la irradiación, ambas microplacas se incubaron durante 24 h a $22\pm 1^\circ\text{C}$. Se determinaron las UFC mL^{-1} y se calculó el porcentaje de viabilidad.

Estudio de la efectividad de PHMG en el control de podredumbre verde en limones

Para los estudios *in vivo* descritos a continuación, se determinó la incidencia de podredumbre verde después de 5 d de almacenamiento de los limones a 23°C y 95% HR.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de frutos infectados sobre el total de frutos.

Evaluación de la acción desinfectante de PHMG

Las suspensiones conidiales de *P. digitatum* fueron expuestas a distintos tratamientos con PHMG y con NaClO durante 10 min. Luego, limones previamente heridos con punzón se sumergieron durante 90 s en las suspensiones de conidias tratadas. Se evaluó también el efecto de la presencia de materia orgánica en los tratamientos, mediante el agregado de leche en polvo al 1% a los tratamientos. El control consistió en limones sumergidos en suspensiones conidiales sin tratar. La fruta se almacenó durante 5 d y se evaluó la incidencia de podredumbre verde.

Evaluación de la protección de heridas en la piel del limón

Este experimento se diseñó para evaluar el efecto del PHMG sobre heridas preexistentes en la fruta. Los limones fueron heridos con un punzón y luego sumergidos en soluciones de PHMG a distintas concentraciones durante 90 s. Luego de 24 h de almacenamiento a 23°C y 95% HR, la fruta se inoculó por inmersión en suspensiones de conidias de *P. digitatum* y se almacenó durante 5 d en cámara. Transcurrido este periodo, se evaluó la incidencia de la enfermedad. Limones tratados con agua (control) y con NaHCO₃ al 3% se procesaron de la misma manera.

Evaluación de la acción curativa de PHMG

El diseño de este ensayo simula las infecciones ocurridas durante la cosecha y el traslado de la fruta, antes de la aplicación de los tratamientos en empaque. Para ello, los limones fueron heridos e inoculados con un punzón y guardados en cámara de almacenamiento a 23°C y 95% HR durante 24 h. Luego, se trató la fruta mediante inmersión en soluciones acuosas de PHMG, IMZ 1000 ppm o agua (control) durante 30 s. Los limones se dejaron

secar, se colocaron en bandejas y se almacenaron durante 5 d antes de evaluar incidencia de podredumbre verde.

Evaluación de la acción preventiva de PHMG

El protocolo que se aplicó en este ensayo simula las infecciones ocurridas luego la aplicación de los tratamientos poscosecha en el empaque. La fruta se trató por inmersión durante 30 s en agua (control), PHMG (500 y 1000 ppm) e IMZ 1000 ppm. Luego de 24 h, los limones se inocularon con un punzón embebido en suspensión de conidias y se almacenaron durante 5 d en cámara. Se determinó la incidencia de la enfermedad al final de esta incubación.

Estudio de parámetros fisiológicos en limones

Para determinar las alteraciones que se pueden generar en los limones al ser tratados con PHMG se analizaron distintos parámetros de calidad. Este ensayo se realizó tratando limones con agua (control) y con PHMG 1000 ppm. Después de los tratamientos, los limones se conservaron a 7°C durante 45 d, simulando el envío marítimo de la fruta. Finalizado este almacenamiento, se determinaron peso, color y firmeza de los frutos enteros, y sólidos solubles totales y acidez titulable del jugo extraído a partir de los limones.

- Peso

Los frutos se pesaron antes del tratamiento (A) y después del almacenamiento (B). La pérdida de peso se calculó como $(A - B)/A$.

- Color

El color de los frutos se determinó utilizando un colorímetro portátil triestímulo Minolta modelo CR 300, con iluminante D65, ángulo observador 0°, sistema Hunter Lab. Se obtuvieron los valores L, a y b, para posteriormente determinar el Índice de color en citrus

como $ICC = 1000 a/L * b$ (Jiménez-Cuesta y col., 1981). El ICC suele presentar una alta correlación con la apreciación visual del color.

- Firmeza

Los valores de firmeza de cada limón se determinaron individualmente mediante compresión con un penetrómetro (GY-2 Texture Analyser) y se expresaron como deformación de la fruta (mm) luego de la aplicación de una fuerza de 9.8 N en la región ecuatorial. Valores bajos de deformación indican mayor firmeza de la fruta.

- Sólidos solubles totales

El contenido de sólidos soluble totales (SST) del jugo extraído de los limones se determinó con un refractómetro manual a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron en porcentaje.

- Acidez titulable

La acidez se evaluó mediante la titulación de 5 mL de jugo con NaOH 0,1 N hasta que se logró la neutralización de los ácidos orgánicos hasta pH 8,3. Los resultados se expresaron como porcentaje de ácido cítrico. Para su cálculo se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácido cítrico} = \text{mL NaOH} \times \text{normalidad} \times 1 \text{ eq ac. cítrico} \times 100 / \text{peso de la muestra (g)}$$

Estudio de la efectividad de PHMG en el control de podredumbres en arándano

Luego de la cosecha de la fruta, se descartaron aquellas cuyo diámetro ecuatorial era inferior a 9 mm y con defectos de calidad. La evaluación se realizó mediante la determinación de la incidencia de enfermedades, la cual se expresó como el porcentaje de frutos infectados sobre el total de frutos.

Evaluación de la acción curativa de PHMG

El objetivo de este ensayo fue estudiar la eficacia de PHMG para el control de enfermedades poscosecha en arándanos. Se trabajó con arándanos inoculados artificialmente con el patógeno *B. cinerea* y con arándanos naturalmente infectados, es decir, con la carga microbiana que traen los frutos desde el campo. La inoculación artificial se realizó sumergiendo los frutos en una suspensión conidial de *B. cinerea* y agitándolos durante 10 min a $22\pm 1^{\circ}\text{C}$. Luego, los arándanos se colocaron en bandejas plásticas y se almacenaron a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ y 95% HR durante 24 h. El tratamiento de los frutos inoculados y no inoculados se realizó mediante aspersión de 1 mL de solución acuosa de los compuestos por cada 25 arándanos. Los tratamientos que se incluyeron fueron PHMG 500 y 1000 ppm, fludioxonil 200 ppm + azoxistrobin 200 ppm (fungicida Graduate A) y agua destilada (control). Los arándanos se dejaron secar y se almacenaron en bandejas plásticas con un 95% HR. Los arándanos inoculados en el laboratorio se almacenaron a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 d, mientras que los no inoculados se almacenaron a $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 28 d y luego a $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 7 d. Finalmente, se evaluó la incidencia de podredumbres.

Análisis estadístico

Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Para los ensayos *in vitro*, se realizaron cuatro réplicas de cada condición. Los ensayos *in vivo* incluyeron cuatro réplicas de 15 limones o de 25 arándanos por tratamiento. En todos los casos, los datos se sometieron a un análisis de la varianza seguido del test de Tukey, usando el software Infostat, versión 2013 para Windows. Se consideraron diferencias significativas aquellas con valor $p \leq 0,05$.



RESULTADOS

CAPITULO I: β -carbolinas (β Cs)

Efecto *in vitro* de β Cs sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos

- **Efecto sobre la germinación de conidias**

Se estudió el efecto inhibitorio sobre *P. digitatum* y *B. cinerea* de las seis β Cs (norharmano, harmano, harmina, harmol, harmalina y harmalol) mostradas en la **Figura 19**.

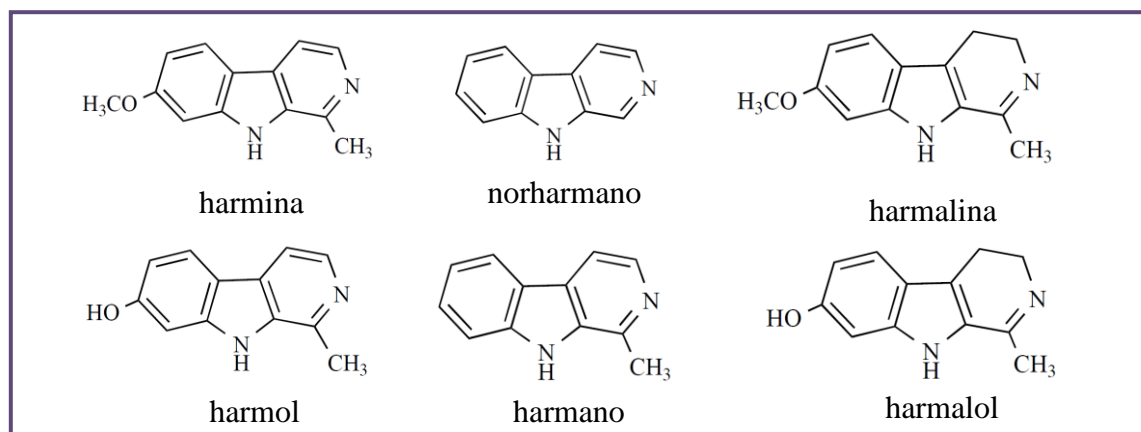


Figura 19. Estructura de las seis β Cs estudiadas.

Se muestran las estructuras químicas de los derivados completamente aromáticos (harmina, harmol, norharmano y harmano) y de los derivados dihidrogenados (harmalina y harmalol).

Cuando se evaluó el efecto de las β Cs sobre la germinación conidial se observó que todos los compuestos exhibieron una toxicidad dosis-dependiente contra ambos hongos. La **Figura 20** muestra el porcentaje de germinación de las conidias hasta las 48 h de contacto con las drogas. Con respecto a los derivados completamente aromáticos, harmano 1 mM inhibió la germinación de los dos patógenos; norharmano 1 mM y 0,5 mM inhibió la germinación de *P. digitatum* y de *B. cinerea*, respectivamente; harmina 0,5 mM inhibió la germinación de *B. cinerea*, mientras que 1 mM sólo produjo un retraso en la de *P. digitatum*; y harmol 0,5 mM inhibió completamente la germinación de ambos hongos hasta los 7 d de incubación.

Además, las β Cs parcialmente reducidas fueron menos efectivas que las β Cs completamente aromáticas, ya que a la máxima concentración testada (1 mM), harmalina y harmalol retrasaron o inhibieron como máximo un 30% de la germinación. No hubo diferencias significativas en la germinación de conidias en el control con DMSO respecto del control con agua.

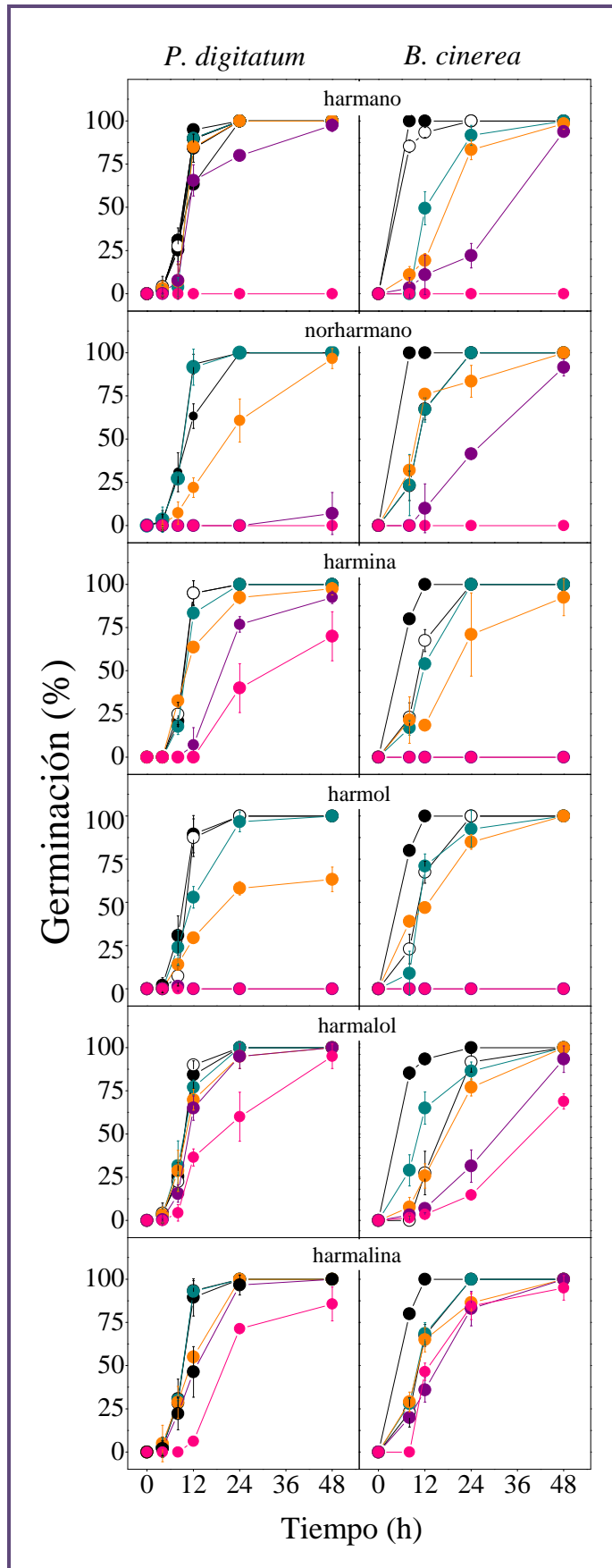


Figura 20. Efecto de las βCs sobre la germinación de conidias.

Se muestra el porcentaje de germinación de las conidias de *P. digitatum* y *B. cinerea* a los tiempos de incubación indicados en presencia de diferentes concentraciones de βC. ●: 0,1 mM; ●: 0,25 mM; ●: 0,5 mM; ●: 1 mM. Además se incluyeron controles con agua (●) y con DMSO (○). Se realizaron tres ensayos independientes incluyendo cuatro réplicas para cada condición. Los resultados se expresan como el porcentaje de conidias germinadas ± DE.

Entre las seis β Cs probadas, el harmol fue la droga más activa contra *P. digitatum* y *B. cinerea*, por lo que este compuesto fue seleccionado para los experimentos siguientes.

- Efecto del pH del medio en la actividad antifúngica del harmol

En soluciones acuosas en el intervalo de pH 2-13, las β Cs completamente aromáticas muestran diferentes equilibrios ácido-base (Gonzalez y col., 2009b). En el caso del harmol, el equilibrio más relevante que ocurre a pH fisiológico implica la desprotonación del nitrógeno piridínico (N-2), con un valor pKa de 7,8 (Figura 21). Los otros grupos funcionales, es decir, el sustituyente hidroxilo de la posición 7 y el nitrógeno del indol, tienen valores de pKa superiores a 9,6.

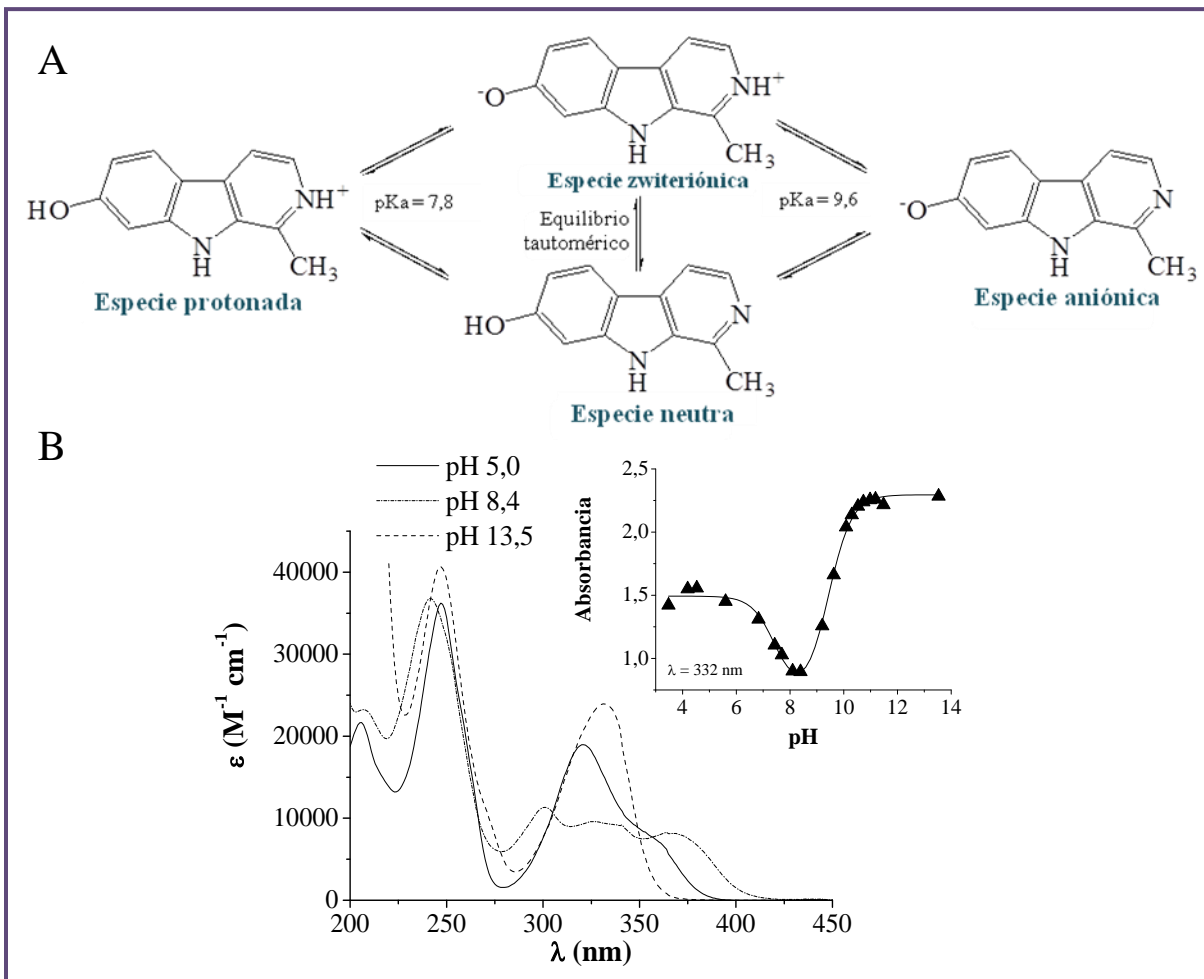


Figura 21. Efecto del pH sobre la estructura química y el equilibrio ácido-base del harmol. (A) Estructura química y equilibrio ácido-base del harmol. (B) Espectro UV-visible de harmol en soluciones acuosas ácida (pH 5), alcalina moderada (pH 8,4) y alcalina (pH 13,5). *Inserto*: curva de titulación espectrofotométrica representativa registrada a la longitud de onda de absorción de 332 nm.

RESULTADOS

Con el fin de determinar la contribución de cada especie iónica sobre la actividad antifúngica, se evaluó el efecto del harmol sobre conidias de *P. digitatum* y *B. cinerea* en condiciones ácidas (a pH 5, situación en la que el harmol está presente en más de un 99% en su forma protonada) y alcalinas (a pH 9, donde está presente una mezcla de especies neutras, zwitteriónicas y aniónicas) (**Figura 22**).

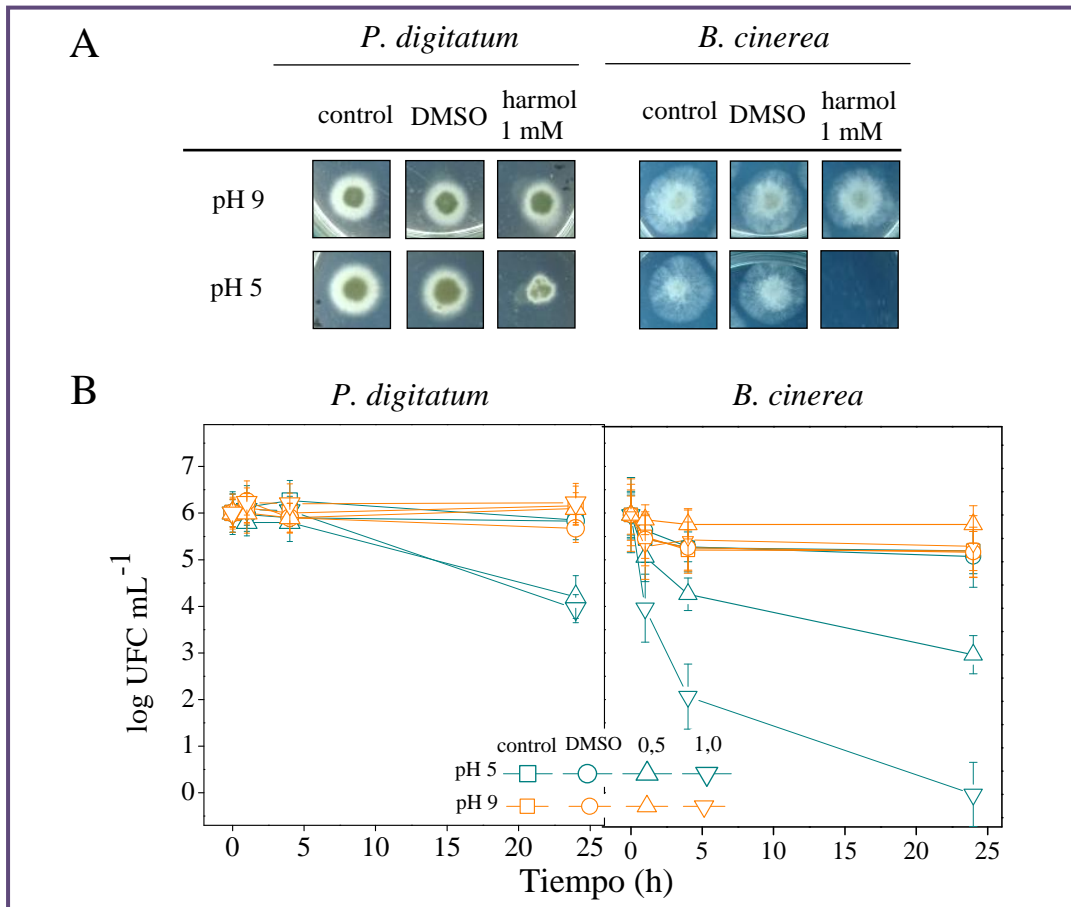


Figura 22. Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de harmol.

Las conidias de *P. digitatum* y *B. cinerea* se trataron durante 24 h con harmol a pH 5 y 9. (A) Luego de los tratamientos indicados, se evaluó la formación de colonias sembrando gotas de las muestras en placas de APG sin harmol, las cuales se incubaron durante 48 h. (B) La viabilidad conidial se determinó cuantitativamente mediante recuento de UFC mL⁻¹ a lo largo de la incubación con harmol. Se incluyeron controles con y sin DMSO. Se realizaron cuatro réplicas en tres experimentos independientes.

Luego de su incubación con harmol 1 mM a pH 9, las conidias de ambos hongos fueron capaces de generar una colonia de tamaño y aspecto similar a la de los controles (**Figura 22A**); además, el recuento de UFC mL⁻¹ de ambos patógenos permaneció invariable con respecto a los tratamientos sin harmol (**Figura 22B**). En cambio, a pH 5 se observó un marcado efecto antimicrobiano. Luego de 24 h, el tratamiento con 0,5 mM de

harmol redujo el recuento de viables de 10^6 a 10^3 UFC mL⁻¹ para *B. cinerea*, mientras que el tratamiento con 1 mM fue letal. La exposición de *P. digitatum* a 0,5 mM y 1 mM de harmol redujo la viabilidad en 2 órdenes de magnitud con respecto al control.

Estos resultados indican que la acción inhibitoria de la forma protonada del harmol resulta fungistática para *P. digitatum* y fungicida para *B. cinerea*, y que esta inhibición no ocurre en condiciones alcalinas. Por esto, los ensayos siguientes se realizaron con harmol a pH 5.

- Inhibición del crecimiento micelial por harmol

Concentraciones iguales o mayores a 0,5 mM produjeron inhibiciones del 60% y 45% en el crecimiento de *P. digitatum* y de *B. cinerea*, respectivamente (**Figura 23A**), mientras que el crecimiento con harmol 0,1 mM no fue significativamente diferente al del control. Además, como se observa en la **Figura 23B**, luego de 7 d de incubación, el micelio de ambos hongos en presencia de harmol 1mM fue incapaz de formar conidias.

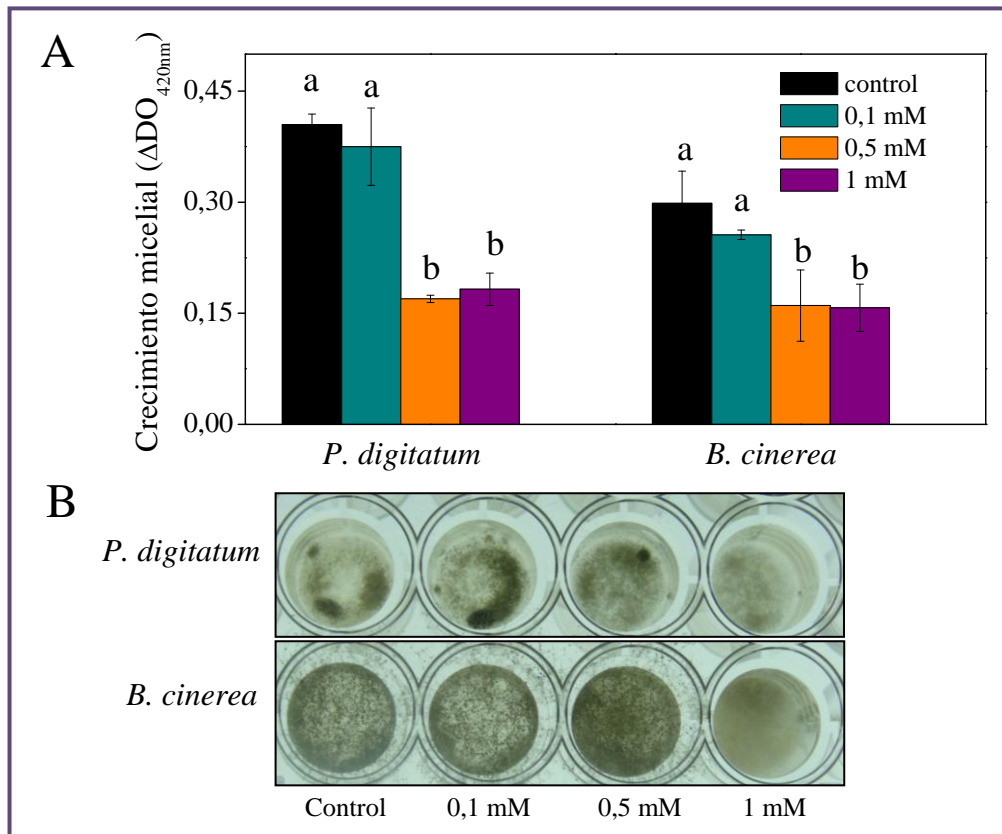


Figura 23. Efecto de harmol sobre el crecimiento micelial y la esporulación.

El micelio crecido durante 24 h fue expuesto a las concentraciones indicadas de harmol. A: Promedio \pm DE de las diferencias en las DO_{420nm} antes y después de 24 h de incubación con harmol. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos para cada hongo. B: Fotografías representativas del aspecto del micelio luego de 7 d de incubación en presencia de distintas concentraciones de harmol. Se realizaron tres experimentos independientes, con cuatro réplicas para cada condición.

Estudio de la morfología y el estado fisiológico de las conidias después de la exposición a harmol

- Morfología de las conidias expuestas a harmol

El tratamiento con harmol provocó daños morfológicos en las conidias de *P. digitatum* y *B. cinerea* (Figura 24). Si bien más del 50% de las conidias fueron capaces de germinar en presencia de 0,25 mM de harmol, sus tubos germinativos eran más cortos (paneles c y d) con respecto a los controles (paneles a y b). A mayores concentraciones de la β C, la germinación fue completamente inhibida (paneles e - h). Las conidias de *B.*

cinerea tratadas con harmol 1 mM mostraron un citoplasma desorganizado, defecto ausente en conidias tratadas con harmol 0,5 mM (*insertos en paneles h y f, respectivamente*).

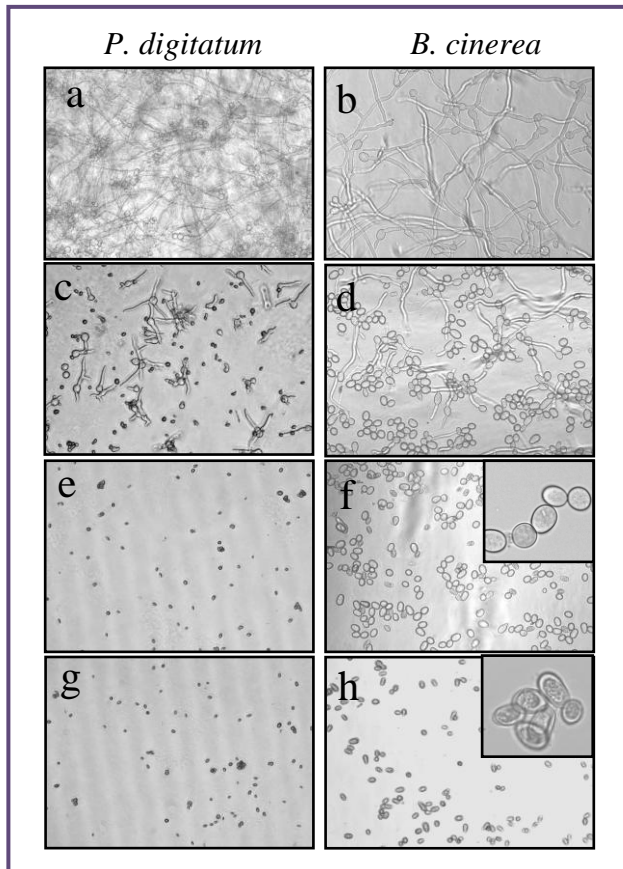


Figura 24. Efecto del harmol en la morfología celular.

P. digitatum y *B. cinerea* se incubaron con distintas concentraciones de harmol durante 24 h. Las micrografías y los insertos se tomaron usando microscopía óptica con aumentos de 40 y 100X, respectivamente. Los paneles muestran las condiciones control con DMSO (a y b), y los tratamientos con diferentes concentraciones de harmol: 0,25 mM (c y d), 0,5 mM (e y f) y 1 mM (g y h). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

- Permeabilización de la membrana por harmol

La permeabilidad de la membrana plasmática de las conidias después de su exposición a harmol se evaluó utilizando la sonda fluorescente SG. En la **Figura 25** se observa que no se detectó fluorescencia en las conidias tratadas en condiciones control, indicando que sus membranas plasmáticas fueron completamente impermeables a la sonda. La incubación de *P. digitatum* con 0,25 mM de harmol (tratamiento sub-inhibitorio) dio como resultado conidias fluorescentes y tubos germinativos no fluorescentes. La incubación de *B. cinerea* con 0,25 mM de harmol resultó en una baja incorporación de SG, indicando menor permeabilidad de la membrana plasmática comparada con *P. digitatum*. Una exposición de 24 h a 0,5 mM o 1,0 mM de harmol (tratamientos inhibitorios para ambos patógenos) generó la permeabilización de las membranas plasmáticas del 100% de las conidias.

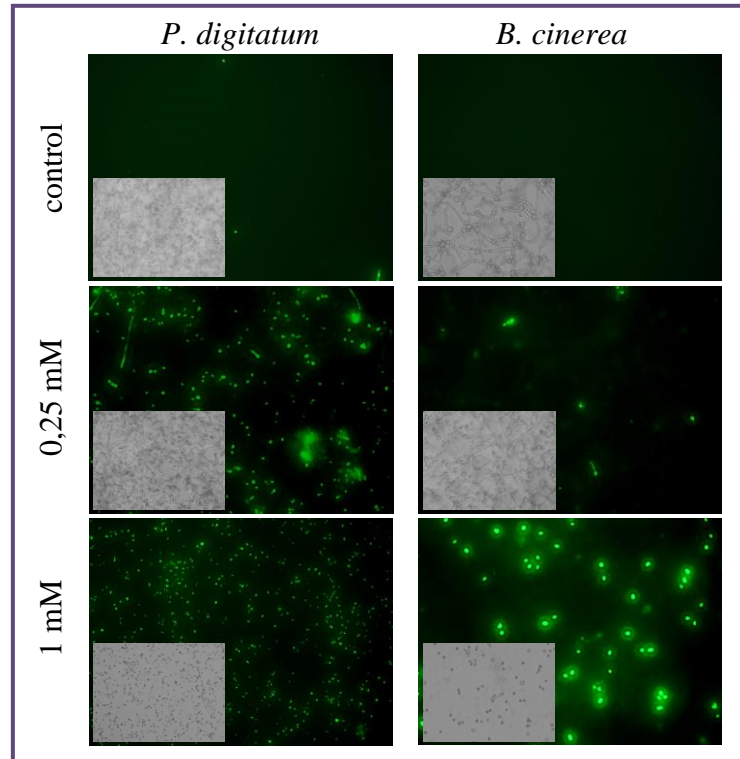


Figura 25. Efecto del harmol sobre la permeabilidad de la membrana plasmática.

Las suspensiones conidiales en PG conteniendo la sonda SG fueron expuestas a concentraciones inhibitorias y sub-inhibitorias de harmol. Se tomaron fotografías (40X) en campo visible (paneles izquierdos) y en campo fluorescente (paneles derechos), luego de 24 h de incubación. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes.

- Modificaciones en la pared conidial provocadas por harmol

Se estudió el efecto de la exposición a harmol sobre la integridad de la pared celular de las conidias tiñiendo las células con CFW. Los resultados se muestran en la **Figura 26**. La superficie de conidias tratadas con harmol mostraron una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con sus respectivos controles. Frecuentemente, se observaron algunos puntos brillantes sobre las conidias de *B. cinerea* expuestas a la β C (*panel inferior derecho, inserto*), lo que indica que el tratamiento con harmol 1 mM produce la exposición de residuos de β -glucanos de la pared celular, efecto ausente en las muestras control.

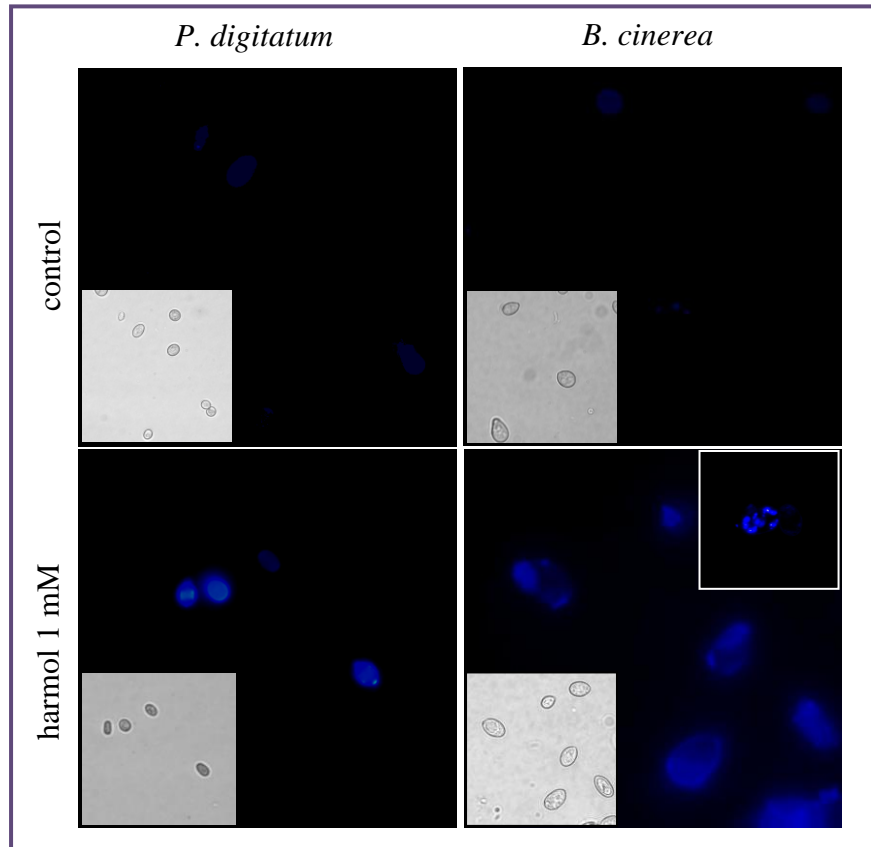


Figura 26. Efecto del harmol en la integridad de la pared celular. Conidias expuestas a harmol durante 24 h se tiñieron con CFW. Se muestran las imágenes de microscopía de fluorescencia de las conidias control y tratadas, y sus correspondientes imágenes con luz visible como insertos en cada panel (100X). Las imágenes son representativas de tres ensayos independientes.

- **Modificaciones en la ultraestructura de las conidias por harmol**

Luego de los tratamientos de las conidias con 1 mM de harmol, se analizó su estado ultraestructural mediante MET (**Figura 27**). Las imágenes obtenidas sugieren que el tratamiento con harmol produjo severos cambios morfológicos en las conidias. Como se observa, las células de las muestras control presentaron un citoplasma organizado en el que se distinguen núcleos y vacuolas rodeadas por envolturas bien definidas, y membranas y paredes celulares intactas. Al contrario, las conidias expuestas a harmol exhibieron organelas indefinidas y citoplasmas desordenados, revelando un evidente daño celular. En la gran mayoría de los casos, se observó una distorsión significativa de la forma celular y/o

pérdida de contenido intracelular. Además, en varios campos de las muestras de conidias de *B. cinerea* tratadas con harmol se detectaron restos celulares indicativos de lisis celular.

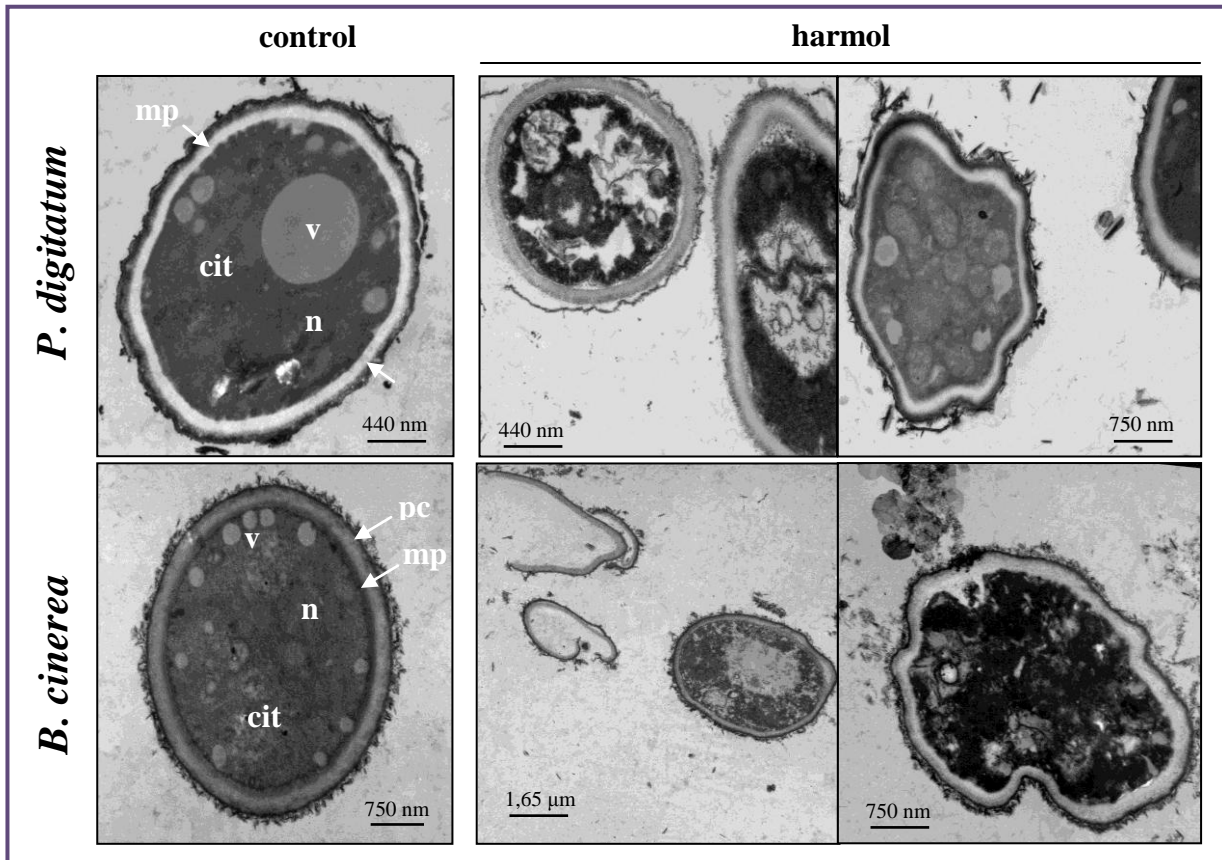


Figura 27. Efecto del harmol en la ultraestructura de conidias.

Se muestran imágenes tomadas mediante MET de las muestras de *P. digitatum* y *B. cinerea* correspondientes al control y al tratamiento con harmol 1 mM. Las fotografías representativas de tres experimentos independientes. Cit: citoplasma; v: vacuola; n: núcleo; mp: membrana plasmática; pc: pared celular.

- **Disminución de la infectividad de las conidias tratadas con harmol**

Para caracterizar la infectividad de las conidias de *P. digitatum* y *B. cinerea* después de ser tratadas con harmol, se inocularon limones y arándanos con conidias expuestas o no a la droga y se registraron las incidencias de moho verde y gris luego del almacenamiento de la fruta (**Figura 28**). En el caso de *P. digitatum*, se infectaron el 100% de los limones inoculados con suspensiones conidiales no expuestas a la droga, mientras que las conidias de los tratamientos con 0,5 mM y 1 mM de harmol dieron lugar a incidencias de la enfermedad del 55% y 17%, respectivamente (**Figura 28A**). Por otro lado, los arándanos infectados con conidias control de *B. cinerea* presentaron una incidencia del 100% después

del almacenamiento. Como era de esperar, las conidias resultantes del tratamiento con 1 mM de harmol (tratamiento letal), no infectaron los frutos. La suspensión de conidias tratada con harmol 0,5 mM (tratamiento subletal) perdió su capacidad infectiva en un 70%.

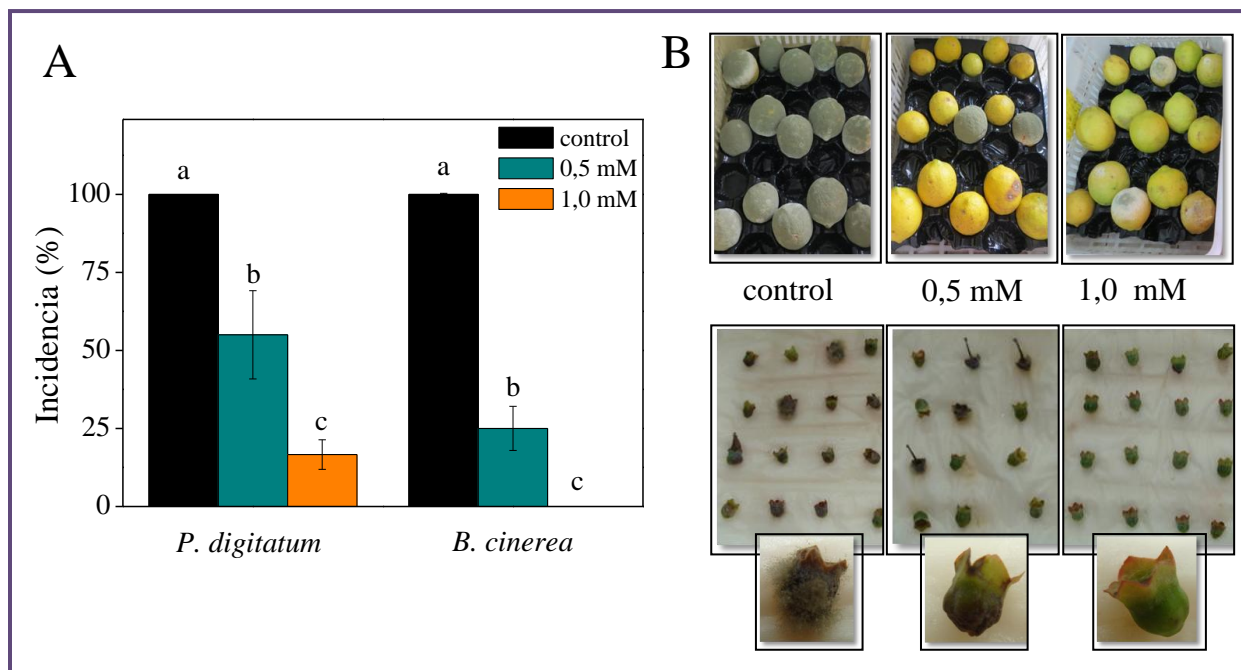


Figura 28. Capacidad infectiva de conidias tratadas con harmol.

Las suspensiones de los hongos se trataron con las concentraciones indicadas de harmol durante 24 h. Frutos de limón se hirieron e inocularon con conidias de *P. digitatum* utilizando un punzón; los arándanos se inocularon mediante su inmersión durante 10 min en suspensiones conidiales de *B. cinerea*. A: Incidencia de las podredumbres verde y gris, en limones y arándanos, respectivamente. Los valores corresponden al promedio del porcentaje de incidencia \pm DE. Para cada patógeno, diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. B: Imágenes representativas de las frutas inoculadas con conidias control y tratadas con harmol después de 5 d (limones) y 14 d (arándanos) de almacenamiento. Se realizaron tres ensayos independientes con cuatro repeticiones de 15 limones o 25 arándanos para cada condición.

La **Figura 28B** muestra fotografías de las frutas evaluadas luego al final de sus respectivos almacenamientos. Como se puede observar, el grado de avance de la enfermedad en los limones inoculados con conidias de *P. digitatum* tratadas con harmol 0,5 mM es idéntica a la del control, mientras que el del tratamiento con harmol 1 mM es marcadamente inferior. Sin embargo, el hongo fue capaz de esporular en las tres condiciones. En el caso de *B. cinerea*, a los 14 d de evaluación, los arándanos del tratamiento subletal presentaban síntomas de la enfermedad pero no se detectaban estructuras del hongo. El micelio fúngico colonizó el tejido de los frutos recién a 21 d de almacenamiento (datos no mostrados).

Potenciación de la actividad antifúngica de harmol por fotoactivación con UV-A

Se ha reportado que, en condiciones ácidas, algunas β C son excitadas por radiación UV de baja energía (Gonzalez y col., 2009b, Gonzalez y col., 2012b). Por esto, se estudió la toxicidad del harmol fotoexcitado electrónicamente irradiando con luz UV-A las suspensiones conidiales en presencia de la droga.

Si bien se sabe que la radiación UV-A es de baja energía y por lo tanto no debería ser nociva para los organismos vivos, antes de iniciar estudios sobre la fotoactivación del harmol, se evaluó si la radiación tenía un efecto inhibitorio *per se* sobre la viabilidad de las conidias (**Tabla 5**). Se observó que una irradiación de hasta 30 min no alteró la viabilidad de suspensiones de *P. digitatum* y de *B. cinerea*. Un mayor tiempo de irradiación (60 min) provocó una reducción en el recuento de viables tanto de *P. digitatum* como de *B. cinerea*. Por este motivo, se fijó 30 min como tiempo de irradiación para los tratamientos posteriores.

Cuando se irradiaron las suspensiones conidiales de ambos hongos en presencia de harmol se observó una disminución significativa en la viabilidad con respecto a la misma concentración de β C sin irradiar (**Tabla 6**). Sin embargo, el patrón de esta disminución fue diferente para *P. digitatum* y *B. cinerea*, siendo este último el aislamiento más sensible. En este caso, el tratamiento fotosensibilizado requirió 0,5 mM de harmol para alcanzar el efecto letal observado en condiciones no irradiadas con 1 mM. La irradiación con UV-A de tratamientos con 0,1, 0,2 y 0,3 mM de harmol provocó una disminución significativa en la supervivencia de las conidias comparadas con los tratamientos con las mismas concentraciones en oscuridad. Para *P. digitatum*, los tratamientos con harmol 0,5 y 1 mM irradiado con UV-A redujeron significativamente la viabilidad con respecto a los tratamientos sin irradiar. Sin embargo, a menores concentraciones no hubo diferencias en la viabilidad producto de los tratamientos correspondientes sin irradiar.

Tabla 5. Efecto de la irradiación con luz UV-A sobre la viabilidad de las conidias

Tiempo	Viabilidad (UFC mL ⁻¹)	
	<i>P. digitatum</i>	<i>B. cinerea</i>
10 min	9,8 x 10 ⁵ ^a	1,2 x 10 ⁶ ^a
20 min	1,0 x 10 ⁶ ^a	9,9 x 10 ⁵ ^a
30 min	1,0 x 10 ⁶ ^a	1,1 x 10 ⁶ ^a
60 min	5 x 10 ⁴ ^b	1,8 x 10 ⁵ ^b

Las letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de las columnas.

Tabla 6. Efecto fotodinámico del harmol sobre la viabilidad de las conidias

[mM]	Viabilidad (%)			
	<i>P. digitatum</i>		<i>B. cinerea</i>	
	harmol	harmol + UVA	harmol	harmol + UVA
-	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a	100,00 ^a
0,1	97,40 ^a	100,00 ^a	63,80 ^b	6,80 ^{b#}
0,2	95,50 ^a	83,20 ^c	7,70 ^c	1,50 ^{c#}
0,3	84,20 ^a	88,80 ^b	1,20 ^d	0,20 ^{d#}
0,5	8,30 ^b	1,00 ^{d#}	0,02 ^d	0,00 ^{d#}
1,0	1,50 ^b	0,50 ^{d#}	0,00 ^d	0,00 ^d

Las letras indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) dentro de cada columna. El símbolo # indica que existe una diferencia significativa ($p \leq 0,05$) entre tratamientos irradiados y no irradiados, para una misma concentración de harmol.

- Acumulación de ERO provocada por la exposición a harmol. Generación de estrés oxidativo

Algunas β Cs fotoexcitadas son capaces de producir ERO tales como anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (1O_2) (Vignoni y col., 2013), las cuales pueden ser responsables de daño oxidativo en las células (Halliwell, 2006). Por este motivo, resultó interesante estudiar el producción intracelular de ERO en

conidias incubadas con harmol a pH 5, irradiadas o no con UV-A durante 30 min (*Figura 29*).

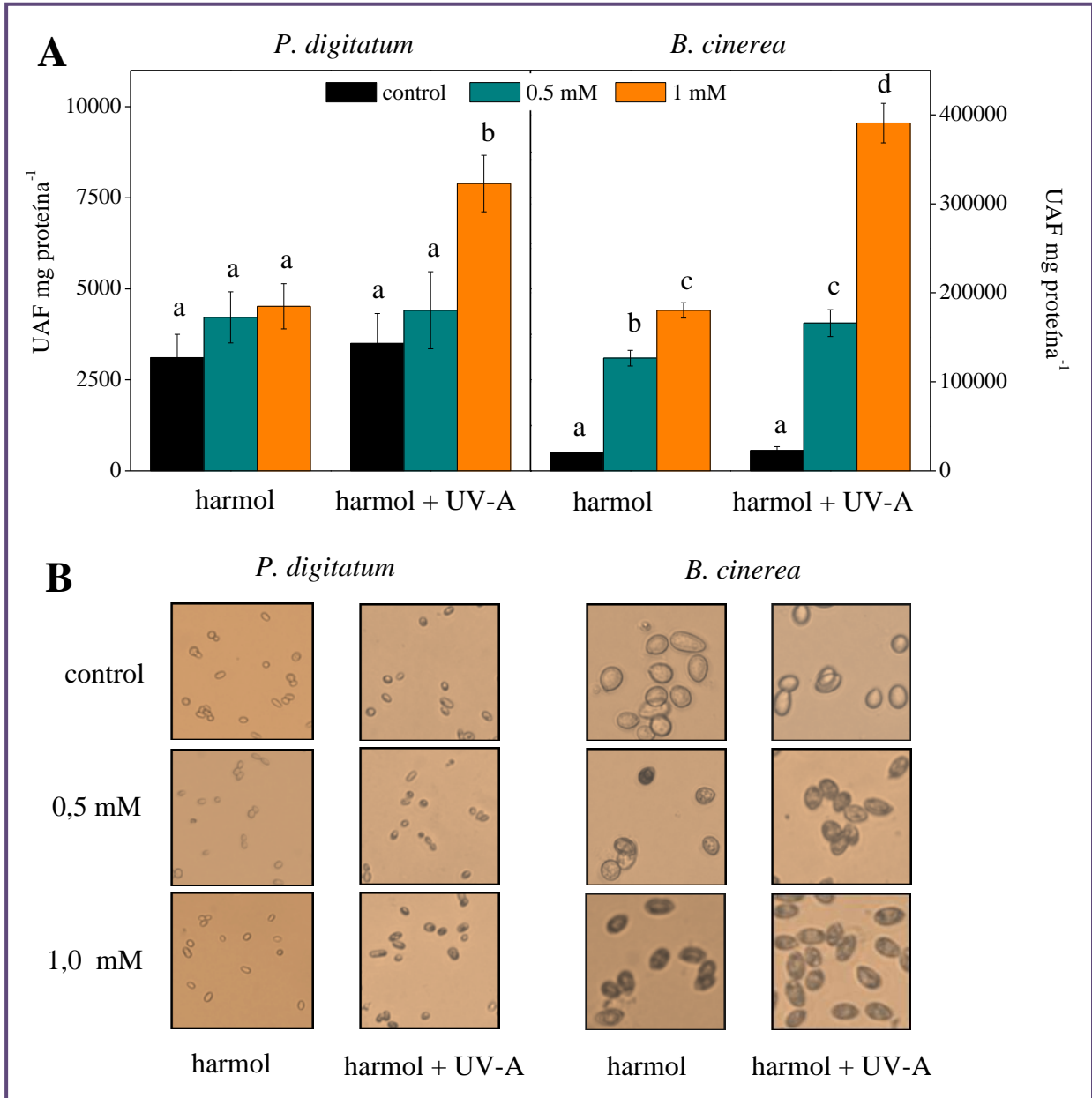


Figura 29. Efecto del harmol en la producción intracelular de ERO.

Las conidias se trataron con harmol a las concentraciones indicadas y fueron irradiadas con UV-A o mantenidas en la oscuridad. A: cuantificación de ERO usando la sonda fluorescente H₂DCFDA. Los datos son la media ± DE de tres experimentos. Para cada patógeno, diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia. B: detección *in situ* de H₂O₂ por tinción con DAB. Las fotografías de microscopía óptica (40X) son representativas de tres experimentos independientes. La acumulación de H₂O₂ se visualiza como un oscurecimiento de las conidias.

La **Figura 29A** muestra los resultados obtenidos mediante la medición de intensidad de fluorescencia utilizando la sonda H₂DCFDA. En el caso de *P. digitatum*, el tratamiento fotoactivado en presencia de la concentración más alta de harmol (1 mM) dio lugar a un aumento significativo en el contenido intracelular de ERO, mientras que en el resto de los tratamientos probados, la acumulación de ERO fue similar a la de los controles sin βC. Con respecto a *B. cinerea*, la exposición a harmol en la oscuridad llevó a incrementos en la producción de ERO de seis a ocho veces en comparación con controles sin harmol. La producción de estas especies en conidias tratadas con harmol fotoactivado fue 15 veces mayor que la observada en los controles sin el compuesto.

La acumulación intracelular de ERO observada mediante la técnica de fluorescencia fue confirmada mediante tinción de las conidias con DAB. En este caso se detectó una evidente coloración en las conidias de *B. cinerea* tratadas con harmol, lo que se interpreta como acumulación de H₂O₂ (**Figura 29B**). Esta pigmentación fue más evidente cuando las suspensiones fueron expuestas a UV-A. En contraste, no se observó pigmentación en conidias de *P. digitatum* en ningún tratamiento, excepto en la suspensión conidial tratada con 1 mM de harmol y expuesta a UV-A.

El incremento en la producción intracelular de las ERO sería indicador de un estrés oxidativo en las conidias expuestas a harmol, especialmente cuando son irradiadas con luz UV-A.

Estos resultados demuestran que el mecanismo de acción del harmol involucra un daño oxidativo a diferentes niveles celulares. Al producirse un daño generalizado, la aparición de cepas fúngicas resistentes sería poco probable. Además, la fotoactivación del compuesto con radiación UV de baja energía potencia su efecto antifúngico.

CAPÍTULO II: Polihexametilen guanidina (PHMG)

Efecto *in vitro* de PHMG sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos

- Efecto sobre la germinación de conidias

Se evaluó el efecto antimicrobiano del polímero catiónico PHMG contra los hongos fitopatógenos *P. digitatum* y *B. cinerea*. El compuesto ensayado inhibió significativamente la germinación de conidias de manera dosis - dependiente (**Figura 30**). Una concentración de 5 ppm de PHMG fue suficiente para prevenir completamente la germinación de *P. digitatum*, mientras que se requirió una concentración 10 veces mayor para lograr este efecto en la germinación de *B. cinerea*. Con estos tratamientos inhibitorios, las conidias permanecieron sin germinar aún después de 7 d de incubación en presencia de PHMG. Sin embargo, muchas de estas células conservaron su viabilidad (**Figura 31**). Por ejemplo, el tratamiento de *P. digitatum* y de *B. cinerea* con 50 ppm de PHMG resultó en $2,2 \times 10^2$ y en $1,1 \times 10^3$ conidias viables mL^{-1} , respectivamente. La pérdida completa de la viabilidad de ambos patógenos se logró con tratamientos con PHMG 500 ppm por 24 h.

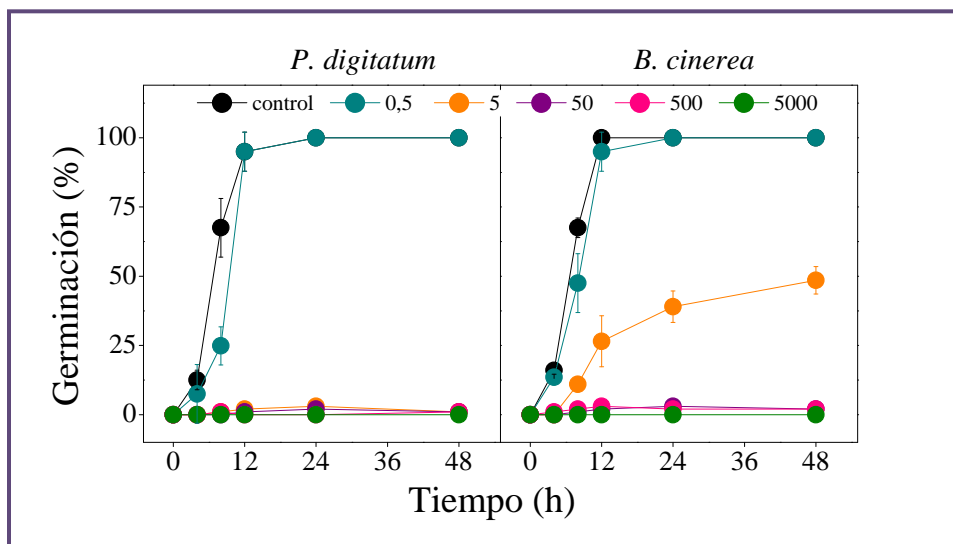


Figura 30. Efecto del PHMG sobre la germinación de conidias.

Se determinó el porcentaje de germinación de las conidias de *P. digitatum* y *B. cinerea* a los tiempos de incubación indicados en presencia de diferentes concentraciones de PHMG. Se realizaron tres experimentos independientes incluyendo cuatro réplicas para cada condición. Los resultados se expresan como el porcentaje promedio de conidias germinadas \pm DE.

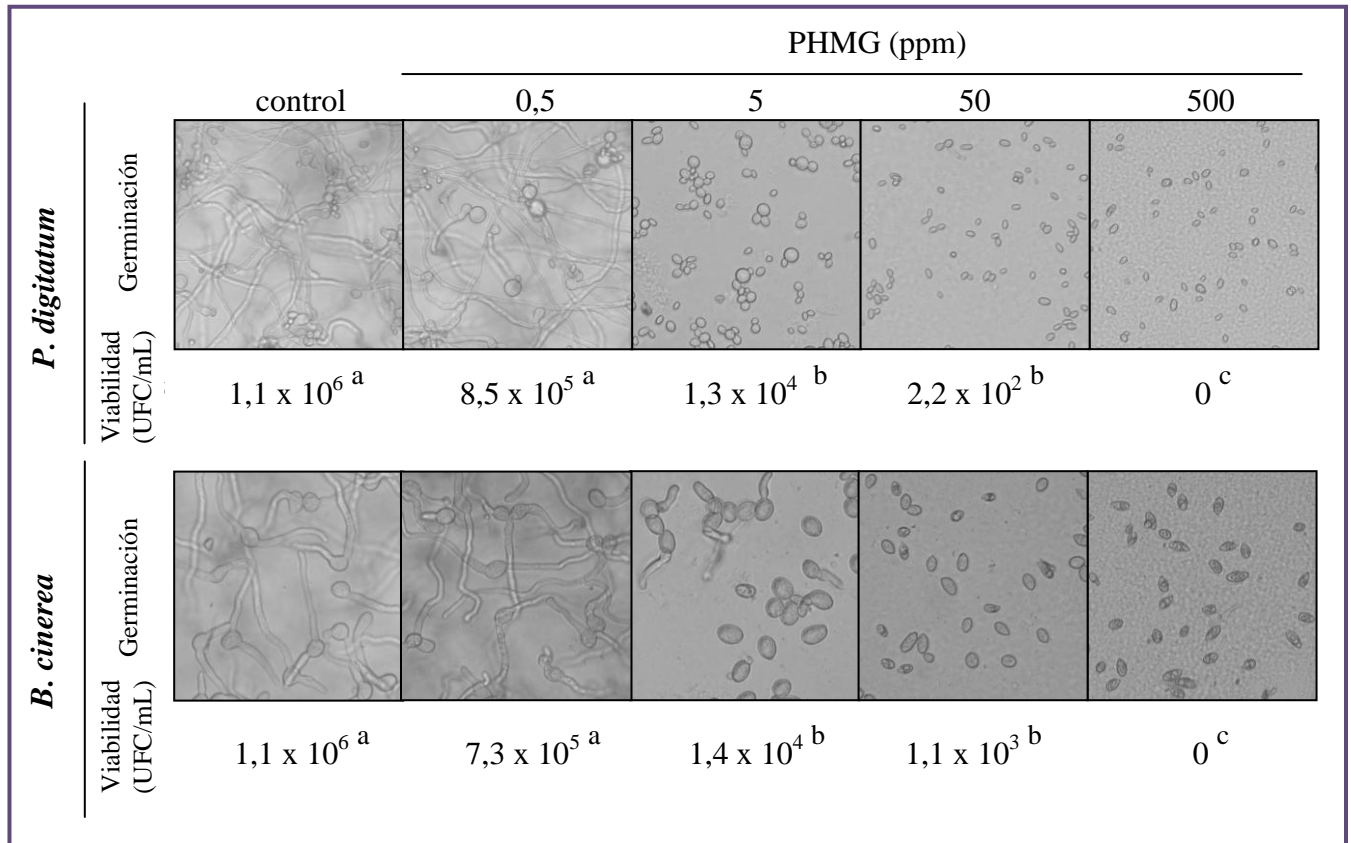


Figura 31. Efecto del PHMG sobre la morfología y la viabilidad de los hongos.

Suspensiones conidiales de *P. digitatum* y *B. cinerea* fueron incubadas durante 24 h en PG con las concentraciones indicadas de PHMG y se tomaron fotografías mediante microscopía de luz visible (40X). Se muestran imágenes representativas para cada condición con su respectivo recuento de UFC mL⁻¹. El ensayo se realizó tres veces en forma independiente.

- Inhibición del crecimiento del micelio fúngico por PHMG

Los tratamientos con distintas concentraciones de PHMG se aplicaron sobre micelio de *P. digitatum* y de *B. cinerea* crecido previamente durante 24 h en medio PG (**Figura 32**). Cuando el PHMG se aplicó a dosis de 0,5 y 5 ppm se observó una inhibición significativa en el crecimiento micelial. El tratamiento con la mínima dosis ensayada provocó una inhibición del 50% en el desarrollo de ambos hongos. En el caso de *P. digitatum*, se consiguió la inhibición total del crecimiento con una concentración de 50 ppm. El micelio de *B. cinerea* resultó menos sensible, ya que se observó solo un retraso del crecimiento cuando se aplicaron concentraciones entre 5 y 500 ppm de PHMG.

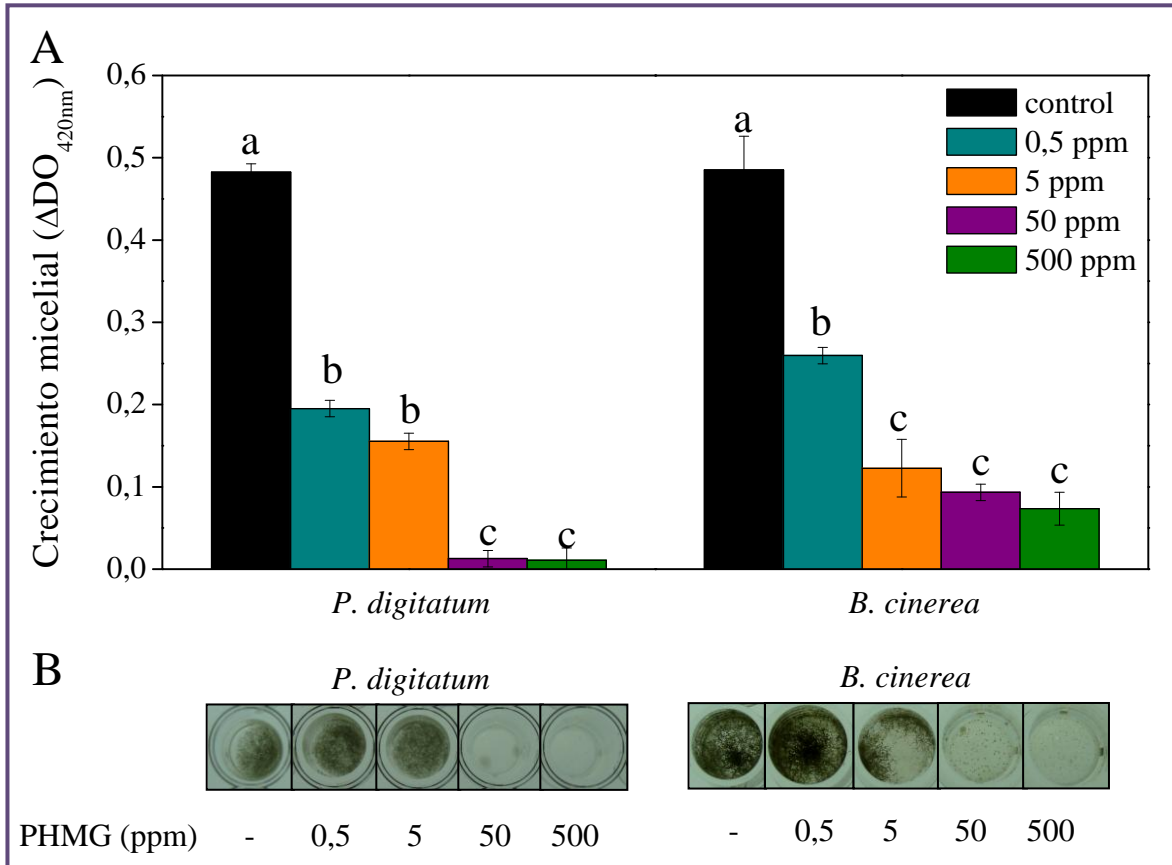


Figura 32. Efecto del PHMG sobre el crecimiento micelial.

El micelio crecido durante 24 h fue expuesto a las concentraciones indicadas de PHMG. A: Promedio ± DE de las diferencias entre las DO_{420nm} antes y después de 24 h de incubación con el polímero. Para cada patógeno, letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. B: Fotografías representativas del aspecto del micelio luego de 7 d de incubación en presencia de distintas concentraciones de PHMG. Se realizaron tres experimentos independientes, con cuatro réplicas para cada condición.

Estudio de la morfología y el estado fisiológico de las conidias después de la exposición a PHMG

- Permeabilización de la membrana por PHMG

La **Figura 33** muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de conidias de *P. digitatum* y *B. cinerea* expuestas a PHMG durante 24 h e incubadas con la sonda SG. El tratamiento con 500 ppm de PHMG (condición letal para ambos hongos) provocó la permeabilización de las membranas plasmáticas, lo que fue visualizado como fluorescencia verde en la totalidad de las células. Las conidias presentes en los controles sin droga no exhibieron fluorescencia. Cuando las suspensiones de *B. cinerea* fueron expuestas a

concentraciones sub-inhedoras de PHMG (5 ppm), la sonda fue internalizada tanto en las conidias no germinadas como en los tubos germinativos.

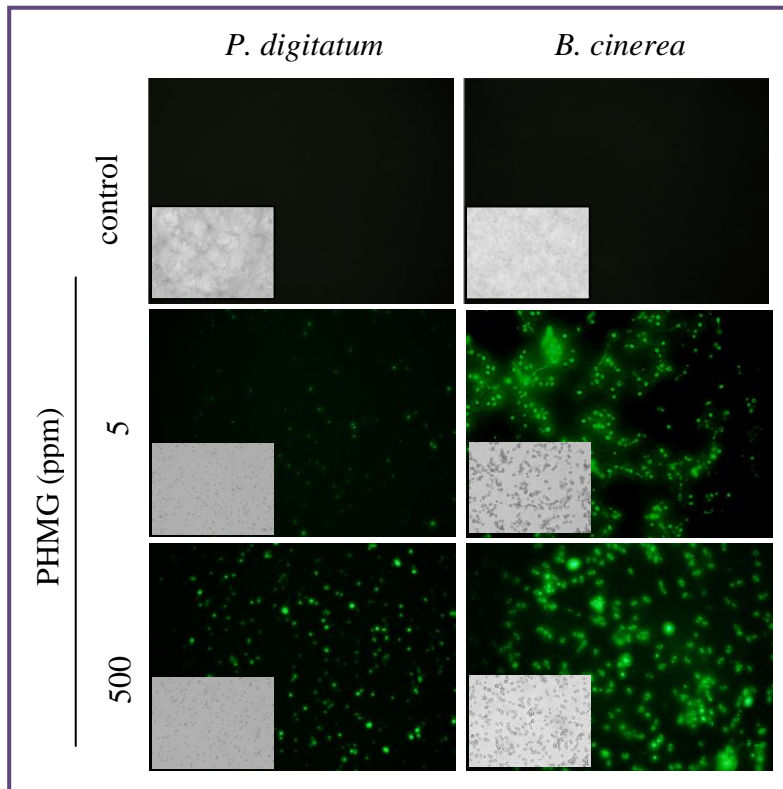


Figura 33. Efecto de PHMG sobre la permeabilidad de la membrana de las conidias.

Las suspensiones conidiales tratadas con PHMG durante 24 h se incubaron con la sonda fluorescente SG. Se muestran las fotografías tomadas mediante microscopía de fluorescencia, y su correspondiente imagen con luz visible como insertos (40X). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes.

- **Modificaciones en la pared conidial provocadas por PHMG**

La integridad de pared celular de las conidias luego de su exposición a PHMG se evaluó utilizando el fluorescente CFW. La **Figura 34** muestra las imágenes observadas mediante microscopía de fluorescencia y de luz visible de células tratadas con PHMG 5 y 500 ppm. La superficie de conidias expuestas al polímero mostraron una mayor intensidad de fluorescencia, respecto a los controles tratados con agua. La variación en el patrón de fluorescencia e intensidad de emisión sugiere que ocurre una desorganización y exposición de algunos residuos de polisacáridos en las paredes de células tratadas con PHMG, fenómeno ausente en la superficie de conidias control.

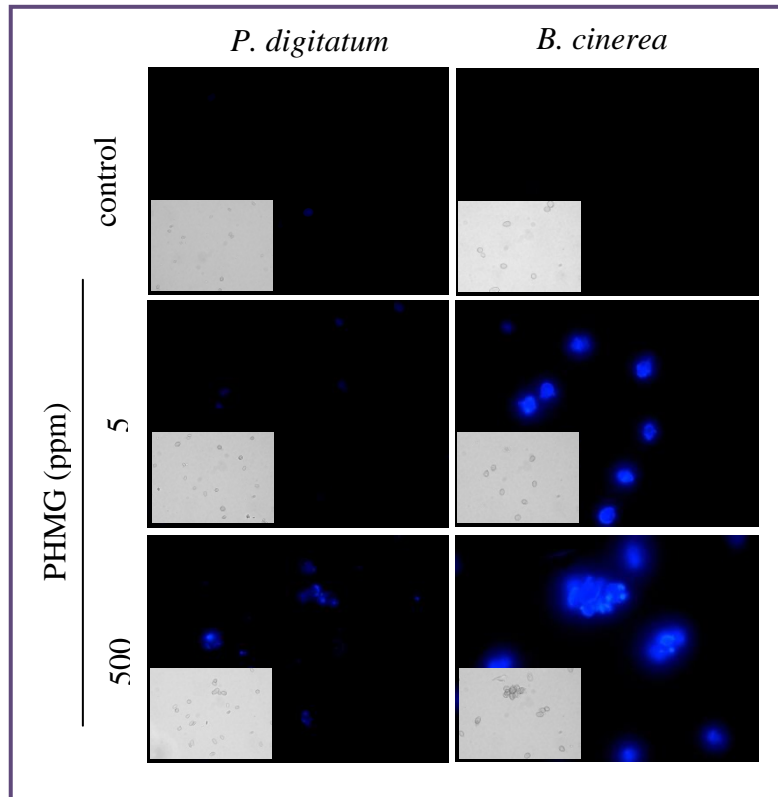


Figura 34. Efecto del PHMG sobre la integridad de la pared celular.

Las suspensiones conidiales tratadas con PHMG durante 24 h se incubaron con la sonda fluorescente CFW. Se muestran las fotografías tomadas mediante microscopía de fluorescencia y sus correspondientes imágenes de los campos con luz visible como insertos (100X). Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes.

- **Modificaciones en la ultraestructura de conidias por el tratamiento con PHMG**

La **Figura 35** ilustra los cambios morfológicos observados mediante MET en la ultraestructura de las conidias tratadas con PHMG, cuando son comparadas con conidias tratadas con agua. Como se observa, la mayoría de las conidias expuestas a PHMG 500 ppm mostraron núcleos anormales e indefinidos. Además, sus citoplasmas tenían un aspecto severamente desordenado. En muchos casos se observó una marcada distorsión de la forma celular y/o pérdida de contenido intracelular, siendo frecuente la detección de restos de membranas y otras envolturas de conidias. Para ambos patógenos, se observaron conidias cuyo citoplasma presentaba una electrodensidad significativamente más baja de lo normal, dando aspecto de sacos membranosos vacíos. En contraste, las conidias de los tratamientos control mostraron un citoplasma organizado, con núcleos y vacuolas visibles rodeadas de membranas perfectamente definidas. Las organelas, tales como mitocondrias,

retículo endoplásmico, vacuolas y diversos gránulos de reserva, exhibieron un aspecto normal.

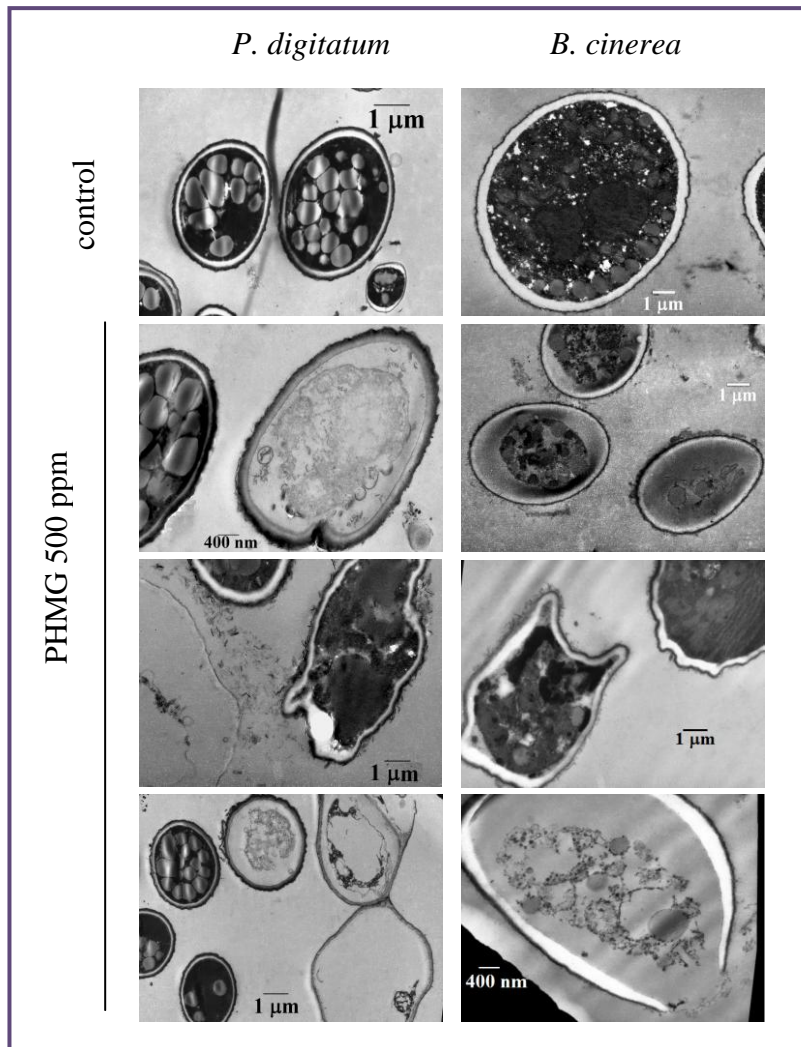


Figura 35. Efecto de PHMG en la ultraestructura de conidias.
Se muestran imágenes tomadas mediante MET de conidias de los hongos tratadas con agua y con PHMG. Las fotografías son representativas de tres experimentos independientes.

- **Estrés oxidativo por la exposición a PHMG**

Para evaluar si el daño observado en las conidias luego de su exposición a PHMG estaba relacionado a un aumento en la producción intracelular de ERO, se cuantificaron las mismas utilizando la sonda H₂DCFDA. La **Figura 36A** indica que no se detectaron diferencias significativas en las UAF mg proteína⁻¹ entre los tratamientos con PHMG y los controles, para ninguno de los dos patógenos. Esto se confirmó mediante tinción de las

conidias con DAB. En concordancia con la técnica de fluorescencia, no se observó coloración en las conidias en ningún tratamiento (*Figura 36B*). Esto indica que el PHMG no modifica el contenido intracelular de ERO y, por consiguiente, el mecanismo de acción del compuesto no estaría relacionado a la generación de estrés oxidativo en las células.

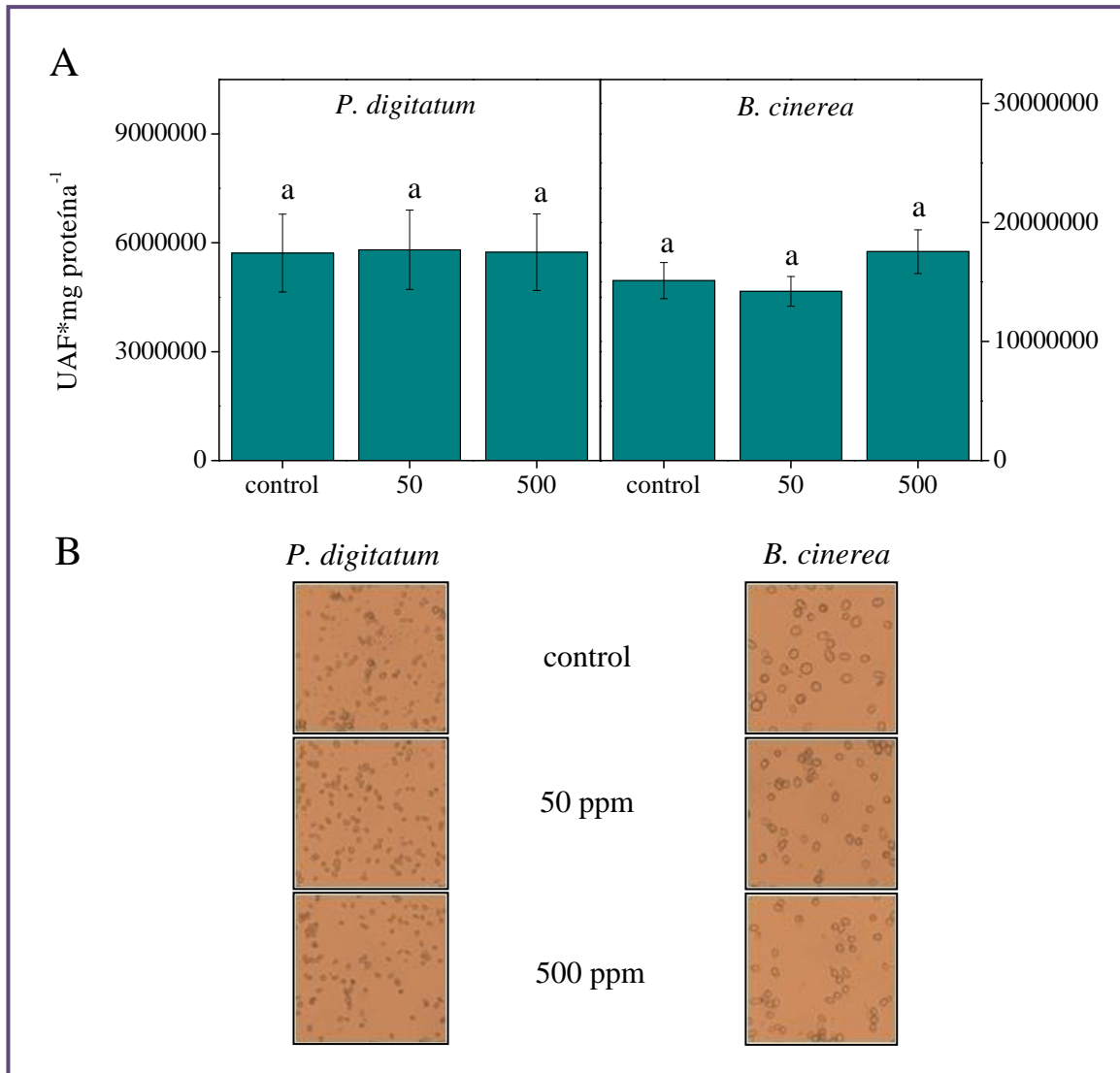


Figura 36. Efecto de PHMG en la producción intracelular de ERO.

Las conidias fueron tratadas con PHMG a las concentraciones indicadas. A: cuantificación de ERO usando la sonda fluorescente H₂DCFDA. Los datos mostrados corresponden a la media ± DE. Para cada patógeno, diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. El ensayo se repitió tres veces en forma independiente. UAF, unidades arbitrarias de fluorescencia. B: detección *in situ* de H₂O₂ por tinción con DAB. Las fotografías de microscopía óptica (40X) son representativas de tres experimentos independientes. La ausencia de acumulación de H₂O₂ se visualiza como la inexistencia de coloración marrón-rojiza en las conidias.

- **Disminución de la capacidad infectiva de las conidias tratadas con PHMG**

Como indicador de la infectividad de conidias luego de su exposición a PHMG, se evaluó la incidencia de podredumbres verde (en limones) y gris (en arándanos), en frutos inoculados con conidias tratadas durante 24 h con el compuesto (**Figura 37**). El tratamiento de *P. digitatum* con 5 y 50 ppm del polímero redujo la incidencia de podredumbre verde en 77,5% y 100%, respectivamente, con respecto al control. En el caso de *B. cinerea*, la virulencia del patógeno también se redujo, pero en menor medida que lo observado para *P. digitatum*. En este caso, la incidencia respecto al control disminuyó un 42% en el tratamiento con 5 ppm y un 83% en el tratamiento con 50 ppm. Como era de esperar, la incidencia fue nula en frutos inoculados con conidias expuestas a PHMG 500 ppm (tratamiento letal para ambos hongos).

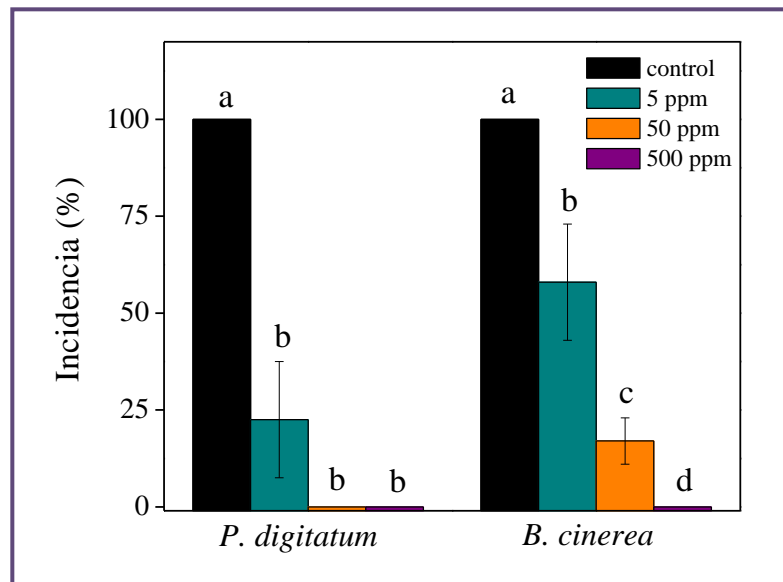


Figura 37. Capacidad infectiva de conidias tratadas con PHMG.

Incidencia de las podredumbres verde y gris en frutos inoculados con conidias previamente expuestas a PHMG por 24 h. Los valores corresponden al promedio del porcentaje de incidencia \pm DE después de un almacenamiento de 5 d (limones) y 14 d (arándanos). Para cada patógeno, diferentes letras indican diferencias significativas entre los tratamientos. Se realizaron tres ensayos independientes con cuatro repeticiones de 15 limones o 25 arándanos para cada condición.

Evaluación del PHMG para el control de podredumbre verde en limones

- Acción desinfectante

Este ensayo se realizó para comparar la efectividad del PHMG y del NaClO durante la desinfección inicial a la que se somete la fruta cuando llega al empaque. Como se observa en la **Figura 38**, las incidencias de podredumbre verde obtenidas en los tratamientos con NaClO 200 ppm en presencia y en ausencia de materia orgánica fueron significativamente diferentes entre sí, aunque no hubo diferencia significativa entre estos tratamientos y el control (tratamiento con agua). El efecto de la presencia de materia orgánica sobre la acción desinfectante del NaClO fue negativo, obteniéndose un 10% más de limones infectados que en el tratamiento con el desinfectante solo. Cuando se aplicó PHMG 500 y 1000 ppm la desinfección fue diez veces más eficaz que con NaClO. Al combinar PHMG y NaClO, la eficiencia de desinfección fue la misma que con el polímero solo. El agregado de materia orgánica a los tratamientos con PHMG no modificó la eficacia del desinfectante.

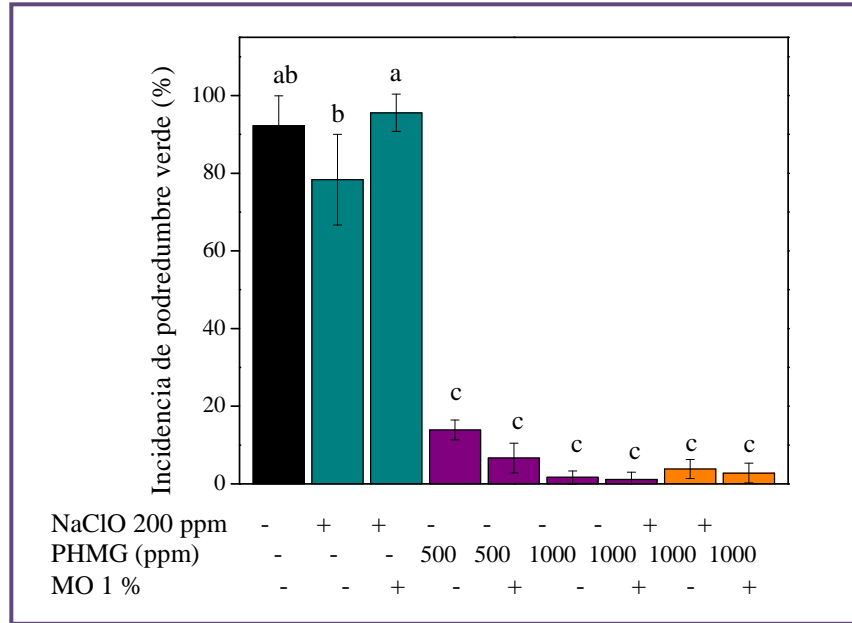


Figura 38. PHMG como desinfectante.

Se evaluó la acción desinfectante de PHMG 500 y 1000 ppm, NaClO 200 ppm y la combinación de ambos desinfectantes. Todos los tratamientos se probaron en presencia y en ausencia de materia orgánica. El control de infección consistió en limones inoculados con suspensiones conidiales tratadas con agua. Se calculó la incidencia de la enfermedad luego de 5 d de almacenamiento. Para cada condición, se realizaron cuatro replicas de 15 limones. El ensayo se repitió tres veces. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey con un valor de $p \leq 0,05$.

- Protección de heridas

Este experimento se realizó para probar el efecto de PHMG como protector de heridas en la cáscara del limón. La **Figura 39A** muestra que la incidencia de moho verde después de 5 d de almacenamiento fue significativamente menor en fruta herida y tratada con PHMG 500 y 1000 ppm, comparada con limones tratados con agua (control). La protección alcanzada en el tratamiento con PHMG a la concentración más baja ensayada fue comparable a la observada con NaHCO₃, sal utilizada actualmente en empaques para tal fin. En ambos casos, la incidencia de la podredumbre verde fue inferior al 5%. Como se observa en el *panel B*, las bandejas correspondientes a los tratamientos con bicarbonato y con el polímero se mostraron exentos de podredumbres, mientras que en la bandeja control, más de la mitad de los limones manifestaron la enfermedad con una severidad considerable.

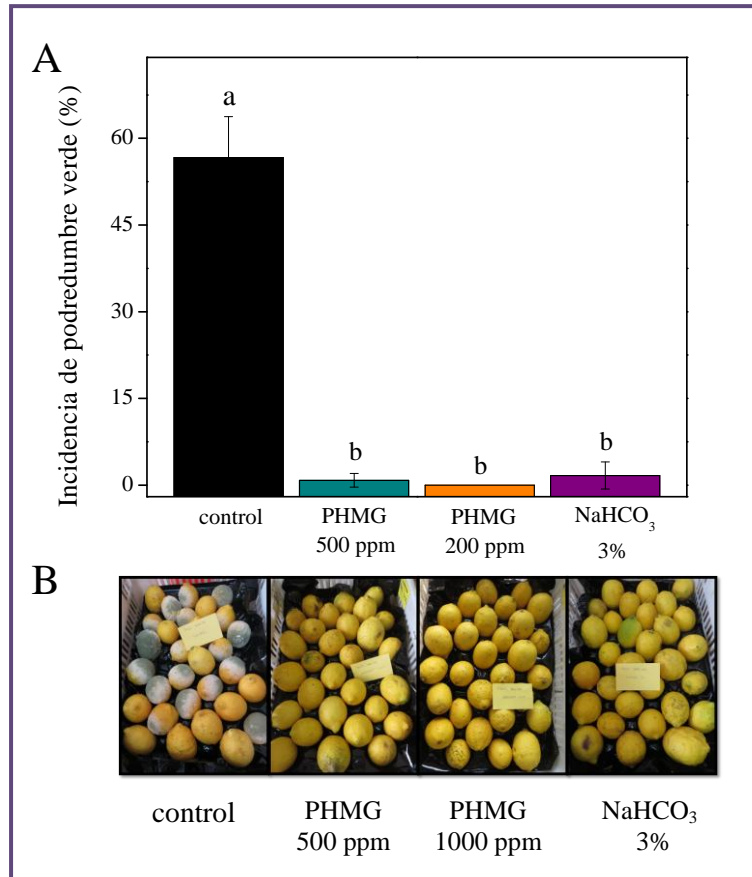


Figura 39. PHMG como protector de heridas en la cáscara de limón.

Limones heridos se sumergieron en PHMG y en NaHCO₃ a las concentraciones indicadas. Luego de 24 h de almacenamiento, los frutos se inocularon mediante inmersión en baldes conteniendo suspensiones de *P. digitatum*. El control consistió en limones tratados con agua. Para cada condición, se realizaron cuatro repeticiones de 15 limones, y el ensayo completo se repitió tres veces. A: Incidencia de la enfermedad \pm DE después de 5 d de almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey con un valor de $p \leq 0,05$. B: Fotografías representativas de cada tratamiento.

- Acción fungicida

La acción curativa del PHMG en el control de la podredumbre verde se evaluó simulando infecciones que podrían tener lugar durante la cosecha o el tránsito de la fruta hasta el empaque. Los tratamientos ensayados (PHMG 500 y 1000 ppm) dieron como resultado una incidencia de podredumbre 9-10 veces inferior que la de los controles tratados con agua (**Figura 40, panel izquierdo**). No se detectaron diferencias significativas entre las eficacias de los tratamientos con PHMG y con IMZ (fungicida comercial utilizado para controlar *P. digitatum*).

Para evaluar la acción preventiva del PHMG, limones sanos se trataron por inmersión en el compuesto y se inocularon con el patógeno luego de 24 h (*Figura 40, panel derecho*). Este diseño experimental simula aquellas infecciones que podrían ocurrir luego de que los limones recibieron las aplicaciones de fungicidas en el empaque. El PHMG no mostró acción preventiva ya que la incidencia de la enfermedad no se redujo con respecto al control. En cambio, el fungicida IMZ fue altamente eficaz, inhibiendo completamente el desarrollo de la enfermedad.

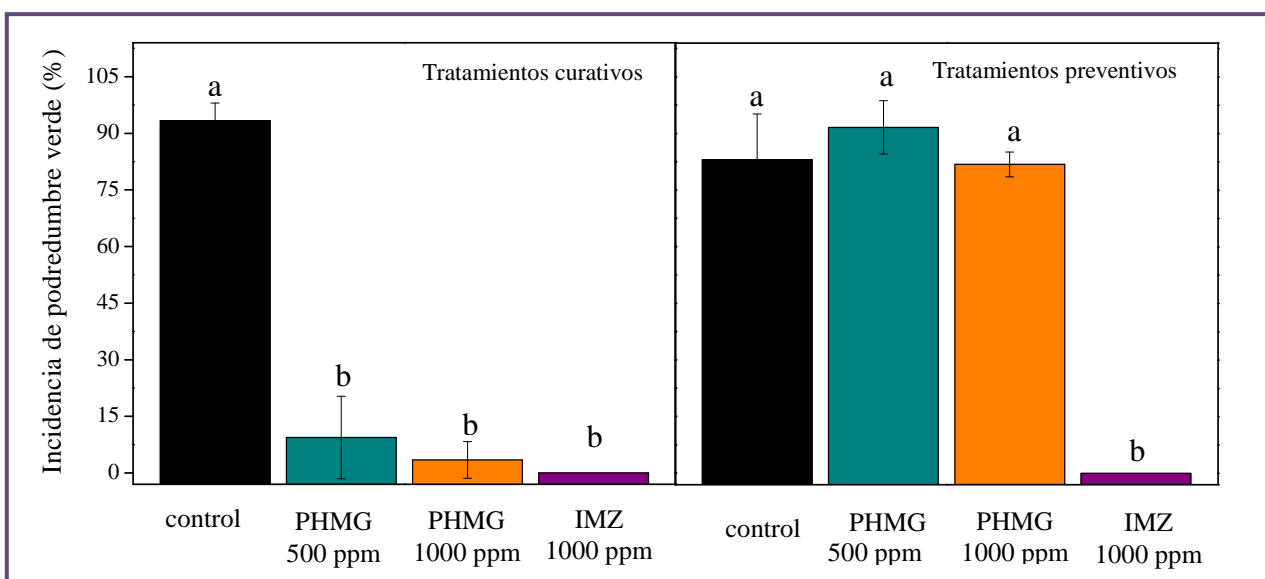


Figura 40. PHMG como fungicida contra infecciones primarias y secundarias en limones.

Los limones se trataron con agua (control), con PHMG 500 y 1000 ppm o con IMZ 1000 ppm. Se registró la incidencia a los 5 d. Para cada condición, se realizaron cuatro repeticiones de 15 limones, y el ensayo completo se repitió tres veces. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey con un valor de $p \leq 0,05$.

- Estudio de los parámetros de calidad del limón

Con el objetivo de estudiar si se modifica la calidad de los limones luego de su exposición a PHMG, se realizaron determinaciones de parámetros cuantitativos y cualitativos sobre frutos tratados con 1000 ppm del polímero y con agua (control). Los limones se almacenaron durante 45 d a 7°C, simulando el transporte marítimo de *pallets* hasta los países boreales.

Los resultados mostrados en la *Tabla 7* indican que el tratamiento con PHMG no tuvo un efecto significativo sobre el peso, el color y la firmeza de los frutos, comparados

con los valores del control tratado con agua. Asimismo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de sólidos solubles totales ni en la acidez titulable.

Tabla 7. Efecto del tratamiento con PHMG sobre los parámetros de calidad de limones

	Pérdida de peso (%)	ICC	Firmeza (kg/mm ²)	SST	Acidez Titulable (%)
control	0,99±0,32 ^a	-2,41±0,04 ^a	0,83 ± 0,17 ^a	7,55 ± 0,11 ^a	7,01 ± 0,13 ^a
PHMG	1,11±0,22 ^a	-2,38±0,02 ^a	0,84 ± 0,21 ^a	7,67 ± 0,17 ^a	7,20 ± 0,16 ^a

Los frutos fueron tratados con agua (control) y con PHMG 1000 ppm. Después de 45 d de almacenamiento a 7°C, se determinaron los parámetros de calidad indicados. Los valores corresponden al promedio ± DE de dos repeticiones de diez frutos en ensayos realizados por duplicado. Para cada parámetro, la misma letra indica que no existe diferencia significativa de acuerdo al test de Tukey con $p \leq 0,05$. ICC: Índice de color en citrus.

Evaluación del PHMG como fungicida para el control de podredumbres en arándanos

- Control de podredumbre gris en arándanos inoculados con *B. cinerea*

Para evaluar la efectividad del PHMG en el control de la podredumbre gris en arándanos, se realizó la aplicación del compuesto mediante aspersion sobre frutos infectados artificialmente con *B. cinerea* (efecto curativo). La **Figura 41** muestra la incidencia de la enfermedad luego del tratamiento y posterior almacenamiento de la fruta a 18°C durante 7 d. Al final de dicho periodo, el 87% de los arándanos tratados con agua se mostró infectado por el hongo (**Figura 41A**). El tratamiento con 500 ppm de PHMG no logró una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad con respecto al control. Cuando se aplicó un tratamiento con 1000 ppm de PHMG, la podredumbre fue parcialmente controlada dando lugar a una incidencia cercana al 75%. La máxima eficiencia de control se observó con la aplicación de 200 ppm de fludioxonil + 200 ppm de azoxistrobin. Con esta formulación se logró una reducción de podredumbres del 66% con respecto al control.

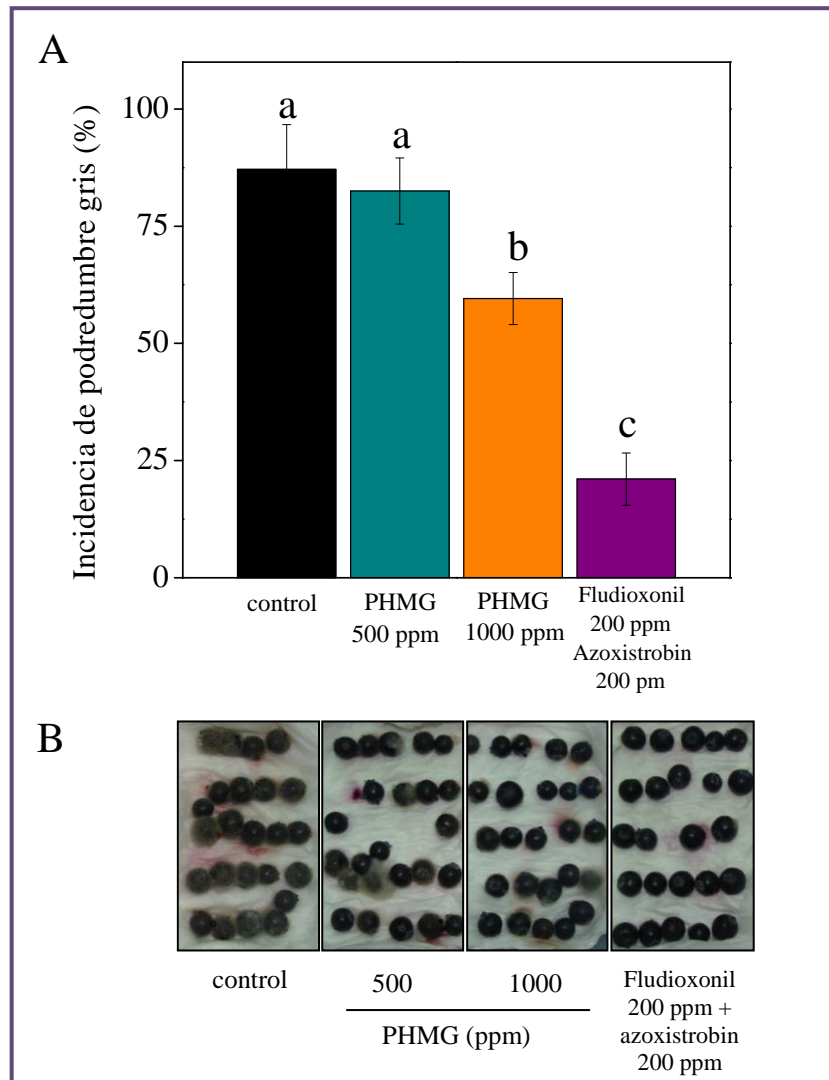


Figura 41. PHMG como fungicida en arándanos inoculados con *B. cinerea*.

Arándanos inoculados con el patógeno e incubados durante 24 h se trataron mediante aspersion con los compuestos a las concentraciones indicadas. El control consistió en arándanos tratados con agua. Los frutos se almacenaron a 18°C durante 7 d. A: Incidencia de podredumbre gris \pm DE luego del almacenamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey con un valor de $p \leq 0,05$. B: Imágenes representativas de cada tratamiento al final del almacenamiento. Para cada condición, se realizaron cuatro repeticiones de 25 arándanos, y el ensayo completo se repitió tres veces.

La **Figura 41B** muestra imágenes de las bandejas al final del almacenamiento. Si bien la incidencia se redujo solo en un 25% cuando los frutos se trataron con 1000 ppm del polímero, se observa que la enfermedad en este tratamiento tuvo un menor grado de avance comparado con el control. Por su parte, la aplicación del fungicida Graduate A resultó en escasos signos del patógeno sobre los arándanos afectados.

- Control de infecciones naturales en arándanos

Se evaluó también la efectividad del PHMG para controlar las podredumbres producidas por hongos fitopatógenos presentes naturalmente en los frutos. Para ello, arándanos recientemente cosechados se trataron con el compuesto mediante aspersión y se almacenaron simulando su transporte por vía marítima y posterior comercialización.

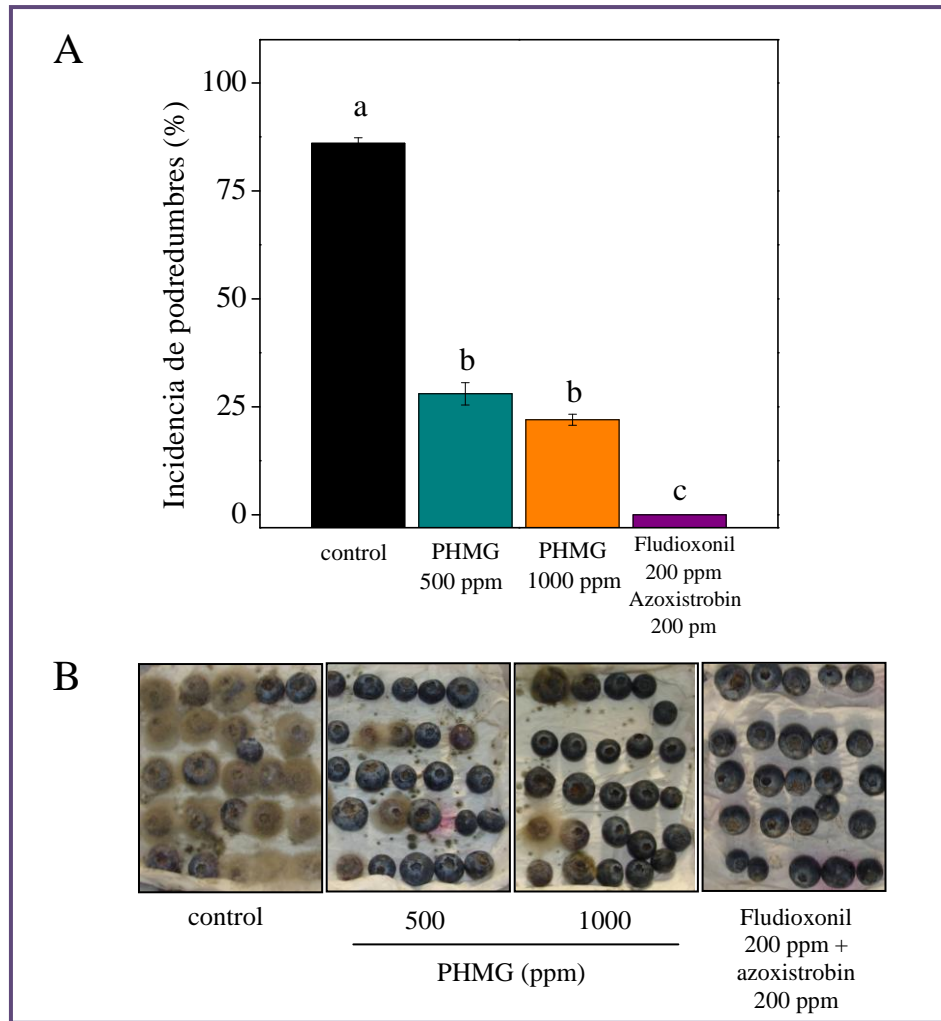


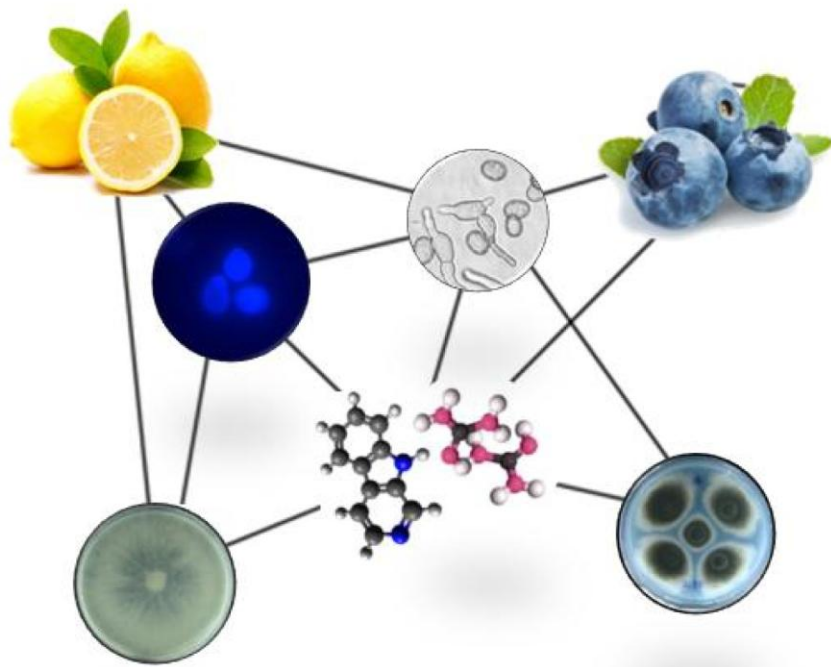
Figura 42. PHMG como fungicida en arándanos no inoculados.

Arándanos cosechados se trataron mediante aspersión con los compuestos a las concentraciones que se indican. El control consistió en arándanos tratados con agua. Los frutos se almacenaron a 2°C durante 28 d y luego a 18°C durante 7 d. A: Se muestra la incidencia de podredumbres ± DE luego del almacenamiento. Letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos según la prueba de Tukey con un valor de $p \leq 0,05$. B. Imágenes representativas de cada tratamiento al final del almacenamiento. Para cada condición, se realizaron cuatro repeticiones de 25 arándanos, y el ensayo completo se repitió tres veces.

RESULTADOS

La **Figura 42A** muestra que al final del almacenamiento, el 86% de los arándanos tratados con agua se encontraba infectado con algún patógeno. El tratamiento con PHMG a las dos concentraciones ensayadas controló las podredumbres en un 70-80%. Finalmente, los arándanos tratados con el fungicida comercial Graduate A no manifestaron podredumbres. En el **panel B** puede observarse que el hongo de mayor prevalencia fue *B. cinerea*, aunque en algunos frutos se manifestó más de una podredumbre. El grado de avance de la enfermedad en el control fue notoriamente superior al de los tratamientos con PHMG.

Los datos in vitro e in vivo reportados en el presente estudio posicionan al PHMG como un compuesto alternativo que podría ser aplicado en distintas etapas del procesamiento poscosecha de frutos de limón y arándano para el control de podredumbres. Además, debido a la que no posee un blanco específico en la célula fúngica, sería poco probable la aparición de cepas resistentes.



DISCUSIÓN

Discusión

Inhibición del crecimiento *in vitro* de *P. digitatum* y *B. cinerea*

En este trabajo de Tesis se evaluó la actividad antifúngica contra *P. digitatum* y *B. cinerea* de dos tipos de compuestos químicos: β Cs y PHMG. La acción antimicrobiana de estos compuestos ha sido previamente reportada frente a distintos microorganismos, aunque estaba poco estudiada sobre hongos filamentosos, en especial sobre fitopatógenos.

P. digitatum y *B. cinerea* son hongos fitopatógenos de conocida relevancia a nivel mundial y de gran incidencia a nivel regional. En esta Tesis se abordó por primera vez el estudio de la actividad inhibitoria de β Cs frente a dichos hongos. Los compuestos que se evaluaron fueron norharmano, harmano, harmol, harmina, harmalina y harmalol. La germinación de las conidias de ambos hongos fue inhibida por su exposición a cuatro de las seis β Cs ensayadas: norharmano, harmano, harmol y harmina (las cuales son completamente aromáticas). Por otro lado, harmalina y harmalol (dihidro- β Cs) sólo retardaron la germinación de las conidias. Estos dos grupos difieren en sus propiedades químicas y fisicoquímicas: (a) las β Cs completamente aromáticas son más ácidas que los derivados dihidrogenados, con valores de pKa de $\sim 7-8$ (Gonzalez y col., 2009a, Gonzalez y col., 2009b) y $\sim 9-10$ (Alomar y col., 2014), respectivamente, permitiendo la desprotonación de las primeras a pH neutro; (b) las β Cs completamente aromáticas son esencialmente planares y tienen la capacidad de interactuar con distintas biomoléculas, por ejemplo, como agentes intercalantes del ADN (Duportail y Lami, 1975), con constantes de unión de 100 a 1000 veces más altas que las de sus contrapartes reducidos (Taira y col., 1997); (c) el harmol fue la droga que exhibió mayor acción inhibitoria contra ambos patógenos y es justamente el compuesto de mayor polaridad entre las β Cs estudiadas. Las diferencias observadas en las actividades inhibitorias de las moléculas utilizadas para nuestros ensayos indican que la desprotonación, la capacidad intercalante en el ADN y la polaridad podrían tener influencia sobre la acción antifúngica de los compuestos. En coincidencia con nuestros resultados, en un trabajo previo realizado sobre *Aspergillus niger* se reportó que harmina y harmano (moléculas con estructura planar) exhibieron mayor actividad antifúngica que harmalina y harmalol (moléculas no planares) (Nenaah, 2010).

En nuestro sistema de estudio, el tratamiento con harmol 0,5 mM inhibió el 100% de la germinación de las conidias de ambos hongos. Sin embargo, el recuento de UFC ml⁻¹ reveló que las conidias eran capaces de reanudar su crecimiento cuando se quitaba la droga del medio. A una concentración de 1 mM de harmol, se observó un efecto fungistático para *P. digitatum* y fungicida para *B. cinerea*. Además, se determinó que la actividad antifúngica de harmol depende fuertemente del pH. En su estado protonado, el compuesto fue activo contra ambos hongos, mientras que las especies neutras, zwitteriónicas y/o aniónicas no presentaron acción inhibitoria. Este efecto podría explicarse en base a la interacción iónica que probablemente ocurre entre el harmol protonado y la superficie celular, cargada negativamente. En cambio, a pH 9, es probable que la forma aniónica de la β C y la célula se repelan o que disminuya la afinidad entre el compuesto neutro y la superficie conidial.

Por otro lado, la exposición de *P. digitatum* a 5 ppm y de *B. cinerea* a 50 ppm de PMHG provocó inhibición total de la germinación de las conidias. No obstante, una gran parte de las células presentes en estos tratamientos fueron capaces de germinar cuando se quitó el compuesto del medio de cultivo, indicando que la inhibición detectada era de tipo fungistática. La pérdida total de viabilidad de las conidias de ambos hongos se observó luego de su exposición a 500 ppm de PHMG (efecto fungicida). Previamente, se reportaron observaciones similares en *E. coli* expuesta a polihexametilen biguanidina (PHMB), observándose un efecto bacteriostático a bajas concentraciones (1-10 ppm) y bactericida a mayores concentraciones (superiores a 15 ppm) (Allen y col., 2006). Las diferencias en cuanto al rango de concentraciones ensayadas por estos autores puede deberse a que, en general, las bacterias son más sensibles que los hongos a los desinfectantes (Gunaydin y col., 2014, Seven y col., 2004). Esto se debe principalmente a las diferencias estructurales que existen entre células procariotas y eucariotas. Además, las conidias de los hongos filamentosos son estructuras altamente resistentes a los procesos de desinfección (Frison y col., 2015).

Mecanismo de acción antifúngica de harmol y PHMG

Una vez determinadas las concentraciones inhibitorias del harmol y del PHMG sobre los patógenos, se buscó caracterizar el estado morfológico y fisiológico de las conidias

luego de su exposición a los tratamientos. Las imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia revelaron que ambos compuestos afectaron la permeabilidad de la membrana plasmática y la integridad de la pared celular. El incremento de fluorescencia de la sonda SG reveló que a concentraciones sub-letales, tanto las conidias no germinadas como los tubos germinativos de aquellas que lograron iniciar el proceso de germinación, sufrieron la permeabilización de sus membranas plasmáticas. Por otro lado, al teñir las muestras con CFW se observaron puntos brillantes e incremento de fluorescencia en las conidias tratadas con harmol o con PHMG. Esto sugiere que la integridad de la pared celular se vio alterada por ambas drogas, dando lugar a la exposición de quitina, el principal polisacárido estructural de la pared (Huang y col., 2016, Kubitschek-Barreira y col., 2013). Esta es la primera vez que se informa acerca de la permeabilización de membrana plasmática y la disrupción de pared celular como consecuencias de exposición de microorganismos a harmol. Con respecto al PHMG, ya existían antecedentes acerca de estos efectos en otros microorganismos. Por ejemplo, Zhou y col. (2010) observaron que el polímero provocaba la permeabilización de la membrana plasmática de la bacteria *E. coli*, y Feng y col. (2011) reportaron distorsiones en la pared celular del hongo filamentoso *G. citri-aurantii* como consecuencia de su exposición a PHMG.

Las imágenes obtenidas mediante MET demostraron que el daño ocasionado en las conidias por ambas drogas ocurre no solo a nivel de las envolturas celulares, sino también en el medio intracelular. La exposición de las células al harmol y al PHMG provocó una severa desorganización citoplasmática, resultando imposible diferenciar organelas y núcleos en la mayoría de las muestras tratadas. Además, en todos los tratamientos se observó una notoria modificación de la forma de la conidia, pasando de ser esféricas u ovoides a adquirir formas irregulares. Este hecho es interesante ya que la pared conidial suele ser sumamente resistente. Por ejemplo, existen tratamientos con compuestos oxidantes que ocasionan severo daño intracelular y muerte de las conidias, sin que la estructura de la pared muestre signos de deterioro (Cerioni y col., 2010). Las imágenes obtenidas en nuestros ensayos con PHMG están de acuerdo con las reportadas por Razzaghi-Abyaneh y col. (2006), quienes observaron severos daños ultraestructurales en *A. parasiticus* luego de su exposición a Akacid^{® plus}, desinfectante a base de polímeros de guanidina.

En bacterias, el mecanismo mediante el cual el PHMG ocasiona la pérdida de viabilidad está bastante esclarecido y fue reportado en diversos trabajos en los se trabajó con polímeros de biguanidinas (PHMB) sobre *E. coli* y *L. innocua* (Broxton y col., 1983, Chadeau y col., 2012). Su acción letal se basa en una pérdida irreversible de componentes celulares esenciales como consecuencia directa de un daño en la membrana citoplasmática. Después de la atracción electrostática del polímero hacia la superficie celular, el polímero se une a las cabezas polares de los fosfolípidos mediante interacción iónica, lo que lleva a una modificación inicial en la fluidez de la membrana, con pérdida en la funcionalidad de las proteínas transmembrana. Todos estos eventos provocan una fuga de componentes citoplasmáticos de bajo peso molecular (por ejemplo, de iones potasio), seguida por una disrupción extensa, inmediata e irreversible de la membrana citoplasmática y pérdida de componentes macromoleculares (Broxton y col., 1983, Chawner y Gilbert, 1989, Hübner y Kramer, 2010). Es interesante resaltar que los fosfolípidos neutros no son afectados por el PHMB (Ikeda y col., 1985, Ikeda y col., 1983). Esto se considera comúnmente como la principal razón de la baja toxicidad del polímero contra las células humanas (Kramer y Roth, 2008). Los polímeros de guanidinas son estructuralmente similares a los de biguanidina, por lo que el modo de acción antes descrito podría explicar el daño ocasionado por el PHMG (Albert y col., 2003).

La capacidad infectiva de las conidias se vio severamente afectada por los tratamientos con harmol y con PHMG, observándose reducciones significativas en las incidencias de moho verde y gris en frutos inoculados con conidias tratadas respecto a los controles. Teniendo en cuenta reportes previos, la cantidad de conidias viables después de los tratamientos aplicados deberían ser suficientes para infectar limones y arándanos (Bleckwedel y col., 2017, O'Neill y col., 1997, Vilanova y col., 2012). Por esto, las bajas incidencias de podredumbres verde y gris obtenidas en nuestros ensayos podrían atribuirse a una reducción en la virulencia de los patógenos tratados con harmol y PHMG.

Se sabe que las β Cs poseen propiedades fototóxicas tras su irradiación con luz UV (Cao y col., 2007, McKenna y Towers, 1981, Mori y col., 1998). Nuestros resultados indican que la actividad antifúngica del harmol mejora notablemente cuando los tratamientos son irradiados con UV-A. En condiciones irradiadas, la completa inhibición de *B. cinerea* se logró con la mitad de la concentración de harmol que resultó efectiva en los

tratamientos no irradiados. La aplicación de luz UV con el fin de lograr un efecto letal sobre este patógeno es importante, ya que *B. cinerea* es capaz de causar enfermedad a niveles muy bajos de inóculo. Por ejemplo, se ha informado que tan solo 10 conidias presentes en la superficie de tallos de tomate pueden infectar el tejido (O'Neill y col., 1997). Con respecto a *P. digitatum*, 10^3 conidias mL^{-1} permanecieron viables después de los tratamientos irradiados. Aunque no se obtuvo un efecto letal, esta disminución es importante porque el inóculo resultante representa una masa crítica de conidias que genera incidencias de alrededor del 25% en condiciones óptimas de infección (conidias sanas, temperatura y humedad óptimas, limones heridos), mientras que el inóculo inicial (10^6 conidias mL^{-1}) infecta el 100% de los frutos en esas condiciones (Bleckwedel y col., 2017).

Una de las respuestas más tempranas a la invasión de patógenos en las plantas es la generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) tales como O_2^- , H_2O_2 y OH^\bullet . Este “estallido oxidativo” sería un evento crítico para la inhibición de patógenos (Baker y Orlandi, 1995). Por otro lado, la capacidad de algunas βCs para generar ERO bajo irradiación con UV-A ha sido previamente reportada (Gonzalez y col., 2009a, Gonzalez y col., 2009b). Por eso, resultó interesante estudiar si la inhibición de *P. digitatum* y *B. cinerea* por harmol en tratamientos irradiados y no irradiados implicaba aumentos en la producción intracelular de ERO. En tratamientos no irradiados, los valores elevados de ERO observados en *B. cinerea* tratados con harmol se correlacionan con la acción fungicida detectada. Paralelamente, no se produjo acumulación de ERO en *P. digitatum* en las mismas condiciones, lo que estaría de acuerdo con la menor toxicidad de harmol sobre este patógeno. Cuando las conidias en presencia de la βC fueron irradiadas con UV-A, la producción de ERO se incrementó notoriamente para ambos fitopatógenos. El efecto observado podría ser explicado por el mecanismo de generación de H_2O_2 propuesto por Gonzalez y col. (2009b), cuando se irradian soluciones acuosas de βCs con UV-A. Los autores plantean que durante la fotoactivación de las βCs ocurre una transferencia de electrones al O_2 , produciéndose anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) como intermediario, el cual se desproporciona espontáneamente dando lugar a H_2O_2 . Los efectos fotodinámicos pueden ser consecuencia de una reacción directa del estado excitado del harmol con biomoléculas y/o constituyentes estructurales de los microorganismos (reacciones de Tipo I) o indirectamente a través de especies reactivas de oxígeno (reacciones de Tipo II) (Foote,

1991). Reportes previos para otros derivados de β Cs sugieren que las reacciones de Tipo I serían responsables de la generación de daños (Gonzalez y col., 2010, Gonzalez y col., 2012a). Sin embargo, en vista de nuestros resultados, las reacciones de Tipo II no pueden descartarse como posible explicación de la acción fungicida del harmol. En resumen, la fotoactivación de harmol con radiación UV-A mejoró la acción fungicida de la β C, permitiendo una disminución de la dosis necesaria para inhibir los patógenos. Estos resultados proporcionan conocimiento útil para el diseño de nuevos compuestos antifúngicos basados en el esqueleto de β Cs (quimioterapia), con un comportamiento fotodinámico distintivo (terapia fotodinámica). El uso de harmol en el diseño de compuestos antifúngicos fotoactivables por UV-A representa una buena alternativa tanto para los tratamientos previos a la cosecha de los frutos (considerando el sol como fuente de UV-A) como para los tratamientos poscosecha (incluyendo lámparas UV-A en los empaques comerciales).

En conjunto, los resultados *in vitro* sugieren que la acción antifúngica de los compuestos estudiados involucra interacciones electrostáticas entre el harmol o el PHMG, ambos cargados positivamente, y la superficie de la conidia, cargada negativamente. Esto conduciría a la alteración de la integridad de las envolturas celulares, acumulación de ERO (en el caso de harmol fotoactivado), daño morfológico y colapso celular (**Figura 43**).

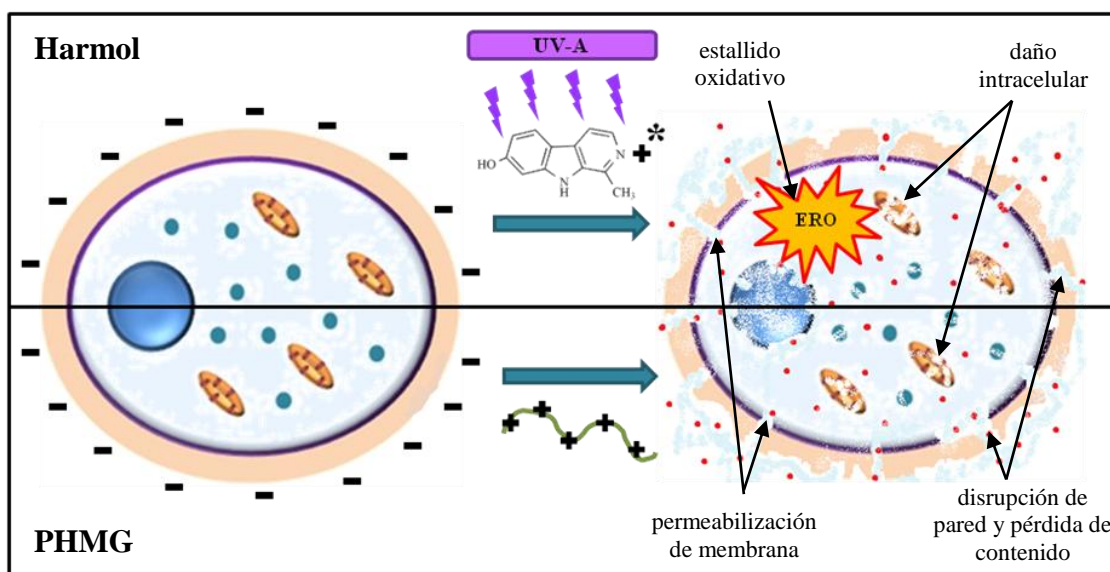


Figura 43. Esquema del daño provocado por los compuestos en la conidia. Se muestran los efectos de los tratamientos con harmol irradiado con UV-A y con PHMG, ambos cargados positivamente, sobre la conidia, cuya superficie posee carga neta negativa.

En general, los fungicidas de síntesis química tienen un sitio de acción específico sobre los patógenos. Esto lleva a que, ante reiteradas exposiciones al químico, el microorganismo desarrolle resistencia (Avenot y Michailides, 2010, Ballester y col., 2010, Kanetis y col., 2008, Kretschmer y col., 2009). Nuestros resultados sugieren que el harmol y el PHMG son compuestos de blanco de acción inespecífico que generan daño a diferentes niveles celulares. Por esto, la aparición de cepas fúngicas resistentes sería relativamente improbable.

Control de podredumbres fúngicas en frutos

En esta sección se abordaron estudios realizados para evaluar la eficacia de compuestos en el control de enfermedades fúngicas sobre frutos de limón y arándano. Debido a la escasa disponibilidad comercial de harmol para encarar ensayos a la escala necesaria (Boeira y col., 2001, Jimenez y col., 2008, Picada y col., 1997), sólo se abordó la evaluación *in vivo* del PHMG. Para ello, se siguieron distintos esquemas de aplicación los cuales simulaban las etapas de procesamiento en los empaques de cada cultivo.

- *PHMG en el proceso poscosecha de limones*

La desinfección de los productos frescos después de la cosecha es un paso crucial del manejo poscosecha (Feliziani y col., 2016). El tiempo de residencia del fruto y la concentración de desinfectante en los tanques de volcado deben ser suficientes para matar los microorganismos presentes, tanto en el agua como en la fruta. En caso de sobrevivir, las conidias de *P. digitatum* podrían infectar los frutos en las etapas de procesamiento subsiguientes (Smilanick y col., 2002). Nuestros resultados demuestran que el PHMG posee excelentes propiedades como desinfectante de limones, especialmente cuando se compara su acción con la del NaClO, tradicionalmente utilizado en los empaques para tal fin. Además, la actividad de PHMG no se vio alterada por la presencia de materia orgánica, mientras que se sabe que el NaClO en estas condiciones da lugar a subproductos orgánicos tóxicos, lo que a su vez va en detrimento de su acción desinfectante (Gelinas y Goulet, 1983, Liu y Reckhow, 2013). Operativamente, el PHMG representa una alternativa con

múltiples ventajas sobre otros desinfectantes, como por ejemplo su alta solubilidad en agua, la falta de necesidad de control del pH para su aplicación ($pK_a = 13,5$ (Guzenko y col., 2011)), su compatibilidad con otros desinfectantes y superficies (Hübner y Kramer, 2010) y su inocuidad para organismos superiores (Kramer y Roth, 2008), entre otras. Por el contrario, el cloro es conocido por su dependencia con el pH (Brown y Wardowski, 1984), y su naturaleza corrosiva y volátil (Bertolini y col., 2004). La aplicación de NaClO durante la desinfección de limones en los empaques es un requerimiento obligado ya que forma parte de una normativa propuesta y fiscalizada por el SENASA, Corenoa y Afinoa, como parte del Sistema de Mitigación de Riesgo por Etapas (Cheppi y col., 2008). Este procedimiento permite certificar fruta cítrica con mínimo riesgo cuarentenario respecto de *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*, patógeno causante de la enfermedad cuarentenaria cancrrosis. Nuestros resultados indican que la acción desinfectante del PHMG no se ve alterada en presencia de NaClO 200 ppm. Por lo tanto, sería factible la incorporación del polímero a la etapa de desinfección de la fruta sin dejar de cumplir con la normativa vigente.

El PHMG también se evaluó en cuanto a su capacidad para proteger heridas en la cáscara del limón frente a la infección por *P. digitatum*. En este sentido, el policatión demostró tener una muy buena acción protectora, comparable a la del NaHCO_3 al 3%, utilizado actualmente en los tanques de curado. Los resultados de estos ensayos sugieren que el control de la enfermedad por PHMG podría ser explicado no solamente por la acción directa del compuesto sobre el patógeno, sino que ocurrirían otros sucesos durante la interacción entre el polímero y la piel del limón herido. Se ha reportado que la protección observada en tratamientos con carbonatos y bicarbonatos está relacionada con la alcalinización de los tejidos del fruto, ya que el pH de la zona de la herida oscila adquire valores entre 8 y 10 (Prusky y col., 2004). Además, la acción del NaHCO_3 se atribuyó a la retención de residuos salinos (Smilanick y col., 1999) y a la acumulación de escoparona (Venditti y col., 2005) en el sitio de la herida. En los trabajos citados, estos efectos evidenciaron una correlación positiva con la reducción de incidencia de la enfermedad. Las soluciones acuosas de PHMG tienen un pH de 8, por lo que al menos la barrera otorgada por alcalinización de la herida podría estar presente en nuestro diseño experimental, en concordancia a lo observado por Prusky et al. (2004).

Cuando se evaluó el PHMG como fungicida poscosecha se ensayaron dos enfoques distintos. Uno de ellos consistió en investigar la eficiencia del compuesto para controlar infecciones primarias (tratamiento curativo). Estas infecciones son aquellas que ocurren entre la cosecha y el transporte de la fruta al empaque, periodo durante el cual el tejido vegetal puede sufrir heridas e infectarse con el patógeno. En este sentido, el PHMG fue capaz de reducir significativamente la incidencia de la enfermedad. A la mínima concentración ensayada (500 ppm), el polímero controló la enfermedad causada por *P. digitatum* con la misma eficiencia que 1000 ppm de IMZ, fungicida más usado en las plantas empacadoras de cítricos en todo el mundo. La potencial aplicación del PHMG en reemplazo del fungicida IMZ durante el proceso poscosecha del limón sería factible debido a la baja toxicidad reportada para los seres humanos y animales (Buxbaum y col., 2006, Wei y col., 2013) y a su alta solubilidad en agua (Rogalsky y col., 2016). Estas características representan una clara ventaja frente a los fungicidas sintéticos que son dañinos e insolubles, requiriendo cuidado especial y agitación continua durante su aplicación (Palou y col., 2009, Valencia-Chamorro y col., 2009).

Por otro lado, se evaluó la capacidad del PHMG para controlar infecciones secundarias (tratamiento preventivo). Las infecciones secundarias son las que ocurren cuando la fruta que ya recibió los tratamientos poscosecha en el empaque, es herida y expuesta al patógeno. El polímero en estudio no fue efectivo en estas condiciones, dando como resultado la misma incidencia de podredumbre verde que en frutos tratados con agua. Estos resultados indican que no persistirían residuos del compuesto sobre la superficie de la fruta. En general, los fungicidas utilizados en los tratamientos poscosecha tienen curvas de degradación lentas (Schirra y col., 2010) lo que puede representar una ventaja o una desventaja según el punto de vista que se analice. La ventaja de una degradación lenta es que el fungicida puede ejercer un efecto protector de las frutas frente a posibles infecciones post-tratamiento durante largos períodos de tiempo, lo cual permitiría la llegada de frutos sanos a puertos lejanos. La desventaja es que los países importadores de limones imponen límites cada vez más estrictos respecto de la presencia, cantidad y concentración de residuos de fungicidas en la superficie de la fruta. La transgresión de estos límites son una causa frecuente de rechazo del producto en el puerto de destino, con la consecuente pérdida económica que esto implica (D'Aquino y col., 2013b). En vista de nuestros resultados, el

PHMG, con demostrado efecto curativo pero carente de efecto preventivo, podría ser evaluado a futuro de dos maneras: en aplicaciones conjuntas con IMZ para disminuir las dosis necesarias del fungicida y complementar sus efectos, o explorar la aplicación del PHMG durante el proceso de encerado para el control de infecciones secundarias. La inclusión fungicidas químicos sintéticos como IMZ, TBZ o SOPP en la cera es una práctica común en el procesamiento poscosecha de frutos para exportación a fin de asegurar el control de podredumbres durante el traslado (Palou y col., 2015).

Con el fin de analizar si el limón tratado con PHMG sufre algún tipo de daño cosmético que disminuya su calidad, se evaluaron diferentes parámetros en frutos tratados con el compuesto y se los comparó con limones tratados con agua. Al final de un almacenamiento que simuló el envío marítimo de la fruta, no se observaron diferencias en los parámetros de calidad comercial cuando se compararon frutos tratados con PHMG y frutos control. En concreto, no hubo diferencias entre limones tratados con agua y con PHMG en cuanto a pérdida de peso, color y aspecto macroscópico. La firmeza de los frutos no se vio alterada por el tratamiento, como tampoco lo hicieron el contenido de sólidos solubles totales y la acidez titulable del jugo. Estos resultados son importantes ya que los tratamientos poscosecha, además de la reducción de la incidencia de podredumbres, no deben afectar o deben mejorar los atributos de calidad de la fruta (Mahajan y col., 2014).

En resumen, los ensayos *in vivo* demostraron que el PHMG controló eficientemente la enfermedad causada por *P. digitatum* en limones cuando se evaluó como desinfectante, protector de heridas y fungicida (**Figura 44**). Aunque se necesitan más estudios antes de su aplicación comercial, el PHMG es una alternativa prometedora para ser aplicada en distintas etapas del procesamiento poscosecha del limón en plantas de empaque.

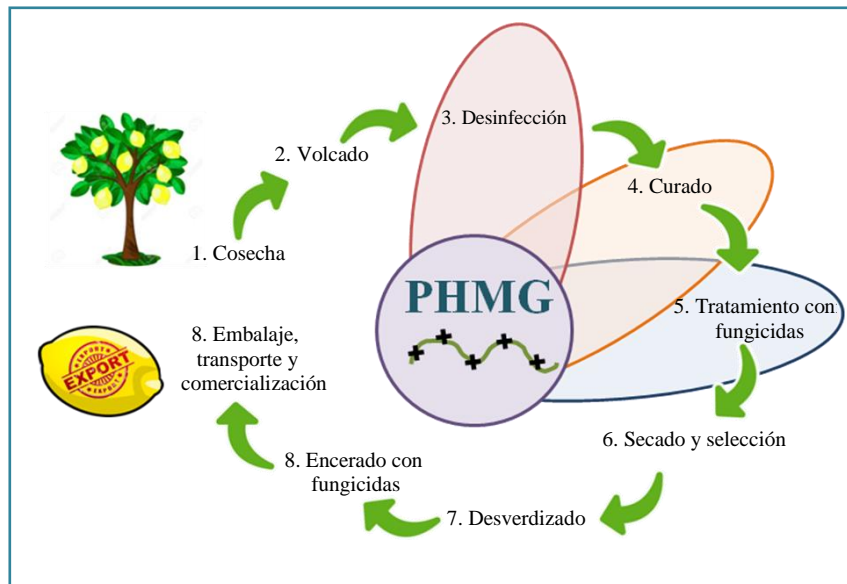


Figura 44. Etapas del procesamiento del limón en las que se propone el uso del PHMG.

Se muestran los pasos generales del procesamiento del limón y se indican las etapas en las que el PHMG fue eficiente para el control *in vivo* de la podredumbre verde.

- *PHMG en el proceso poscosecha de arándanos*

La potencial aplicación del PHMG fue también evaluada para el control de podredumbre gris en frutos de arándano. Por cuestiones inherentes a la calidad de la fruta, el arándano no se somete a tratamientos poscosecha que impliquen inmersiones; no obstante, ocasionalmente se aplican soluciones acuosas de desinfectantes mediante aspersión. Por eso, decidimos testear la acción fungicida del PHMG aplicándolo de esta manera. Cuando se trataron frutos de arándano inoculados con *B. cinerea*, se detectó una reducción significativa en la incidencia de podredumbre gris; sin embargo, no se logró su completo control. La moderada acción fungicida observada en este ensayo puede deberse a que la inoculación con una carga tan alta del patógeno podría estar subestimando la efectividad del producto. En este sentido, cuando se trataron arándanos naturalmente infectados, la efectividad del PHMG fue notoria. El PHMG fue capaz de controlar el 70-80% de las podredumbres causadas por los microorganismos fitopatógenos presentes en los frutos. Si bien la reducción obtenida demuestra que el PHMG exhibe acción fungicida *in vivo*, su aplicación debería optimizarse. Además, al ser un desinfectante de amplio espectro

podría considerarse para su potencial uso en superficies de contacto, cámaras de almacenamiento y *clamshells* en las casas de empaque.



CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Conclusiones:

- ✓ Las seis β Cs ensayadas mostraron toxicidad frente a los hongos *P. digitatum* y *B. cinerea*, de forma dosis-dependiente.
- ✓ Las β Cs completamente aromáticas (harmano, norharmano, harmina y harmol) inhibieron la germinación de conidias, mientras que los derivados reducidos (harmalina y harmalol) solo la retrasaron.
- ✓ El harmol protonado fue la especie más activa contra ambos hongos fitopatógenos, inhibiendo la germinación a una concentración de 0,5 mM. Harmol 1 mM fue fungistático para *P. digitatum* y fungicida para *B. cinerea*, respectivamente.
- ✓ El PHMG a concentraciones de 5 ppm y 50 ppm produjeron la inhibición total de la germinación de conidias de *P. digitatum* y de *B. cinerea*, respectivamente. La pérdida completa de viabilidad de las conidias de ambos patógenos se logró con un tratamiento de 24 h con 500 ppm de PHMG.
- ✓ La irradiación con UV-A de las conidias en presencia de harmol durante 30 min redujeron a la mitad la dosis necesaria para lograr la pérdida de viabilidad de *B. cinerea*.
- ✓ Para *P. digitatum*, los tratamientos con harmol fotoactivado redujeron el recuento de viables en un orden de magnitud con respecto a los mismos tratamiento sin irradiar.
- ✓ Los tratamientos con harmol y con PHMG provocaron permeabilización de membrana plasmática, disrupción de la pared celular y daño ultraestructural de las conidias de ambos aislados.
- ✓ Para *B. cinerea*, la producción intracelular de ERO aumentó significativamente en los tratamientos con harmol sin irradiar y fotoexcitado. En el caso de *P. digitatum*, solo ocurrió un aumento significativo en la acumulación de ERO cuando las conidias se trataron con harmol 1 mM fotoactivado.
- ✓ No se detectó una modificación en el contenido intracelular de ERO en conidias tratadas con PHMG.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

- ✓ Las conidias de *P. digitatum* y de *B. cinerea* pierden su capacidad infectiva sobre limones y arándanos luego de su exposición a harmol y a PHMG.
- ✓ PHMG exhibió una buena acción desinfectante de limones aún en presencia de materia orgánica. Esta acción resultó ser seis veces superior a la del NaClO a la concentración utilizada en empaque de limones.
- ✓ El PHMG a 500 ppm mostró actividad cicatrizante de heridas en la piel de los limones, comparable a la del NaHCO₃ 3%, utilizada comercialmente para tal fin.
- ✓ El polímero a una concentración de 500 ppm controló la podredumbre verde en limones a modo curativo, aunque no fue efectivo en el control preventivo de la enfermedad.
- ✓ La inmersión de limones en PHMG no provoca cambios en sus parámetros de calidad (peso, color y firmeza de los frutos, y el contenido de sólidos solubles y acidez titulable del jugo).
- ✓ Arándanos inoculados artificialmente con *B. cinerea* exhibieron menor incidencia de podredumbre gris cuando fueron tratados con PHMG a una concentración de 1000 ppm comparado con frutos tratados con agua.
- ✓ El PHMG fue eficaz en el control de podredumbres causadas por fitopatógenos presentes naturalmente en los arándanos, aunque esta eficacia fue inferior a la del fungicida Graduate A.
- ✓ El PHMG resulta un compuesto alternativo prometedor que podría ser incluido en distintas etapas del proceso poscosecha del limón y del arándano, permitiendo disminuir las dosis de los compuestos químicos comerciales que se utilizan para el control de podredumbres.

*En esta Tesis encontramos dos compuestos químicos, harmol y PHMG, que inhiben el crecimiento in vitro de los hongos fitopatógenos *P. digitatum* y *B. cinerea*. Además, el PHMG controló in vivo las podredumbres causadas por ambos hongos y representa una alternativa interesante a los fungicidas comerciales, si bien se necesitan más estudios para la optimización de su forma de aplicación. El mecanismo de acción no específico*

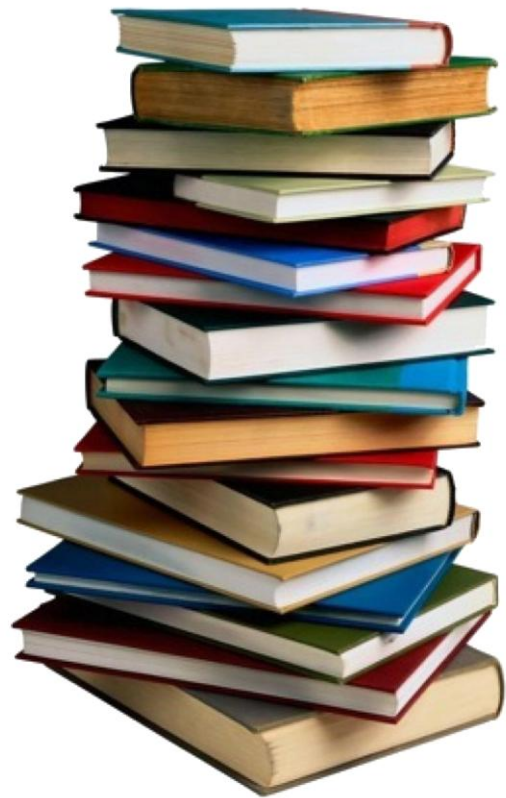
CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

determinado para este compuesto podría contribuir a la prevención de aparición de cepas de hongos resistentes, y a la preservación de la salud humana y del medio ambiente.

CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

Proyecciones:

- ✓ Evaluar la citotoxicidad de distintas concentraciones de harmol y de PHMG.
- ✓ Sintetizar derivados metilados de la molécula de harmol y evaluar si aumenta su acción antifúngica, basado en evidencias previas que demuestran que la metilación de β Cs aromáticas potencian su acción antimicrobiana.
- ✓ Evaluar la acción antifúngica de PHMG en combinación con IMZ y su posible aplicación durante el proceso de encerado, para potenciar el efecto preventivo deseado durante el transporte de limones hacia países del hemisferio norte.
- ✓ Cuantificar residuos de PHMG en la cáscara del limón y en el aceite extraído de la misma, para el posterior registro del ingrediente activo y la autorización del SENASA para su uso en la actividad citrícola.
- ✓ Ensayar la aplicación aerolizada de PHMG para la desinfección de cámaras de frío, *clamshells* y superficies de contacto en empaques de arándanos.



REFERENCIAS

Bibliografía

1. Albert M, Feiertag P, Hayn G, Saf R y Hönig H. Structure-Activity Relationships of Oligoguanidines. Influence of Counterion, Diamine, and Average Molecular Weight on Biocidal Activities. *Biomacromolecules*. [doi: 10.1021/bm0342180]. 2003 2003/11/01;4(6):1811-1817.
2. Alomar ML, Gonzalez MM, Erra-Balsells R y Cabrerizo FM. Comment on "Binding of alkaloid harmalol to DNA: photophysical and calorimetric approach". *J Photochem Photobiol B*. 2014 Jul 5;136:26-28.
3. Alomar ML, Rasse-Suriani FA, Ganuza A, Coceres VM, Cabrerizo FM y Angel SO. In vitro evaluation of beta-carboline alkaloids as potential anti-*Toxoplasma* agents. *BMC Res Notes*. 2013;6:193.
4. Allen M, White G y Morby A. The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology*. 2006;152:989-1000.
5. Anderson JP. *Botrytis cinerea* in Alaska. *Phytopathology*. 1924;14:152-155.
6. APRATUC. Enlaces de interés. 2017a.
7. APRATUC. Los arándanos argentinos apuntan a China. Noticias APRATUC. 2017b.
8. ASOEX AdEdC. Buenas prácticas de cosecha y poscosecha para arándanos 2012.
9. Avenot HF y Michailides TJ. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Protection*. 2010 2010/07/01;29(7):643-651.
10. Bachmann R. Sterilization by intense ultraviolet radiation. *The Brown Boveri Review*. 1975;62:206-209.
11. Baker CJ y Orlandi EW. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual review of phytopathology*. 1995;33(1):299-321.
12. Ballester AR, Izquierdo A, Lafuente MT y González-Candelas L. Biochemical and molecular characterization of induced resistance against *Penicillium digitatum* in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 2010 2010/04/01;56(1):31-38.

VI - REFERENCIAS

13. Bertolini L, Elsener B, Pedferri P y Polder R. Corrosion of steel in concrete: prevention, diagnosis, repair. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2004.
14. Bleckwedel F, Volentini SI y Rapisarda VA. Mecanismos genéticos asociados al desarrollo de resistencia a fungicidas en aislados locales de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*. Tucumán: Universidad Nacional de Tucumán; 2017.
15. Boeira JM, da Silva J, Erdtmann B y Henriques JA. Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacol Toxicol.* 2001 Dec;89(6):287-294.
16. Bonacia A y Danón A. Informe socioeconómico productivo de Tucumán. Tucumán, Argentina 2012.
17. Brown G y Wardowski W. Use of chlorine and chlorine dioxide in Florida citrus packinghouses to reduce inoculum of decay pathogens. *Proc Fla State Hortic Soc.* 1984;97:97-100.
18. Broxton P, Woodcock PM y Gilbert P. A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *J Appl Bacteriol.* 1983 Jun;54(3):345-353.
19. Buxbaum A, Kratzer C, Graninger W y Georgopoulos A. Antimicrobial and toxicological profile of the new biocide Akacid plus. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jul;58(1):193-197.
20. CAME. Citricultura : Estudio de la cadena de valor Buenos Aires 2015.
21. Cao R, Peng W, Wang Z y Xu A. beta-Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. *Curr Med Chem.* 2007;14(4):479-500.
22. Carbú Espinosa M. Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Puerto Real (Cádiz): Universidad de Cádiz; 2006.
23. Caruso FL y Ramsdell DC. Compendium of Blueberry and Cranberry Diseases. St. Paul, MN, USA 1995.
24. Cazzaniga A, Serralta V, Davis S, Orr R, Eaglstein W y Mertz P. The effect of an antimicrobial gauze dressing impregnated with 0.2-percent polyhexamethylene biguanide

as a barrier to prevent *Pseudomonas aeruginosa* wound invasion. *Wounds*. 2002;14:169-176.

25. Cerioni L, Rapisarda VA, Doctor J, Fikkert S, Ruiz T, Fassel R y Smilanick JL. Use of Phosphite Salts in Laboratory and Semicommercial Tests to Control Citrus Postharvest Decay. *Plant Dis*. [doi: 10.1094/PDIS-03-12-0299-RE]. 2013a 2013/02/01;97(2):201-212.

26. Cerioni L, Rapisarda VA, Hilal M, Prado FE y Rodriguez-Montelongo L. Synergistic antifungal activity of sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, and cupric sulfate against *Penicillium digitatum*. *J Food Prot*. 2009 Aug;72(8):1660-1665.

27. Cerioni L, Sepulveda M, Rubio-Ames Z, Volentini SI, Rodríguez-Montelongo L, Smilanick J, Ramallo J, y col. Control of lemon postharvest diseases by low-toxicity salts combined with hydrogen peroxide and heat. *Postharvest Biol Technol*. 2013b;83:17-21.

28. Cerioni L, Volentini SI, Prado FE, Rapisarda VA y Rodriguez-Montelongo L. Cellular damage induced by a sequential oxidative treatment on *Penicillium digitatum*. *J Appl Microbiol*. 2010 Oct;109(4):1441-1449.

29. Coley-Smith JR, Verhoeff K y Jarvis WR. *The Biology of Botrytis*. Coley-Smith JR, Verhoeff K y Jarvis WR, editors. London: Academic Press; 1980.

30. Cote S, Rodoni L, Miceli E, Concellón A, Civello PM y Vicente AR. Effect of radiation intensity on the outcome of postharvest UV-C treatments. *Postharvest Biology and Technology*. 2013;83:83-89.

31. Crisosto CH, Garner D y Basinal LM. Effect of continuous exposure to exogenous ethylene during cold storage on postharvest decay development and quality attributes of stone fruits and table grapes. *Postharvest Biology and Technology*. 2003;27(3):243-254.

32. Chadeau E, Dumas E, Adt I, Degraeve P, Noël C, Girodet C y Oulahal N. Assessment of the mode of action of polyhexamethylene biguanide against *Listeria innocua* by Fourier transformed infrared spectroscopy and fluorescence anisotropy analysis. *Canadian Journal of Microbiology*. [doi: 10.1139/w2012-113]. 2012 2012/12/01;58(12):1353-1361.

33. Chawner JA y Gilbert P. Interaction of the bisbiguanides chlorhexidine and alexidine with phospholipid vesicles: evidence for separate modes of action. *J Appl Bacteriol*. 1989 Mar;66(3):253-258.

VI - REFERENCIAS

34. Cheppi C, Patrouilleau R y Nimo M. Guía básica para exportar frutas frescas www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/.../calidad/Guias/GT-Frutas-Frescas.pdf 2008.
35. Chouvenec T, Su NY y Elliott MI. Antifungal activity of the termite alkaloid norharmaline against the mycelial growth of *Metarhizium anisopliae* and *Aspergillus nomius*. *J Invertebr Pathol.* 2008 Nov;99(3):345-347.
36. D'Aquino S, Angioni A, Suming D, Palma A y Schirra M. Residue levels, persistence and effectiveness of imazalil against a resistant strain of *penicillium digitatum* when applied in combination with heat and sodium bicarbonate. *Commun Agric Appl Biol Sci.* 2013a;78(2):139-149.
37. D'Aquino S, Fadda A, Barberis A, Palma A, Angioni A y Schirra M. Combined effects of potassium sorbate, hot water and thiabendazole against green mould of citrus fruit and residue levels. *Food Chem.* 2013b Nov 15;141(2):858-864.
38. Das S, Sahu SK, Sharma S, Nayak SS y Kar S. Clinical trial of 0.02% polyhexamethylene biguanide versus placebo in the treatment of microsporidial keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 2010 Jul;150(1):110-115 e112.
39. Davidson JF, Whyte B, Bissinger PH y Schiestl RH. Oxidative stress is involved in heat-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 May 14;93(10):5116-5121.
40. de Sebastián Palomares J. Los frutos del bosque o pequeños frutos en la cornisa cantábrica. Cantabria, España: Artes Gráficas J. Martínez; 2011.
41. Deflippi B, Robledo P y Becerra C. Manejo de cosecha y poscosecha en arándano. In: Undurraga Díaz P y Vargas Schuldes S, editors. Manual del arándano Boletín INIA N° 263. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile: Trama Impresores S.A.; 2013. p. 107-115.
42. Duportail G y Lami H. Studies of the interaction of the fluorophores harmine and harmaline with calf thymus DNA. *Biochim Biophys Acta.* 1975 Aug 6;402(1):20-30.
43. Eckert J y Brown G. Evaluation of postharvest treatments for citrus fruit. In: Hickey KD, editor. *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens.* St. Paul, MN, USA: APS Press; 1986. p. 92-97.

VI - REFERENCIAS

44. Eckert J y Eaks I. Postharvest disorders and diseases of citrus fruit. In: Reuter W, Calavan E y Carman G, editors. The Citrus Industry. Berkeley, CA, USA: University of California Press; 1989. p. 179-260.
45. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P y Delen N. Botrytis: Biology, Pathology and Control. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007.
46. Ensminger PA. Control of development in plants and fungi by far-UV radiation. *Physiologia Plantarum*. 1993;88(3):501-508.
47. Fabiani A, Martínez C y Carlazara G. Cultivo del arándano en la zona del Río Uruguay. *IDIA XXI*. 2001;1:105-111.
48. FAO. Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo - Alcance, causas y prevención. Roma2012.
49. Farias M, Torres Leal G y Felipe M. Limón: avances en la evaluación de métodos alternativos para controlar el moho verde2016.
50. FDA. Methods to reduce /eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction /elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. 2001.
51. FEDERCITRUS. La Actividad Citrícola Argentina2017.
52. Feliziani E, Lichter A, Smilanick JL y Ippolito A. Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. *Postharvest Biology and Technology*. 2016;122:53-69.
53. Feng L, Wu F, Li J, Jiang Y y Duan X. Antifungal activities of polyhexamethylene biguanide and polyhexamethylene guanide against the citrus sour rot pathogen *Geotrichum citri-aurantii* *in vitro* and *in vivo*. *Postharvest Biology and Technology*. 2011;61(2-3):160-164.
54. Foguet JL. New rootstocks for the citrus industry in Argentina. *International Citrus Congress (9th : 2000 : Orlando, Florida)*. 2003;1:56-57.
55. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol*. 1991 Nov;54(5):659.
56. Frison L, Sobrero S, Fernandez V y Basílico M. Susceptibility of black aspergilli conidia to industrial sanitizers. *International Research Journal of Public and Environmental Health*. 2015;2(6):65-69.

VI - REFERENCIAS

57. Gelinas P y Goulet J. Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic matter. *J Appl Bacteriol.* 1983 Apr;54(2):243-247.
58. Gonzalez MM, Arnbjerg J, Denofrio MP, Erra-Balsells R, Ogilby PR y Cabrerizo FM. One- and two-photon excitation of beta-carbolines in aqueous solution: pH-dependent spectroscopy, photochemistry, and photophysics. *J Phys Chem A.* 2009a Jun 18;113(24):6648-6656.
59. Gonzalez MM, Pellon-Maison M, Ales-Gandolfo MA, Gonzalez-Baro MR, Erra-Balsells R y Cabrerizo FM. Photosensitized cleavage of plasmidic DNA by norharmane, a naturally occurring beta-carboline. *Org Biomol Chem.* 2010 Jun 7;8(11):2543-2552.
60. Gonzalez MM, Rasse-Suriani FAO, Franca CA, Pis Diez R, Gholipour Y, Nonami H, Erra-Balsells R, y col. Photosensitized electron transfer within self-assembled norharmane-2'-deoxyadenosine 5'-monophosphate (dAMP) complex. *Organd Biomolec Chem.* 2012a;10:9359-9372.
61. Gonzalez MM, Salum ML, Gholipour Y, Cabrerizo FM y Erra-Balsells R. Photochemistry of norharmane in aqueous solution. *Photochem Photobiol Sci.* 2009b Aug;8(8):1139-1149.
62. Gonzalez MM, Vignoni M, Pellon-Maison M, Ales-Gandolfo MA, Gonzalez-Baró MR, Erra-Balsells R, Epe B, y col. Photosensitization of DNA by β -carbolines: Kinetic analysis and photoproducts characterization. *Org Biomol Chem.* 2012b;10:1807-1819.
63. Gunaydin M, Esen S, Karadag A, Unal N, Yanik K, Odabasi H y Birinci A. In vitro antimicrobial activity of Medilox® super-oxidized water. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials.* 2014;13:29-29.
64. Guzenko N, Gabchak O y Pakhlov E. Multilayer Films and Capsules of Sodium Carboxymethylcellulose and Polyhexamethylenguanidine Hydrochloride. Reithmaier J. PP, Kulisch W., Popov, C., Petkov P. (eds) *Nanotechnological Basis for Advanced Sensors*, editor. Dordrecht: Springer; 2011.
65. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 2006 Jun;141(2):312-322.
66. Halliwell B y Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004 May;142(2):231-255.

VI - REFERENCIAS

67. Heredia A. Evaluación de prácticas de manejo que influyen la calidad postcosecha de frutas de arándanos de la región de Salto Grande, Argentina: Universidad Nacional de Entre Ríos; 2015.
68. Holmes GJ y Eckert JW. Relative fitness of imazalil-resistant and -sensitive biotypes of *Penicillium digitatum*. Plant Dis. 1995;79:1068-1073.
69. Hongn S, Baino O y Ramallo A. Enfermedades en el cultivo de arándanos. Manual para su reconocimiento y diagnóstico. Tucumán 2011.
70. Huang L, Zhang J, Song T, Yuan L, Zhou J, Yin H, He T, y col. Antifungal curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of *Sporothrix schenckii*. Int Immunopharmacol. 2016 May;34:263-270.
71. Hübner NO y Kramer A. Review on the Efficacy, Safety and Clinical Applications of Polihexanide, a Modern Wound Antiseptic. Skin Pharmacology and Physiology. 2010;23(suppl 1)(Suppl. 1):17-27.
72. IBO IBO. Global Blueberry Statistics and Intelligence Report 2016. 2017.
73. Ikeda T, Tazuke S, Bamford C y Ledwith A. Spectroscopic studies on the interaction of polymeric in-chain biguanide biocide with phospholipid membranes as probed by 8-anilino naphthalene-1-sulfonate. Bull Chem Soc Jpn. 1985;58:705-709.
74. Ikeda T, Tazuke S y Watanabe M. Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes. 1. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. Biochim Biophys Acta. 1983;735:380-386.
75. Infoagro. El cultivo de los limones. Documentos técnicos de cultivos. <http://www.infoagro.com/citricos/limon.htm>; 2010.
76. Jiménez-Cuesta M, Cuquerella J y Martínez Jávega J. Determination of a color index for citrus fruit degreening. Proceedings of the International Society of Citriculture. 1981;2:750-753.
77. Jimenez J, Riveron-Negrete L, Abdullaev F, Espinosa-Aguirre J y Rodriguez-Arnaiz R. Cytotoxicity of the beta-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. Exp Toxicol Pathol. 2008 Aug;60(4-5):381-389.

VI - REFERENCIAS

78. Johann S, Smânia-Jr A, Pizzolatti MG, Schripsema J, Braz-Filho R y Branco A. Complete ¹H and ¹³C NMR assignments and anti fungal activity of two 8-hydroxy flavonoids in mixture. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2007;79(2):215-222.
79. Joublan J y Cordero N. Comportamiento de algunos cítricos sobre diferentes portainjertos, en su tercera temporada de crecimiento, Quillón VIII Región, Chile. *Agricultura Técnica*. 2002;62:469-479.
80. Kanetis L, Förster H, Jones CA, Borkovich KA y Adaskaveg JE. Characterization of Genetic and Biochemical Mechanisms of Fludioxonil and Pyrimethanil Resistance in Field Isolates of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology*. [doi: 10.1094/PHYTO-98-2-0205]. 2008 2008/02/01;98(2):205-214.
81. Kramer A y Roth B. Polihexanid. In: Kramer A y Assadian O, editors. *Wallhäussers Praxis der Sterilisation, Desinfektion, Antiseptik und Konservierung*. Stuttgart: Thieme; 2008. p. 789-793.
82. Kratzer C, Tobudic S, Graninger W, Buxbaum A y Georgopoulos A. *In vitro* antimicrobial activity of the novel polymeric guanidine Akacid plus. *J Hosp Infect*. 2006 Jul;63(3):316-322.
83. Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A, Walker A-S, Fillinger S, Mernke D, Schoonbeek H-J, y col. Fungicide-Driven Evolution and Molecular Basis of Multidrug Resistance in Field Populations of the Grey Mould Fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathogens*. [doi:10.1371/journal.ppat.1000696]. 2009;5(12):e1000696.
84. Kubitschek-Barreira P, Curty N, Neves G, Gil C y Lopes-Bezerra L. Differential proteomic analysis of *Aspergillus fumigatus* morphotypes reveals putative drug targets. *J Proteom*. 2013;78:522-534.
85. Kusnetsov JM, Tulkki AI, Ahonen HE y Martikainen PJ. Efficacy of three prevention strategies against legionella in cooling water systems. *J Appl Microbiol*. 1997 Jun;82(6):763-768.
86. Liu B y Reckhow DA. DBP formation in hot and cold water across a simulated distribution system: effect of incubation time, heating time, pH, chlorine dose, and incubation temperature. *Environ Sci Technol*. 2013 Oct 15;47(20):11584-11591.
87. Liu RH. Dietary bioactive compounds and their health implications. *Journal of food science*. 2013;78(s1).

VI - REFERENCIAS

88. Liu S, Shao X, Wei Y, Li Y, Xu F y Wang H. Solidago canadensis L. Essential Oil Vapor Effectively Inhibits Botrytis cinerea Growth and Preserves Postharvest Quality of Strawberry as a Food Model System. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1179.
89. Mahajan PV, Caleb OJ, Singh Z, Watkins CB y Geyer M. Postharvest treatments of fresh produce. *Philosophical transactions Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. 2014;372(2017):20130309.
90. Manual de Formación para Instructores J. Mejorando la seguridad calidad de las frutas y hortalizas frescas. http://www.jifsan.umd.edu/PDFs/GAPS_Espanol/INTRODUCCION.pdf2002.
91. Marquenie D, Geeraerd A, Lammertyn J, Soontjens C, Van Impe J, Michiels C y Nicolai B. Combinations of pulsed white light and UV-C or mild heat treatment to inactivate conidia of *Botrytis cinerea* and *Monilia fructigena*. *Int J Food Microbiol*. 2003 Aug 15;85:185-196.
92. Marquenie D, Michiels C, Geeraerd A, Schenk A, Soontjens C, Van Impe J y Nicolai B. Using survival analysis to investigate the effect of UV-C and heat treatment on storage rot of strawberry and sweet cherry. *Int J food Microb*. 2002;73:187-196.
93. McKenna DJ y Towers GHN. Ultra-violet mediated cytotoxic activity of -carboline alkaloids. *Phytochemistry*. 1981;20:1001-1004.
94. MECON MdEdIN. Producción regional por complejos productivos. Buenos Aires, Argentina2011.
95. Metz C, Oerke EC y Dehne HW. Biological control of grey mould (*Botrytis cinerea*) with the antagonist *Ulocladium atrum*. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet*. 2002;67(2):353-359.
96. Moller EM, Bahnweg G, Sandermann H y Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res*. 1992 Nov 25;20(22):6115-6116.
97. Montesanto A. Actualización en límites máximos de residuos en cítricos. Infocampocomar [serial on the Internet]. 2017.
98. Morgan R. UV 'green' light disinfection. *Industries International*. 1989;54:33-35.
99. Mori T, Nakagawa A, Kobayashi N, Hashimoto MW, Wakabayashi K, Shimoi K y Kinae N. 3-Amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) sensitizes mammalian

VI - REFERENCIAS

cells to UV radiation by causing the S-phase arrest, not by inhibiting the repair of DNA damage as observed in *Escherichia coli*. J Radiat Res. 1998 Mar;39(1):21-33.

100. Morín C. Cultivo de Cítricos. Lima, Perú: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas; 1980.

101. Nenaah G. Antibacterial and antifungal activities of (beta)-carboline alkaloids of *Peganum harmala* (L) seeds and their combination effects. Fitoterapia. 2010 Oct;81(7):779-782.

102. Nguyen CT, Kim J, Yoo KS, Lim S y Lee EJ. Effect of prestorage UV-A,-B, and-C radiation on fruit quality and anthocyanin of 'Duke' blueberries during cold storage. Journal of agricultural and food chemistry. 2014;62(5):12144-12151.

103. O'Neill TM, Shtienberg D y Elad Y. Effect of Some Host and Microclimate Factors on Infection of Tomato Stems by *Botrytis cinerea*. Plant Dis. 1997;81(1):36-40.

104. Palacios J. Citricultura. Tucumán, Argentina: Editorial Alfabeta; 2005.

105. Palou L, Smilanick JL y Crisosto CH. Evaluation of food additives as alternative or complementary chemicals to conventional fungicides for the control of major postharvest diseases of stone fruit. J Food Prot. 2009 May;72(5):1037-1046.

106. Palou L, Usall J, Munoz J, Smilanick J y Viñas I. Hot water, sodium bicarbonate and sodium carbonate for the control of green and blue mold of Clementine mandarins. Postharvest BiolTech. 2002;24:93-96.

107. Palou L, Valencia-Chamorro S y Pérez-Gago M. Antifungal Edible Coatings for Fresh Citrus Fruit: A Review. Coatings. 2015 5(4):962-986.

108. Pan J, Vicente A, Martínez G, Chaves A y Civello P. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2004;84:1831-1838.

109. Pérez Trueba G y Martínez Sánchez G. Los flavonoides como antioxidantes naturales. Acta Farmacológica Bonaerense. 2001;20:297-306.

110. Picada JN, da Silva KV, Erdtmann B, Henriques AT y Henriques JA. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. Mutat Res. 1997 Oct 06;379(2):135-149.

111. Pitt J y Hocking A. Fungi and food spoilage. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional; 1997.

VI - REFERENCIAS

112. Pringle JR. Staining of bud scars and other cell wall chitin with calcofluor. *Methods Enzymol.* 1991;194:732-735.
113. Pritts MP, Hancock JF y Strik BC. Highbush blueberry production guide. Northeastern Regional Agr Eng Serv, NRAES-55, Ithaca, NY. 1992.
114. Prusky D, McEvoy JL, Saftner R, Conway WS y Jones R. Relationship Between Host Acidification and Virulence of *Penicillium* spp. on Apple and Citrus Fruit. *Phytopathology.* [doi: 10.1094/PHYTO.2004.94.1.44]. 2004 2004/01/01;94(1):44-51.
115. Ramos L, Mellado S, Ramadan S, Bulacio L y Lopez C. The use of calcofluor white for studying *Malassezia* species by direct microscopy. *Rev Argent Microbiol.* 2006 Jan-Mar;38(1):4-8.
116. Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Kawachi M, Eslamifar A, Schmidt OJ, Schmidt A, Allameh A, y col. Ultrastructural evidences of growth inhibitory effects of a novel biocide, Akacid(plus), on an aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *Toxicon.* 2006 Dec 15;48(8):1075-1082.
117. Rigotti S, Gindro K, Richter H y Viret O. Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria xananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2002 Apr 9;209(2):169-174.
118. Rivadeneira M y Kirschbaum D. Programa Nacional Frutales - Cadena arándano. INTA. 2010.
119. Rivas P, Cassels BK, Morello A y Repetto Y. Effects of some beta-carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol.* 1999 Jan;122(1):27-31.
120. Rogalsky S, Bardeau J-F, Wu H, Lyoshina L, Bulko O, Tarasyuk O, Makhno S, y col. Structural, thermal and antibacterial properties of polyamide 11/polymeric biocide polyhexamethylene guanidine dodecylbenzenesulfonate composites. *Journal of Materials Science.* [journal article]. 2016;51(16):7716-7730.
121. Roth BL, Poot M, Yue ST y Millard PJ. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jun;63(6):2421-2431.

VI - REFERENCIAS

122. Routray W y Orsat V. Blueberries and Their Anthocyanins: Factors Affecting Biosynthesis and Properties. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2011;10(6):303-320.
123. Ruiz V, Interdonato R, Cerioni L, Albornoz P, Ramallo J, Prado F, Hilal M, y col. Short-term UV-B exposure induces metabolic and anatomical changes in peel of harvested lemons contributing in fruit protection against green mold. *J Photochem Photobiol*. 2016;159:59-65.
124. Ruiz VE, Cerioni L, Zampini IC, Cuello S, Isla MI, Hilal M y Rapisarda VA. UV-B radiation on lemons enhances antifungal activity of flavedo extracts against *Penicillium digitatum*. *LWT-Food Science and Technology*. 2017.
125. Saunt J. *Varietades de Cítricos en el Mundo*. Valencia, España: Sinclair; 1992.
126. Schirra M, Palma A, Barberis A, Angioni A, Garau VL, Cabras P y D'Aquino S. Postinfection activity, residue levels, and persistence of azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil applied alone or in combination with heat and imazalil for green mold control on inoculated oranges. *J Agric Food Chem*. 2010 Mar 24;58(6):3661-3666.
127. Schmeller T y Wink M. *Biochemistry, Ecology and Medicinal Application*. Roberts M y Wink M, editors: PlenumPress; 1998.
128. Seven O, Dindar B, Aydemir S, Metin D, Ozinel MA y Icli S. Solar photocatalytic disinfection of a group of bacteria and fungi aqueous suspensions with TiO₂, ZnO and Sahara desert dust. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2004 2004/07/15/;165(1):103-107.
129. Sharma RR, Singh D y Singh R. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*. 2009 2009/09/01/;50(3):205-221.
130. Smilanick JL, Aiyabei J, Gabler FM, Doctor J, Sorenson D y Mackey B. Quantification of the Toxicity of Aqueous Chlorine to Spores of *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii*. *Plant Disease*. [doi: 10.1094/PDIS.2002.86.5.509]. 2002 2002/05/01;86(5):509-514.
131. Smilanick JL, Margosan DA, Mlikota F, Usall J y Michael IF. Control of Citrus Green Mold by Carbonate and Bicarbonate Salts and the Influence of Commercial

VI - REFERENCIAS

Postharvest Practices on Their Efficacy. Plant Disease. [doi: 10.1094/PDIS.1999.83.2.139]. 1999 1999/02/01;83(2):139-145.

132. SSPE SdPE. Informe económico productivo - Provincia de Tucumán. Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Hacienda y Finanzas Públicas, Presidencia de la Nación 2016.

133. Staats M y van Kan JA. Genome update of *Botrytis cinerea* strains B05.10 and T4. Eukaryot Cell. 2012 Nov;11(11):1413-1414.

134. Szajdek A y Borowska E. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. Plant Foods for Human Nutrition. 2008;63(4):147-156.

135. Taira Z, Kanzawas S, Dohara C, Ishida S, Matsumoto M y 83–91. Intercalation of six beta-carboline derivatives in to DNA. Jpn J Toxocol Environ Health. 1997;43(2):83-91.

136. Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y y Collinge DB. Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. Plant J. 1997;11:1187-1194.

137. Undurraga P y Vargas S. Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chile. 2013.

138. Maximum Residue Limits (MRL) Database [database on the Internet]. Global MRL Database. 2017.

139. Valencia-Chamorro SA, Perez-Gago MB, Del Rio MA y Palou L. Curative and preventive activity of hydroxypropyl methylcellulose-lipid edible composite coatings containing antifungal food additives to control citrus postharvest green and blue molds. J Agric Food Chem. 2009 Apr 08;57(7):2770-2777.

140. Venditti T, Molinu MG, Dore A, Agabbio M y D'Hallewin G. Sodium carbonate treatment induces scoparone accumulation, structural changes, and alkalization in the albedo of wounded citrus fruits. J Agric Food Chem. 2005 May 04;53(9):3510-3518.

141. Vignoni M, Rasse-Suriani FA, Butzbach K, Erra-Balsells R, Epe B y Cabrerizo FM. Mechanisms of DNA damage by photoexcited 9-methyl-beta-carbolines. Org Biomol Chem. 2013 Aug 28;11(32):5300-5309.

142. Vilanova L, Viñas I, Torres R, Usall J, Jauset AM y Teixido N. Infection capacities in the orange-pathogen relationship: compatible (*Penicillium digitatum*) and incompatible (*Penicillium expansum*) interactions. Food Microbiol. 2012 Feb;29(1):56-66.

VI - REFERENCIAS

143. Volk R y Furkert F. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research*. 2006;161 180—186.
144. Waddell WJ. A simple ultraviolet spectrophotometric method for the determination of protein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1956;48:311-314.
145. Wei D, Zhou R, Guan Y, Zheng A y Zhang Y. Investigation on the reaction between polyhexamethylene guanidine hydrochloride oligomer and glycidyl methacrylate. *Journal of Applied Polymer Science*. 2013;127(1):666-674.
146. Wright ER, Pérez BA, Fernández RL, Ascitutto K, Rivera MC, Murillo F, Vasquez P, y col. Conocimiento actual sobre enfermedades del arándano. Buenos Aires. Argentina: Universidad de Buenos Aires 2005.
147. Xing M, Shen F, Liu L, Chen Z, Guo N, Wang X, Wang W, y col. Antimicrobial efficacy of the alkaloid harmaline alone and in combination with chlorhexidine digluconate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* grown in planktonic and biofilm cultures. *Letters in Applied Microbiology*. 2012;54:475-482.
148. Zhou ZX, Wei DF, Guan Y, Zheng AN y Zhong JJ. Damage of *Escherichia coli* membrane by bactericidal agent polyhexamethylene guanidine hydrochloride: micrographic evidences. *J Appl Microbiol*. 2010 Mar;108(3):898-907.
149. Zoratti L, Karppinen K, Escobar AL, Häggman H y Jaakola L. Light-controlled flavonoid biosynthesis in fruits. *Front plant sci*. 2014;5.