



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

APLICACIÓN DE DERIVADOS DE GERANILFENOLES Y GERANILHIDROQUINONAS LINEALES EN EL CONTROL DE *BOTRYTIS CINEREA* Y *ERWINIA CAROTOVORA* UTILIZANDO SISTEMA ENCAPSULADO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

CAMILA FRANCISCA BAY CHAILAN

PROFESORA GUÍA:
DRA. ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
DRA. BARBARA ANDREWS FARROW
DR. LUIS ESPINOZA CATALÁN

ESTE TRABAJO HA SIDO PARCIALMENTE FINANCIADO POR EL PROYECTO
FONDECYT 1120996

SANTIAGO DE CHILE
JULIO DE 2013

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE: Ingeniera Civil en Biotecnología
POR: Camila Francisca Bay Chailan
FECHA: 4 de Julio de 2013
PROFESORA GUÍA: Oriana Salazar Aguirre

APLICACIÓN DE DERIVADOS DE GERANILFENOLES Y GERANILHIDROQUINONAS LINEALES EN EL CONTROL DE *BOTRYTIS CINEREA* Y *ERWINIA CAROTOVORA* UTILIZANDO SISTEMA ENCAPSULADO

“Chile: Potencia Alimentaria y Forestal” es el nuevo *slogan* adoptado por el país y simboliza el buen escenario del sector silvoagropecuario. Sin embargo, la planta y los frutos de la vid son atacados por el hongo patógeno *Botrytis cinerea*, produciendo grandes pérdidas productivas y económicas. Nuevas oportunidades de negocio se abren con el cultivo de flores de exportación. Para cuidar que las flores permanezcan en óptimas condiciones se debe combatir el principal patógeno que enferma a estas plantas, la bacteria *Erwinia carotovora*.

Recientemente se ha demostrado que extractos de plantas, algas y esponjas marinas que contienen geranilfenoles y geranilhidroquinonas, poseen propiedades antifúngicas y antibacterianas. Debido a esto y los bajos rendimientos con que se obtienen desde la fuente natural es que se ha decidido sintetizar 6 de estos compuestos en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la UTFSM.

Se estudió el efecto de los compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2 sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Erwinia carotovora*. Además, se planteó aumentar la solubilidad de los compuestos y su efectividad contra los patógenos, mediante un sistema de encapsulamiento.

Del estudio de actividad antifúngica se obtuvo resultados prometedores para los compuestos, en particular el compuesto H1, que incluso logró porcentajes de inhibición mayores que los del producto comercial Captan, utilizando las mismas concentraciones. H1 a 250 ppm provocó una inhibición del crecimiento de *B. cinerea* del 86%. También exhibieron altos porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo, H1 a 150 ppm con 82% e I1 a 250 ppm con 81%.

Al probar la actividad antibacteriana de los compuestos también se obtuvo un buen candidato de estudio, L1. Aunque demostró tener poder bactericida contra *Erwinia carotovora* a 100 ppm y contra *Bacillus subtilis* a 50 ppm, esta actividad antibacteriana no fue estable en el tiempo. Sólo fue estable contra *Bacillus* en el caso en que la infección se realiza al mismo tiempo que la adición del compuesto.

El sistema de encapsulamiento fue efectivo en la solubilización de los compuestos pero inefectivo en su uso en pruebas biológicas. Los altos porcentajes de inhibición del crecimiento de *Botrytis* obtenidos por los compuestos sin encapsular se vieron disminuidos al utilizar los compuestos en su forma encapsulada, llegando a bajar, en el peor de los casos, desde 81% a 26% para I1 a 250 ppm. Al utilizarse el compuesto L1 encapsulado en los ensayos de actividad antibacteriana, en todos los casos, se revirtió el poder bactericida del compuesto, provocando gran proliferación de ambos patógenos, *E. carotovora* y *B. subtilis*.

Se postula que estos compuestos son muy estables dentro de la micela de encapsulamiento y su liberación es muy lenta como para ser registrada durante la duración de los experimentos. Entre las recomendaciones realizadas para estudios futuros, se hace énfasis en la necesidad de un estudio de cinética de liberación.

Se propone el compuesto H1 como componente principal de un potencial producto comercial para combatir el hongo *Botrytis cinerea*. Para el caso de la actividad antibacteriana, se debe seguir investigando para aumentar la estabilidad del compuesto L1.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis profesores que me guiaron y me ayudaron a superar los obstáculos. Muchas veces cuando no veía la solución a un problema, me dieron herramientas para dilucidarlo. Quiero agradecer especialmente a la Profesora Oriana Salazar por recibirme tantas veces bajo su alero, al Profesor Luis Espinoza por darme la oportunidad de realizar este trabajo de título y al Profesor Cristián Salgado por apoyar las iniciativas que mis compañeros y yo planteamos dentro de la Universidad. A la Profesora Ana María Ronco por su calidad humana y por creer en mí. A todas las personas que me acompañaron y ayudaron durante mi estadía en Valparaíso y el Laboratorio CB-DAL.

También quiero agradecer a mis compañeros por enseñarme cuando no entendía, por los trabajos en grupo, por los buenos momentos, por ser mis amigos. A mis compañeros de Difusión, de la Feria Empresarial, de la Semana IQBT, de ACCAN; por enseñarme lo que no se aprende en la sala de clases.

Agradecerle a la Universidad de Chile por entregarme tanto, por el conocimiento, la sabiduría, el pensamiento crítico, la rigurosidad, la ética y el liderazgo. Por entregarme los mejores recuerdos. A veces uno sufre con la exigencia de las clases, de los controles pero vibra con la ciencia. Gracias por permitirme conocer personas maravillosas, atesorar recuerdos preciosos, por hacerme una hija de Bello, una bochefiana de corazón.

Quiero agradecer a mis amigas Pau y Jo, a las niñas, Vale, Carlita, Nico, Ertty, Pía y Sofí. A los iqbttitos: Cami S., Nico L., Nico M., Lore, Maripa, Chico, Gaby, Camilo, Rachel, Rossel. Y a mi pololo Alan, por ser el más lindo y aguantar todo este proceso conmigo, por el stress y la paciencia.

Pero mientras estudiaba, disfrutaba y vivía en Santiago, allá en San Antonio estaba, está y estará mi familia apoyándome siempre y confiando en mí. Preocupados y cariñosos. Quiero agradecer a mi hermano Pablo y mi hermana Maite, a mis tatas, mis tíos, mis primos y todos los que conforman mi familia, mi clan.

Especialmente dedico este trabajo, la culminación de mi vida universitaria, a mis papás. Soy testigo de su esfuerzo y voy a agradecerles de por vida todo lo que me han entregado, los valores. Yo sé que ustedes me quieren más que nadie, y yo a ustedes. Me acompañan en todas mis decisiones, en los momentos duros siempre me dieron ánimos, siempre me dijeron que era la mejor. Eso quiero, para ustedes, ser la mejor hija para ustedes. Los amo.

TABLA DE CONTENIDO

1	Introducción
1	1.1 Antecedentes Generales
4	1.2 <i>Botrytis cinerea</i>
5	1.3 <i>Erwinia carotovora</i>
5	1.4 Geranilfenoles y Geranilhidroquinonas
8	1.5 Sistema de Encapsulamiento
9	1.6 Motivación
10	1.7 Descripción del Proyecto
11	1.8 Objetivos
11	Metodología
11	2.1 Metodología General
12	2.2 Materiales
14	2.3 Estudio I: Actividad Antifúngica
16	2.4 Estudio II: Actividad Antibacteriana
19	Resultados y Discusión
19	3.1 Estudio I: Actividad Antifúngica
27	3.2 Estudio II: Actividad Antibacteriana
34	Conclusiones
36	Recomendaciones
37	Bibliografía
42	Anexos
42	Anexo A: Protocolos
49	Anexo B: Resultados Preliminares

ÍNDICE DE TABLAS

- 20 Tabla 1: Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* a las 48 h para cada concentración de cada compuesto sin encapsular, por triplicado.
- 21 Tabla 2: Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* a las 48 h para cada concentración de cada compuesto encapsulado, por triplicado.
- 23 Tabla 3: Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* a las 48 h para cada concentración de cada compuesto sin encapsular y encapsulado. Se presenta promedio y desviación estándar.
- 26 Tabla 4: Compuestos sin encapsular a diferentes concentraciones (50, 150 y 250 ppm) ordenados desde el que posee mayor porcentaje de inhibición al que posee menor. Valores a las 48 h.
- 29 Tabla 5: Efecto del compuesto L1 sin y con encapsular contra *Bacillus* (Ba) y *Erwinia* (Er) mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias.

ÍNDICE DE FIGURAS

- 4 Figura 1: Imagen de *Botrytis cinerea* al microscopio y de los efectos que produce en vid.
- 5 Figura 2: Imagen de *Erwinia carotovora* al microscopio y de los efectos que produce en papa.
- 7 Figura 3: Compuesto 2-geranil-1,4-hidroxifenol denominado H1 y 2-geranil-1,4-hidroxifenol acetilado denominado M1.
- 7 Figura 4: Compuesto 2-geranil-1,3,5-hidroxifenol denominado I1 y 2-geranil-1,3,5-hidroxifenol acetilado denominado I5.
- 7 Figura 5: Compuesto 2-geranil-1,5,6-hidroxifenol denominado L1 y 2-geranil-1,5,6-hidroxifenol acetilado denominado L2.
- 7 Figura 6: Esquema general de la estrategia de síntesis que se utiliza para la preparación de los compuestos propuestos.
- 8 Figura 7: Esquema de una micela polimérica y ejemplo de un compuesto ingresando.
- 9 Figura 8: Estructura de sustancias Pluronic.
- 12 Figura 9: Diagrama de bloques del Trabajo de Título.
- 24 Figura 10: Efecto de los compuestos sin encapsular en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas y desviación estándar para cada concentración utilizada, agrupadas por compuesto.
- 25 Figura 11: Efecto de los compuestos encapsulados en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas y desviación estándar para cada concentración utilizada, agrupadas por compuesto.
- 25 Figura 12: Efecto de los compuestos sin encapsular en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas para cada compuesto, agrupados por concentración.
- 26 Figura 13: Efecto de los compuestos encapsulados en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas para cada compuesto, agrupados por concentración.
- 28 Figura 14: Efecto de los compuestos sin encapsular, utilizando tres concentraciones (80, 150 y 220 ppm), en el crecimiento de *E. carotovora*.
- 29 Figura 15: Efecto del compuesto L1, aplicado a diferentes concentraciones en su forma encapsulada (C/E) y sin encapsular (S/E), contra *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*.

- 31 Figura 16: Efecto, según el tiempo de exposición, del compuesto L1 en su forma encapsulada (C/E) y sin encapsular (S/E), contra *Erwinia carotovora* a 100 ppm y contra *Bacillus subtilis* a 50 ppm.
- 31 Figura 17: Efecto, según el tiempo de inoculación, del compuesto L1 en su forma encapsulada (C/E) y sin encapsular (S/E), contra *Erwinia carotovora* a 100 ppm y contra *Bacillus subtilis* a 50 ppm.
- 32 Figura 18: Efecto del Cloranfenicol y la Vancomicina contra *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*, según el tiempo de exposición.
- 33 Figura 19: Efecto del Cloranfenicol y la Vancomicina contra *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*, según el tiempo de inoculación.

INTRODUCCIÓN

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

En estos momentos Chile se encuentra en el lugar 25 de la lista de los mayores productores de frutas y vegetales del mundo (FAO, 2012) y ha adoptado el *slogan* “Chile: Potencia Alimentaria y Forestal”, debido a la intensificación de la agricultura, el crecimiento del sector y las exportaciones. En este contexto es de gran importancia mejorar los rendimientos de producción y aumentar la presencia del país en los mercados. Para mejorar los rendimientos hay varias alternativas que están siendo estudiadas para un Plan de Acción hacia el 2030, que consideran: el mejoramiento genético, el manejo predial, la cosecha y post-cosecha, los estándares y la calidad, los recursos humanos de alta calificación y los recursos laborales (MINAGRI, 2011).

Chile ha firmado Tratados de Libre Comercio (TLC) con un 52% de la población mundial y un 75% del PIB mundial (Schmidt, 2006). Para aumentar la presencia en los principales mercados de exportación chilenos, hay que considerar aquellos aspectos que son relevantes para los consumidores de esos mercados. Ya no sólo importan el precio y la presentación, sino también criterios como valor nutritivo, sustentabilidad ambiental, justicia social e inocuidad, tanto para los consumidores como para los trabajadores.

Durante el año 2011 el sector silvoagropecuario, con US\$ 4.875 MM (FOB), fue la tercera actividad que mayores utilidades por concepto de exportación generó en el país, luego de la minería y la industria (Banco Central de Chile, 2012). Durante enero y junio de 2012 los principales productos silvoagropecuarios exportados por Chile son las uvas frescas y los vinos con denominación de origen, con un 14,1% y un 8,1% de participación respectivamente (Yáñez, 2012). De la producción de uvas total, alrededor del 60% se destina a las exportaciones en fresco, mientras el porcentaje restante se distribuye entre pasas, industrias del vino y producto fresco para consumo doméstico nacional. Estados Unidos es el principal destino de la uva de mesa chilena con un 60% del volumen exportado por Chile y un 65% del valor de las exportaciones de la uva (ODEPA, 2012). Otros mercados importantes son Inglaterra, Holanda, China y Japón.

Sin embargo, el principal patógeno de la uva (*Vitis vinifera*) que limita su producción en Chile es *Botrytis cinerea*, un hongo filamentoso que puede infectar más de 200 especies de plantas (Latorre, 1986). Este hongo causa una de las peores enfermedades para la uva, la podredumbre gris, reduciendo drásticamente los rendimientos de cosecha, post-cosecha y la calidad del vino, para todo tipo de vinos blancos y tintos.

Botrytis cinerea es un patógeno cosmopolita que ataca el follaje, tallo, flores y frutos de las plantas, lo que puede resultar en serias pérdidas económicas para la agricultura. La enfermedad ocurre bajo una amplia gama de condiciones, incluso a bajas temperaturas y puede atacar a los cultivos en cualquier estado de su desarrollo (Elad, 1997).

El control de la enfermedad se puede alcanzar con la aplicación repetitiva de fungicidas acarreado el riesgo de que se produzcan cepas resistentes de *B. cinerea*. El control químico es el control más usado alrededor del mundo, afectando la producción agrícola y forestal. Ha producido un incremento en la contaminación del medio ambiente con consecuencias en la salud de la población en general y en particular para los trabajadores agrícolas. Debido a esto ha crecido la búsqueda de productos más seguros y se ha incrementado la demanda de alternativas naturales o moléculas de menor toxicidad (Elad, 1997).

Otro sector que ha crecido en Chile en el último tiempo es la producción y exportación de flores. La superficie destinada al cultivo de flores entre los años 1997 y 2007 ha aumentado casi en 50%, pasando de 1.473 ha a 2.176 ha totales (Redagrícola, 2013). Chile presenta ventajas comparativas para el cultivo de flores, debido a que posee el clima frío requerido para el crecimiento y mantenimiento de las flores, retrasando su marchitez; posee el terreno necesario para su producción, tanto en superficie como en calidad y la ventaja natural que otorga la contra estacionalidad con respecto al hemisferio norte.

Lamentablemente el mercado mundial de las flores de corte experimentó una fuerte caída en 2009 producto de la crisis mundial, sin embargo, muestra signos de recuperación en el año 2010, al crecer sus exportaciones en 3,7%. Los diez países más importantes, que representan casi el 80% del volumen mundial, aumentaron sus importaciones en un promedio de 16,3% (Alemania, Estados Unidos, Holanda, Reino Unido, Francia, Rusia, Bélgica, Japón, Italia y Polonia), debido probablemente a una recuperación de sus economías (Traub *et al*, 2012).

En este contexto Chile se ubica en el lugar 45 del ranking de exportadores de flores en el 2010, una participación no muy relevante a nivel mundial pero que podría mejorar con los años debido al potencial del país. Sin embargo, Chile se encuentra en el puesto número 4 del ranking de exportadores de bulbo en el mismo año con un 2% de participación del mercado mundial (Holanda concentra el 74% del mercado) (Molkenbuhr *et al*, 2005). Este último dato impulsa la teoría de que Chile podría alcanzar en el mediano plazo el top30 en los exportadores de flores.

Una de las flores que ha ganado relevancia en el país, es la cala (*Zantedeschia* spp.), que empezó su cultivo comercial hace un poco más de 10 años. El volumen de las exportaciones de esta flor de corte entre enero y octubre del 2005 alcanzó a los 96.750 kg, siendo los principales mercados receptores Estados Unidos y Europa, dentro de este último principalmente Holanda (Molkenbuhr *et al*, 2005). La competencia frente a los mercados internacionales es muy grande y la forma más factible de que Chile pueda tener éxito en el negocio de la floricultura es ofreciendo productos de alta calidad y con un mayor valor agregado que le permita acceder a mercados más exigentes. Hoy en día los consumidores están más informados o requieren y exigen mayor información de sus proveedores, lo que ha impulsado a los países a clasificar sus importaciones, otorgando sellos de calidad (*quality*), ecológicos (*eco*), de comercio justo (*fair trade*), de responsabilidad empresarial (*corporate social responsibility* CSR) y de sustentabilidad (*sustainable*). Para optar a estos sellos la floricultura chilena debe tener un manejo eficiente de la post-cosecha, que permita mantener las flores por el mayor tiempo posible en condiciones óptimas, tanto durante el transporte como en su destino final. En Chile existe muy poco conocimiento sobre este manejo,

por lo tanto, si se quiere llegar a los mercados externos con un producto de calidad, es necesario continuar investigando y mejorar en esta materia (Molkenbuhr *et al*, 2005).

La cala, que es cultivada en las regiones XIII, VIII, IX, XIV, X, XI y XII, es atacada por la bacteria endógena *Erwinia carotovora* y provoca una pudrición blanda y maloliente. Una vez que la enfermedad se ha establecido no hay un control efectivo, por lo que sólo queda prevenir. La prevención consiste en mantener un cultivo sano, que crezca en condiciones óptimas, tanto de temperatura como de humedad y de un suelo limpio, libre de patógenos (Chahin, 2001). Los síntomas causados por *E. carotovora* en cala son la pudrición húmeda en túberos y raíces, una errática emergencia de las plántulas, caída de las mismas y el colapso del pedúnculo de la flor cortada en post-cosecha (Welsh, 1991).

Actualmente, la papa es el cuarto alimento básico en el mundo, después del arroz, el trigo y el maíz (Rodrigues, 2004). La papa es un cultivo ampliamente difundido en casi toda la superficie cultivable de Chile, desde Tarapacá hasta Tierra del Fuego, con excelentes resultados productivos en casi todas las condiciones de la zona agrícola; sin embargo uno de los principales problemas, y con menor control, es el pie negro (en las plantas) y la pudrición blanda (en los tubérculos), enfermedad producida por la bacteria *Erwinia carotovora*. Esta enfermedad está ampliamente diseminada en el suelo y es especialmente dañina en climas húmedos típicos de la zona sur y puede aparecer en cualquier etapa del desarrollo.

Recientemente, extractos de plantas que contienen diprenilhidroquinonas han demostrado poseer propiedades antifúngicas contra *Cladosporium cladosporoides*, un hongo que afecta el trigo, y *Cladosporium sphaerospermum* (Danelutte *et al*, 2003), un invasor secundario de plantas, alimentos, suelo, pinturas y textiles. Además, otros derivados de diprenilhidroquinonas (acetilados) aislados de *Phacelia ixodes*, también repelen y en algunos casos matan insectos y patógenos de plantas (Reynolds *et al*, 1981 y Rodríguez, 1983).

Poliprenilquinonas e hidroquinonas son una importante subclase de metabolitos marinos de biosíntesis mixta. La porción prenilada de estas quinonas e hidroquinonas puede variar en largo de una a nueve unidades de isopreno y son producto de la ruta biosintética del mevalonato mientras que la estructura móvil quinona o hidroquinona se deriva del ácido shikimico. La variación en el largo de la porción prenilada de estas quinonas e hidroquinonas es lo que podría determinar la bioactividad de la molécula. El estudio se enfoca en aquellas que contienen un largo de dos unidades lineales de isopreno: diprenilfenoles, diprenilhidroquinonas y que derivan del geraniol.

Los compuestos han sido obtenidos con un bajo rendimiento de fuentes naturales. Debido a esto, las investigaciones apuntan a la obtención de los compuestos, análogos estructurales y derivados, por medio de reacciones clásicas de síntesis orgánica. Esto también permite incluir variantes estructurales. Además algunos de estos compuestos son hidrofóbicos, por lo que investigar un sistema que posibilite su solubilización en agua es de gran interés.

1.2 *BOTRYTIS CINEREA*

Este patógeno produce enzimas que degradan la pared celular y especies reactivas de oxígeno que promueven la enfermedad y maceran los tejidos vegetales (Prins *et al*, 2000). Adicionalmente, botrydial, una toxina, no específica de algún hospedero, aislada de cultivos de *Botrytis* y tejidos vegetales infectados con ésta (Colmenares *et al*, 2002), induce clorosis y colapso de la pared celular, lo que parece facilitar tanto la penetración como la colonización (Repka, 2006). Dos elicitors recientemente aislados de la pared del micelio y de filtrado del cultivo de *B. cinerea* causaron la formación de lesiones necróticas en vid que mimetizan una respuesta hipersensible típica y eventos relacionados con la apoptosis, incluyendo la condensación del protoplasto y *DNA laddering* (Dong, 1998).

Actualmente en Chile, el control de *Botrytis cinerea* se hace con fungicidas y prácticas de prevención. Algunos de ellos son: hidroxianilidas (fenhexamid), anilinoimidazoles (cypronidil y pyrimethanil), dicarboximidas (iprodione), carboxamidas (boscalid), estrobilurinas, fenilpirroles (fludioxonil), fluazinam (sólo en vides viníferas) y algunos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (Esterio, 2012). En temporadas recientes, algunos ingredientes nuevos se han incorporado como tebuconazole, y mezclas de fludioxonil con ciprodinil. También han comenzado a utilizarse biopesticidas, como Trichodex® (*Trichoderma* spp.) y Serenade® (*Bacillus subtilis*).

En este tipo de control (exceptuando los biopesticidas) se debe considerar la presencia de diferentes grupos de cepas resistentes a los fungicidas utilizados actualmente. Cepas resistentes al grupo de los benzimidazoles y a los de dicarboximidas ya han sido detectadas en Chile (Álvarez *et al*, 2000). Por lo tanto, es un factor muy importante a tomar en cuenta al elegir qué tipo de pesticida utilizar.



Figura 1: Imagen de *Botrytis cinerea* al microscopio y de los efectos que produce en vid. (Foto izquierda cortesía de W.R. Jarvis de APS Diseases of Legumes image collection on CD-Rom).

1.3 *ERWINIA CAROTOVORA*

E. carotovora es un miembro de la familia Enterobacteriaceae Gram-negativa, además de un fitopatógeno que causa una pudrición blanda en fruta, vegetales y flores. Ha desarrollado la habilidad de infectar planta a planta, a menudo utilizando vectores como moscas y abejas (Pérombelon, 1980 y Agrios, 1997). Además de ser un fitopatógeno, se ha identificado como agente responsable de la podredumbre del tallo y síntomas de marchitez vascular en plantas crecidas hidropónicamente (Schuergel *et al*, 1993). Se caracteriza por ser oportunista, aprovechándose de condiciones de estrés de la planta, como cambios en la temperatura, humedad o pH, para cambiar su condición de latente a activa. Su principal capacidad es producir grandes cantidades de enzimas pécticas que le permiten macerar tejido parenquimático de un amplio rango de especies de plantas (Smith, 1992).

Como se dijo anteriormente, la bacteria se puede diseminar por insectos, pero también puede hacerlo a través de agua de riego, maquinaria de cultivo, agua de lluvia y por usar material infectado en la propagación de plantas (Pérombelon, 1980).

Produce la muerte celular por la destrucción de la pared celular mediante la creación de una célula osmóticamente frágil. Esto lo consigue con la producción de enzimas pécticas extracelulares, como se dijo anteriormente, y celulasas que rompen la pectina y la celulosa respectivamente (Agrios, 1997).

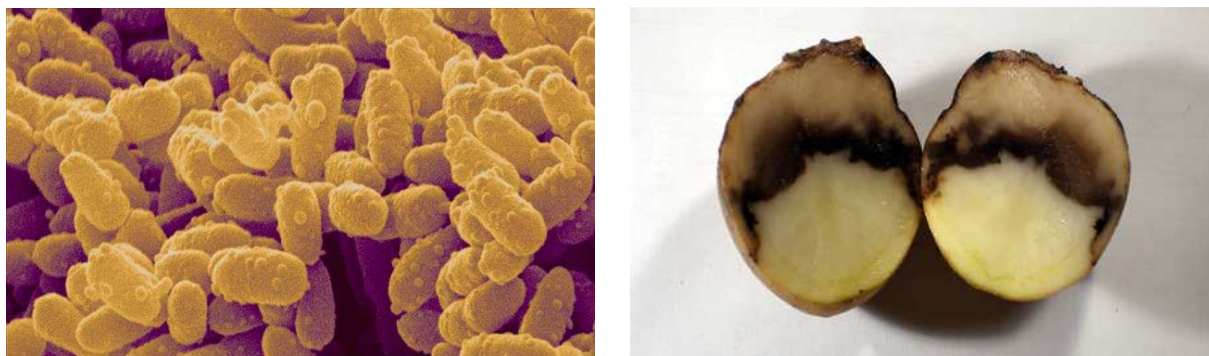


Figura 2: Imagen de *Erwinia carotovora* al microscopio y de los efectos que produce en papa. (Imagen izquierda *Erwinia carotovora* SEM Images. Ref: 18721b).

1.4 GERANILFENOLES Y GERANILHIDROQUINONAS

Las quinonas e hidroquinonas han sido aisladas de algas café de los órdenes Fucales (Ochi *et al*, 1979, Capon *et al*, 1981, Gerwick *et al*, 1981 y Faulkner, 1986), esponjas (De Rosa *et al*, 1995 y Bifulco *et al*, 1995), alcyonaceans (Bowden *et al*, 1981), gorgonaceans (Ravi *et al*, 1982), y ascidians pertenecientes al género Aplidium (Howard *et al*, 1979 y Targett *et al*, 1984). Las algas café contienen diprenil-, tripenil-, y tetraprenilquinonas e hidroquinonas. Las esponjas contienen

1,4-benzoquinonas e hidroquinonas preniladas con cadenas laterales lineales y largas de terpenoides. Ascidiacs del género *Aplidium* han alcanzado hasta una docena de quinonas preniladas y compuestos relacionados.

Algunas de las propiedades biológicas de este tipo de compuestos son: eliminación de radicales libres (Bohlmann *et al*, 1975, Son *et al*, 2002 y Li *et al*, 2003), citotoxicidad (McPhail *et al*, 2001 y Reddy *et al*, 2009), potencial antiinflamatorio (Quang *et al*, 2006), agente cardiovascular, protrombogénico, antihemorrágico (Merck, 1976), anti-malario, anti-cáncer (Vega *et al*, 2008), etc. Pero además se ha demostrado que *Piper* spp. producen compuestos con potencial antioxidante y específicamente las hidroquinonas polipreniladas han sido reconocidas por su rol como antioxidantes en la prevención de la formación de oxígeno radical y peróxido de hidrógeno que induce citotoxicidad y daño de los tejidos en varias enfermedades humanas (Tziveleka *et al*, 2002). Otra propiedad biológica interesante es la de las quinonas preniladas de *Peperomia galioides*, con una significativa actividad *in vitro* en tres especies de *Leishmania*, responsables de Leishmaniasis, y en tres cepas de *Trypanosoma cruzi*, el causante del Mal de Chagas (Mahiou *et al*, 1996).

Diprenilhidroquinonas lineales han demostrado, a través de ensayos biológicos, actividad tóxica contra *Gambusia affinis* y *Artemia salina*, actividad antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* y actividad antimicrobial contra el patógeno meticilina-resistente *Staphylococcus aureus* (De Rosa *et al*, 1994). También han demostrado ser un sensibilizador potente de la piel de cerdos de Guinea, lo que prueba ser indicadores confiables de alergenicidad en piel humana (Reynolds, 1979). Citotoxicidad contra células de ratón P338 y contra células humanas KB ha sido reportada para estos compuestos (Benslimane *et al*, 1988). Es más, geranilhidroquinonas han sido sintetizadas como drogas y se ha registrado que tienen valor radioprotector y agentes protectores anti-cáncer (Rudali, 1966 y Rudali *et al*, 1967).

La ubiquinona Q2 sirve como *redox carrier* en la cadena respiratoria mitocondrial y es el único antioxidante lípido-soluble que es sintetizado endógenamente tanto en organismos unicelulares como multicelulares (Morré *et al*, 2003). Otro tipo de diprenilhidroquinonas participan en el sistema de transporte de electrones de la membrana plasmática y el lisosoma, en la regulación de los poros de permeabilidad mitocondrial y en la modulación de β_2 integrinas que están presentes en la superficie de los monocitos en la sangre (Fontaine *et al*, 1998 y Turunen *et al*, 2002).

Los compuestos a utilizar en el estudio corresponden a geranilfenoles y geranilhidroquinonas lineales y sus estructuras se presentan a continuación.

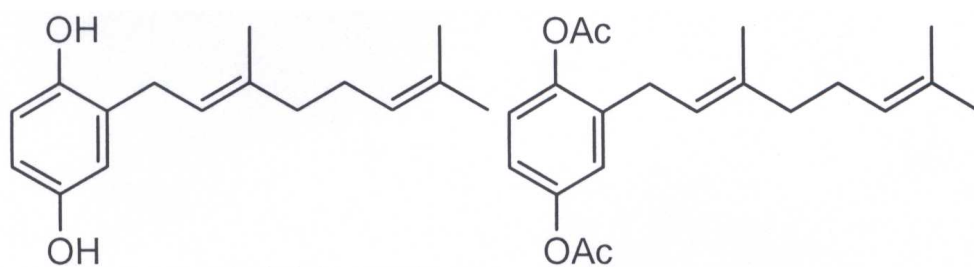


Figura 3: Compuesto 2-geranyl-1,4-hidroxifenol denominado H1 y 2-geranyl-1,4-hidroxifenol acetilado denominado M1.

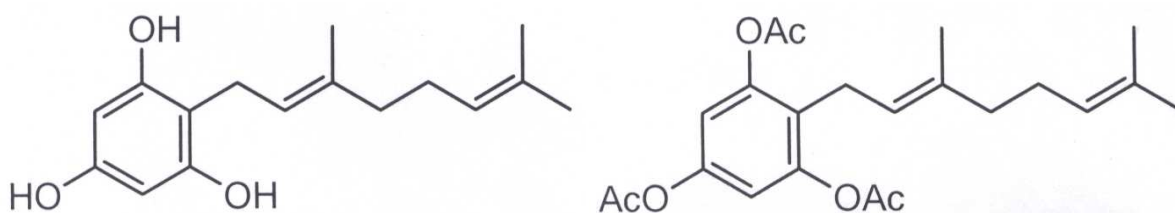


Figura 4: Compuesto 2-geranyl-1,3,5-hidroxifenol denominado I1 y 2-geranyl-1,3,5-hidroxifenol acetilado denominado I5.

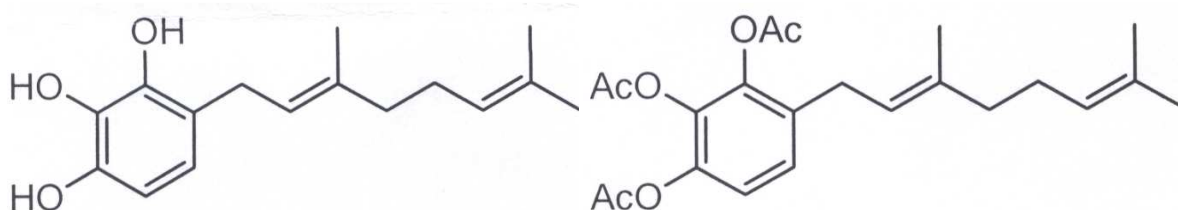


Figura 5: Compuesto 2-geranyl-1,5,6-hidroxifenol denominado L1 y 2-geranyl-1,5,6-hidroxifenol acetilado denominado L2.

Para la síntesis de estos compuestos, en el Laboratorio de Síntesis Orgánica se utiliza el método de alilación de Friedel-Crafts del núcleo aromático apropiado acoplado con geraniol en presencia del catalizador $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$. Además se introduce la sustitución en la estructura parental de un grupo acetilado. Los derivados acetilados son obtenidos por una reacción estándar de acetilación, un ejemplo de la estrategia de síntesis se presenta en la Figura 6.

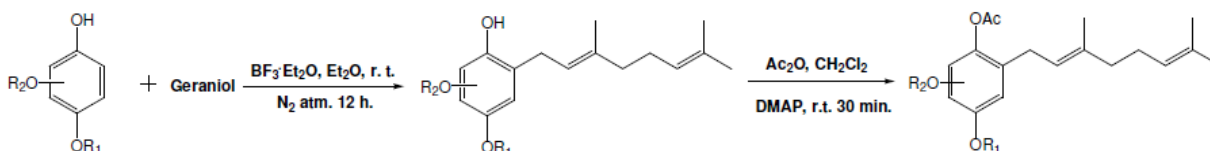


Figura 6: Esquema general de la estrategia de síntesis que se utiliza para la preparación de los compuestos propuestos.

Debido al desarrollo actual de Chile, es importante que una línea de insecticidas y repelentes naturales pueda ser desarrollada contra patógenos especialmente adaptados a plantas cultivadas en los diversos medioambientes de este país.

1.5 SISTEMA DE ENCAPSULAMIENTO

La habilidad de las micelas poliméricas de solubilizar una amplia gama de agentes ha conducido su uso como contenedores de drogas. La mayoría de las micelas poliméricas usadas en liberación de drogas son estructuras esféricas con núcleo y corteza donde los segmentos hidrofóbicos de un polímero anfifílico forman un núcleo de la micela mientras que la parte hidrofílica forma la corteza o corona. El núcleo sirve como un microambiente para la incorporación de drogas lipofílicas, mientras que la corteza ayuda a evitar la agregación de las micelas y asegurar su solubilidad (Kataoka *et al*, 2001).

La ubicación de una droga en el agregado será determinada por la hidrofobicidad, la electrostática y las interacciones específicas entre la droga y las unidades monoméricas. Así, las drogas pueden ser incorporadas al agregado polimérico por atrapamiento físico mediante una reacción para formar un conjugado (Astafieva *et al*, 1993).

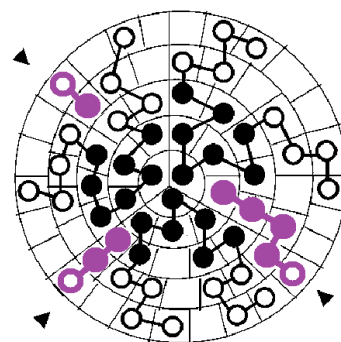


Figura 7: Esquema de una micela polimérica y ejemplo de un compuesto ingresando (color morado). Las esferas rellenas representan los segmentos hidrofóbicos y las esferas vacías los segmentos hidrofílicos.

Los copolímeros que se autoensamblan en medio acuoso son bloques de copolímeros AB o ABA, donde A y B denotan bloques hidrofílicos e hidrofóbicos respectivamente (Alexandridis *et al*, 2000). El bloque hidrofílico más usado comúnmente es el óxido polipropileno (PEO por poly(ethylene oxide)) también conocido como polietilenglicol (PEG por poly(ethylene glycol)), que tiene subunidades monoméricas $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$. Estudios citotóxicos llevados a cabo en copolímeros en bloque compuestos de PEO han mostrado que son bastante seguros, especialmente aquellos con alto contenido de PEO.

Copolímeros de tres bloques hidrosolubles de PEO y PPO (poly(propylene oxide)) están comercialmente disponibles en un rango de pesos moleculares y un radio de composición PPO/PEO. Los nombres comerciales de estos copolímeros son Poloxamers® y Pluronic®. Estas moléculas son ampliamente usadas en aplicaciones industriales como detergentes, estabilizadores de dispersión, espumantes, emulsificantes, y recientemente en solubilización y liberación controlada de drogas (Salamanca *et al*, 2007).

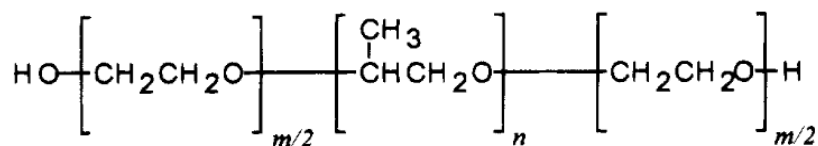


Figura 8: Estructura de sustancias Pluronic. Pluronic F127 tiene $PM=12.600$, $m=200,45$ y $n=65,17$. Es bastante hidrofílico, ya que las cadenas PEO son más largas que las cadenas PPO.

El coeficiente de partición de una molécula hidrofóbica entre la pseudo-fase micelar y la solución acuosa es una medida del grado de incorporación en las micelas (Nagarajan, 1999). Por otro lado, las drogas parecen liberarse por un mecanismo de difusión o por desintegración de las micelas (Sepúlveda *et al*, 1986).

Debido a la habilidad de las micelas poliméricas de solubilizar compuestos hidrofóbicos, se plantea investigar la utilización de un sistema de encapsulamiento para los compuestos y evaluar la actividad de éstos cuando son encapsulados.

1.6 MOTIVACIÓN

Uno de los grandes desafíos de este nuevo siglo es conseguir alimentar a la creciente población mundial, que además cada año aumenta más su esperanza de vida. En este contexto Chile se sitúa como una potencia agroalimentaria que busca alcanzar los US\$ 17.000 MM anuales en exportaciones de productos agrícolas y alimentos al año 2014 (Campos *et al*, 2011) y se propuso duplicar su exportación de frutas y alimentos procesados al año 2018 (Altman, 2011). Sin embargo, esta tarea puede ser difícil de alcanzar si se considera que en el mundo, alrededor de un 40% del rendimiento potencial global de sembrado es destruido por pestes (invertebrados, plantas, patógenos y malezas) antes de ser cosechado. Otro 20% es destruido post-cosecha (Bailey, 2011).

Al año 2011, el SAG declara registrados 1.020 pesticidas en Chile, de los cuales 117 pueden considerarse “insumos ecológicos” (MINAGRI, 2011). La producción limpia representa una oportunidad dentro del sector y para conseguirla se deben desarrollar prácticas agrícolas amigables con el medio ambiente. Estas prácticas incluyen el uso de biopesticidas y biofertilizantes, manejo integrado de plagas y agentes de control biológicos. También hay que considerar tratados firmados por el país, por ejemplo, el de Montreal que prohíbe el uso de bromometano para el año 2015 (CIESIN, 2012).

Una alternativa al uso de agroquímicos, es el uso de sustancias naturales llamadas por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA en inglés), pesticidas bioquímicos (EPA, 2012). Estas sustancias, que se encuentran en diferentes tejidos de numerosas plantas, parecen tener el mayor potencial para ser usados en prácticas agrícolas amigables con el medio ambiente.

1.7 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

El grupo de Productos Naturales del Departamento de Química de la Universidad Técnica Federico Santa María (UTFSM) ha estado trabajando en los últimos 5 años en la búsqueda de soluciones basadas en tecnología limpia para el control de plagas. Para investigar sus posibles usos, han sintetizado numerosas sustancias, que normalmente son difíciles de aislar o se encuentran en concentraciones muy bajas en plantas, algas y líquenes.

El grupo de Biología Molecular en Plantas del Centro de Biotecnología Dr. Daniel Alkalay Lowitt (CB-DAL) perteneciente a la UTFSM a cargo del Dr. Hugo Peña Cortés, está analizando la actividad biológica de varios productos naturales aislados de plantas nativas chilenas, entre otras investigaciones.

Geranilfenoles y geranilhidroquinonas naturales han estado implicadas, con una notable bioactividad, en el control de patógenos. Estos resultados sugieren que estos compuestos y sus derivados, dependiendo de la estructura química, pueden ser moléculas importantes para el control de patógenos en diferentes plantas, solucionando parte de los problemas fitosanitarios de la uva de mesa y uva de vino.

En esta línea es que se plantea investigar los geranilfenoles y geranilhidroquinonas para impedir el crecimiento de *Botrytis cinerea* en frutas, en especial en vid, con miras a contribuir con nuevos conocimientos al desarrollo de pesticidas amigables con el medio ambiente y los trabajadores. Además de plantear una posible actividad antibacteriana contra el patógeno *Erwinia carotovora* que amenaza el mercado interno de la papa y la exportación de calas.

Los compuestos son sintetizados en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la UTFSM y proporcionados por el Dr. Luis Espinoza Catalán. Luego son llevados al CB-DAL para estudiar el efecto en el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Erwinia carotovora* de forma de otorgar protección a las plantas. Estas propiedades podrían ser usadas en el control de enfermedades de las plantas y llegar a desarrollar un producto que pueda ser utilizado en los cultivos nacionales y mitigar los efectos mencionados con anterioridad. Por esto, el interés es examinar si los compuestos sintetizados son capaces de afectar la actividad en el crecimiento de estos patógenos.

Los recursos son proporcionados por FONDECYT a través del proyecto “Synthesis of Linear Diprenylhydroquinones Derivatives and Biological Activity in Encapsulated System. Application for the Control of Plant Pathogen Fungus *Botrytis cinerea* in Plant Tissues” ID 1120996.

1.8 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* y antibacteriana contra *Erwinia carotovora* de 6 compuestos geranilfenoles y geranilhidroquinonas lineales obtenidos por hemisíntesis orgánica y la actividad de su forma encapsulada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

ANALIZAR el efecto de los compuestos, sin encapsular y encapsulados, en el crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas con medio gel.

ANALIZAR el efecto de los compuestos, sin encapsular y encapsulados, en el crecimiento de *Erwinia carotovora* en medio líquido.

EVALUAR la utilización de un sistema de encapsulamiento en los compuestos respecto a su efecto contra ambos patógenos.

METODOLOGÍA

2.1 METODOLOGÍA GENERAL

Los experimentos fueron realizados en el Centro de Biotecnología Dr. Daniel Alkalay Lewitt de la Universidad Técnica Federico Santa María en la ciudad de Valparaíso. El trabajo se divide en dos estudios: el estudio de la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* en presencia de los compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2 con y sin encapsular (Estudio I) y el estudio de la inhibición del crecimiento de *Erwinia carotovora* en presencia de los mismos compuestos con y sin encapsular (Estudio II).

En el Estudio I se realizó un Test de Difusión que consiste en medir el halo de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en presencia de un compuesto en su estado encapsulado y sin encapsular. La *Botrytis* se inoculó en una placa con medio PDA y el compuesto a 50, 150 y 250 ppm y se registró su crecimiento hasta que el Control Positivo 1 alcance los bordes de la placa.

En el Estudio II se realizó un *screening* de los diferentes compuestos y/o concentraciones de éste con y sin encapsular, para observar si existía actividad antibacteriana contra cierto patógeno. En este caso *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*.

Debido a que los compuestos no son solubles en agua, se utilizó etanol para solubilizarlos en el caso de los experimentos sin encapsular y se utilizaron micelas poliméricas con interior hidrofóbico y exterior hidrofílico para el caso de compuestos encapsulados.

Para realizar el encapsulamiento se usó el método de emulsión de aceite en agua (O/W por sus iniciales en inglés). En este caso, el compuesto es disuelto en un solvente volátil, diclorometano, y añadido a la solución acuosa de micelas poliméricas. Se usó una solución de Pluronic F127 para preparar las micelas. Mediante calor y agitación usados alternadamente el compuesto ingresa a las micelas y todo el diclorometano es evaporado.

En la Figura 9 se puede ver un diagrama de bloques del esquema de trabajo durante la fase experimental.

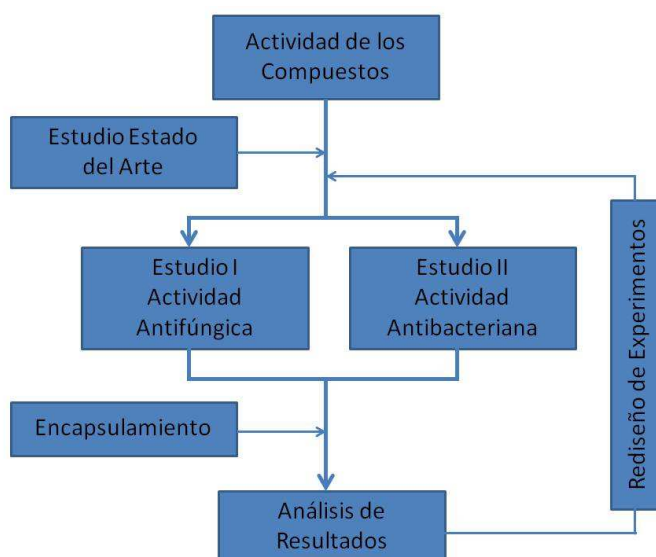


Figura 9: Diagrama de bloques del Trabajo de Título.

2.2 MATERIALES

REACTIVOS

- Compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2, sintetizados en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de la UTFSM
- Pluronic F127, Invitrogen
- Captan, Anasac

- Medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar), Sigma-Aldrich y Merck
- Medio de Cultivo LB (Luria Bertani), preparado en el laboratorio
- Cloranfenicol, Sigma-Aldrich
- Vancomicina, Sigma-Aldrich
- Diclorometano
- Etanol
- Estándar de McFarland 0,5; preparado en el laboratorio

EQUIPOS

- Cámara de flujo laminar, NuAire
- Cámara fotográfica, Nikon Coolpix P510
- Autoclave
- Estufa
- Lupa binocular
- Cámara de cultivo con fotoperiodo controlado
- Lector de placas de 96 pocillos, Biorad Model 550
- Incubadora con control de temperatura y agitación
- Agitador magnético con estufa

MATERIAL DE LABORATORIO

- Agua desionizada y agua mQ
- Alcohol
- Bisturí, pinzas y sacabocado
- Espátula de metal y varilla de vidrio
- Papel craft, elásticos, cinta adhesiva y marcador
- Guantes de látex, Cranberry
- Film de laboratorio, Parafilm
- Tubos de vidrio 5 ml
- Microtubos 1,5 y 2 ml, Axygen
- Tubos 15 y 50 ml, BD Falcon
- Placas petri estériles
- Frascos y vasos precipitados, Schott Duran
- Pipetas plásticas estériles 5 y 10 ml
- Micropipetas, Transferpette y Rainin
- Puntas plásticas para micropipeta, Axygen
- Placas para cultivo de 12 pocillos estériles y placas para lectura de 96 pocillos estériles, TPP
- Jeringa 5 ml, BD
- Filtro para jeringa, Millipore
- Pesa, Sartorius
- Termómetro de mercurio
- Mechero
- Gradillas
- pHmetro
- Vórtex

- Microondas y refrigerador

PROGRAMAS COMPUTACIONALES

- Microsoft Office Word
- Microsoft Office Excel
- Microsoft Office PowerPoint
- Microsoft Office Picture Manager
- Microsoft Office Visio

2.3 ESTUDIO I: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

CRECIMIENTO DE *BOTRYTIS CINEREA*

Para observar el crecimiento del hongo, éste cultivó en placas con medio de cultivo PDA agar (ver preparación en Anexo A), que posee los requisitos nutritivos para *B. cinerea*. Además al utilizar un medio que gelifica, se pueden añadir compuestos mientras el medio se encuentra líquido y asegurarse de que el compuesto queda bien distribuido en el medio, de esta forma posteriormente estudiar los posibles cambios en el crecimiento del hongo.

Se realizó un Test de Difusión que consiste en medir el halo de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en presencia de un compuesto. En este caso un compuesto en su estado encapsulado y sin encapsular.

Botrytis se inoculó en una placa con medio PDA y el compuesto a 50, 150 y 250 ppm y se registró su crecimiento hasta que el Control Positivo 1 alcanzó los bordes de la placa. Se utilizaron los compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2 y además se usaron los controles:

- Control Positivo 1, con respecto al crecimiento de *Botrytis* (*Botrytis* en medio PDA).
- Control Positivo 2, con respecto a la acción de los compuestos (*Botrytis* en medio PDA con Captan a 400 ppm).
- Control Negativo 1, con respecto a la acción de los compuestos (*Botrytis* en medio PDA con etanol 1,1% para el test sin encapsular y *Botrytis* en medio PDA con 250 µl de Pluronic F127 para el test con encapsular).

Las concentraciones de los compuestos se determinaron por recomendación de Lautaro Taborga y el Dr. Luis Espinosa de acuerdo a ensayos *in vitro* realizados en el Laboratorio de Síntesis Orgánica, con compuestos de similar estructura. Los compuestos utilizados en esa oportunidad para medir actividad antifitopatogénica fueron terpenfenoles entre 50 y 500 µM. Los hongos contra los que se midió actividad fueron *B. cinerea*, *G. fujikuroi* y *P. cinnamomi*, que atacan a cultivos de interés comercial. En el caso del Captan, se utilizó la concentración 400 ppm, ya que ésta es la dosis antifitopatogénica recomendada por el proveedor.

INOCULACIÓN CON *BOTRYTIS CINEREA*

Para trabajar con el hongo *B. cinerea*, éste debe permanecer almacenado en una placa de cultivo en refrigeración y replicarse cada cierto tiempo en una nueva placa. Cuando se va a utilizar en un ensayo, 72 horas antes de empezar el experimento, *Botrytis* se replica desde una placa anterior, extrayendo un pequeño trozo de la placa antigua y poniéndolo en el centro de la placa nueva. Las placas nuevas a utilizar son puestas en cámaras de cultivo con fotoperiodo controlado bajo un régimen de 16/8 horas de luz/oscuridad a 20°C. El objetivo de este procedimiento es tener material fresco, sin esclerocio ni micelio para apreciar el crecimiento de conidióforos.

Cuando se inocularon las placas que contienen los compuestos y los controles, a la placa que tenía 72 horas se le cortaron discos de 3 mm de diámetro y se colocaron al centro de las nuevas placas. Procedimiento en cámara de flujo laminar y con objetos estériles. Debido a que el medio PDA contiene nutrientes, se debió evitar todo tipo de contaminación.

MEDICIÓN DEL HALO DE CRECIMIENTO

Cada 24 horas y hasta que el hongo alcanzó el borde de la placa Control Positivo 1 se monitoreó el halo de crecimiento del hongo en cada placa.

Se tomaron fotografías de alta resolución a cada placa con una cámara Nikon Coolpix P510, luego las fotografías se observaron con la herramienta Microsoft Office Picture Manager. En este programa se puede medir en pixeles el halo de crecimiento y conociendo el diámetro de la placa en centímetros, se puede convertir la medida del halo de pixeles a centímetros mediante una regla de tres. Para esto los datos se ingresaron a una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel.

$$\text{Diámetro halo (cm)} = \frac{\text{diámetro halo (pixeles)} \cdot \text{diámetro placa (cm)}}{\text{diámetro placa (pixeles)}}$$

Luego se calculó el área de crecimiento de cada hongo. Dado que el crecimiento del hongo es radial, forma una circunferencia.

$$\text{Área de crecimiento (cm}^2\text{)} = \pi \cdot \left(\frac{\text{diámetro halo (cm)}}{2}\right)^2$$

El porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo en una placa se calculó con respecto al crecimiento del hongo en la placa Control Positivo 1.

$$\begin{aligned} &\text{Inhibición del crecimiento (\%)} \\ &= \frac{\text{área crecimiento Control Positivo 1} - \text{área crecimiento placa}}{\text{área crecimiento Control Positivo 1}} \cdot 100 \end{aligned}$$

Cabe mencionar que el 100% de inhibición no puede ser logrado, ya que al inocular se utiliza un disco de 3 mm de diámetro, por lo que el máximo porcentaje de inhibición posible es 99,64%.

2.4 ESTUDIO II: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

CRECIMIENTO DE *ERWINIA CAROTOVORA* Y *BACILLUS SUBTILIS*

Ambas bacterias se cultivaron en medio de cultivo LB (ver preparación en Anexo A) y se debieron realizar todos los procedimientos en condiciones de asepsia y evitando cualquier contaminación, ya que el medio puede contaminarse con facilidad con otras bacterias presentes en el ambiente.

Se realizó un *screening* de los diferentes compuestos para observar si existe actividad antibacteriana contra cierto patógeno. En este caso *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*, este último utilizado como control. Debido a la rápida proliferación que presentan las bacterias, el monitoreo del crecimiento de éstas fue de 24 horas. Para medir el crecimiento bacteriano se midió la turbidez del medio de cultivo mediante densidad óptica.

En un experimento preliminar se probaron los compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2 a 80, 150 y 220 ppm contra *Erwinia*. El resultado de este experimento preliminar mostró que el compuesto con mayor potencial antibacteriano era L1, por lo tanto debía ser estudiado. En el ensayo de actividad antibacteriana se utilizó el compuesto L1 a 50, 100, 150 y 200 ppm, y se usaron los controles:

- Control Positivo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (*E. carotova* en medio LB).
- Control Positivo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Cloranfenicol a 500 ppm).
- Control Positivo 3, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Vancomicina a 500 ppm).
- Control Negativo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (medio LB sin inóculo).
- Control Negativo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con etanol 1,1% para el test sin encapsular y *E. carotovora* en medio LB con 40 µl de Pluronic F127 para el test con encapsular).

Lo mismo para *Bacillus subtilis*. Además se utilizó un control por cada compuesto y concentración para poder restar el efecto colorimétrico producido por el compuesto mismo (L1 a 50, 100, 150 y 200 ppm en medio LB).

Las concentraciones utilizadas para L1 (50, 100, 150 y 200 ppm) se seleccionaron de acuerdo a lo obtenido en el ensayo preliminar, en el que se le seleccionó como candidato. El Cloranfenicol y la Vancomicina se seleccionaron como controles positivos por su conocido poder antifúngico y la concentración corresponde a la recomendada por el proveedor para inhibir el crecimiento de *E. carotovora*. El estudio se enfoca en probar el efecto antibacteriano sobre *Erwinia*, pero se utiliza *Bacillus* como un control para observar la actividad del compuesto sobre otro patógeno.

INOCULACIÓN CON *ERWINIA CAROTOVORA* Y *BACILLUS SUBTILIS*

El día anterior a realizar el experimento, se preparó el preinóculo: se deja creciendo la bacteria en un tubo con medio LB y agitación a 150 RPM por la noche. La bacteria es extraída de cultivo previo que se guarda refrigerado. Al día siguiente se tomó un volumen de 20 µl de preinóculo y se puso en un volumen de medio LB en un tubo de vidrio, hasta ajustar según McFarland 0,5 (ver Protocolo en Anexo A Preparación del Estándar de Turbidez). Esto se hace observando cualitativamente y agregando volumen desde el preinóculo hasta igualar la turbidez del estándar. De esta forma el inóculo preparado tiene una concentración de 10^8 UFC/ml.

El cultivo de las bacterias se realizó en placas de cultivo de 12 pocillos. En cada pocillo que correspondía de la placa, se agregaron 2,5 µl de inóculo a 2 ml de medio LB. Luego las placas se pusieron en un agitador a 27°C a 120 RPM durante la noche.

DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

De cada pocillo se extrajeron 150 µl que se pusieron en un pocillo de una placa de lectura de 96 pocillos y se midió densidad óptica a 595 nm correspondiente al Carril 3 del equipo Microplate Reader Biorad Model 550. Para conocer el valor real de turbidez se debió restar a cada muestra el valor del control correspondiente a la misma concentración.

$$\text{Densidad óptica real } x = \text{densidad óptica } x - \text{densidad óptica control } x$$

Este último punto es importante, ya que este tipo de compuestos en sí mismo tiene color anaranjado o amarillo, y absorbe en una magnitud que depende proporcionalmente de la concentración con que se utiliza.

CÁLCULO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Un día antes del experimento se prepararon placas petri medianas con medio PDA y se dejaron dentro de una cámara de flujo laminar hasta el día siguiente para que el agar esté más seco.

Debido a la alta carga bacteriana que podrían tener los pocillos en que hubo crecimiento bacteriano, es que se hacen diluciones consecutivas en microtubos extrayendo 100 µl cada vez y llevando a un volumen total de 1 ml en medio LB. Para determinar el número de diluciones a realizar se debió hacer un ensayo previo. En este ensayo previo se determinó que el número de diluciones era 6 y 7 dependiendo de la muestra para este estudio.

Cuando se han realizado las diluciones necesarias, se extrajeron 20 µl y se vertieron formando una gota sobre la placa (se ponen tres gotas para un triplicado) y la placa se inclinó hasta que la primera gota llegó al borde inferior. Las placas se dejaron incubando en una estufa a 24°C y a las 19 h se observaron a la lupa, se contaron las colonias de cada réplica y se promediaron. Las colonias debían estar en un rango de 30 a 300 para poder utilizar la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\text{número de colonias}}{\text{volumen de la muestra} \cdot \text{dilución de la muestra}}$$

ENSAYO DE ESTABILIDAD FRENTE A ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Este ensayo tiene por objetivo determinar la estabilidad de la actividad antibacteriana del compuesto en el tiempo.

Se utiliza el compuesto L1 y además los controles:

- Control Positivo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (*E. carotova* en medio LB).
- Control Positivo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Cloranfenicol a 500 ppm).
- Control Positivo 3, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Vancomicina a 500 ppm).
- Control Negativo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (medio LB sin inóculo).
- Control Negativo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con etanol 1,1% para el test sin encapsular y *E. carotovora* en medio LB con 40 µl de Pluronic F127 para el test con encapsular).

Lo mismo para *Bacillus subtilis*. También se hizo un control para cada bacteria utilizada que se inoculó cada 24 h con el pocillo correspondiente del día anterior, ajustando con McFarland 0,5 y un control por cada compuesto y concentración para poder restar el efecto colorimétrico producido por el compuesto.

Inoculación con *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*

El día anterior se preparó el preinóculo: se dejó creciendo la bacteria en un tubo con medio LB y agitación a 150 RPM toda la noche. La bacteria es extraída de cultivo previo. El inóculo se ajustó según McFarland 0,5 y en cada placa según corresponda se pusieron 2,5 µl de inóculo. Luego las placas se pusieron en un agitador a 27°C durante toda la noche a 120 RPM. Este ensayo duró 72 horas y el inóculo debe ser fresco, entonces para el pocillo inoculado a las 0 h se utilizó el preinóculo, para el de las 24 h se utilizó el pocillo de las 0 h y se ajusta con McFarland 0,5; para el de las 48 h el de las 24 h y así sucesivamente.

Medición del Crecimiento Bacteriano

De cada pocillo se extrajeron 150 µl que fueron puestos en una placa de lectura de 96 pocillos y se midió densidad óptica a 595 nm en el equipo Microplate Reader Biorad Model 550. Luego se calibró cada pocillo de acuerdo a los componentes y se analizaron los resultados. Esta medición

debió realizarse cada 24 h hasta completar un total de 72 h, debido a que la medición se realizó luego de 24 h transcurrida la inoculación, la primera medición fue a las 24 h y la última fue a las 96 h. Para además corroborar la existencia o ausencia de UFC se realizó el experimento de Cálculo de Unidades Formadoras de Colonias descrito anteriormente, pero sin realizar dilución y sin conteo, es decir, sólo para observar la existencia de colonias. Cabe mencionar que el conteo correspondiente a las 0 h se hizo a las 48 h y el último se hizo a las 120 h.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Se calculó utilizando los valores de densidad óptica obtenidos para cada compuesto y concentración, con respecto al resultado obtenido por el Control Positivo 1. Se tomó como restricciones de borde que el Control Positivo 1 corresponde a un 0% de inhibición del crecimiento y que 100% de inhibición es cuando la densidad óptica calibrada vale 0.

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{-100}{\text{densidad óptica Control Positivo 1}} + 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO I: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Los resultados que se presentan a continuación corresponden a los ensayos biológicos realizados para analizar el efector inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea* que poseen los compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2. Se realizó un Test de Difusión para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo *B. cinerea* en presencia de seis compuestos del tipo geranilfenoles y geranilhidroquinonas.

Los resultados fueron registrados a las 48 horas de crecimiento del hongo, a excepción del compuesto L2 encapsulado y Captan con y sin encapsular (50, 150 y 250 ppm) que fueron registrados a las 72 horas. Esto último debido a que el experimento para L2 encapsulado se realizó tres semanas después, ya que no se contaba con disponibilidad del compuesto L2 al momento de realizar el experimento del resto de los compuestos. Al realizar el Test de Difusión con el compuesto L2, el hongo en el Control Positivo 1 tardó 72 horas en alcanzar los bordes, lo que da por finalizado el experimento. La razón para realizar el experimento para el Captan con y sin encapsular a 50, 150 y 250 ppm es que en el plazo de tres semanas entre el experimento del resto de los compuestos y el experimento de L2 encapsulado, se decidió que se quería comparar los resultados de los compuestos no sólo con el Captan a 400 ppm, que es la dosis recomendada por el proveedor para actividad antifúngica, sino también con el Captan a las mismas concentraciones a las que se estaban probando los compuestos.

A las 24 h y 48 h de iniciado el experimento se tomaron fotografías de todas las placas, luego estas fotografías fueron observadas en la herramienta Microsoft Office Picture Manager y se calculó el área de crecimiento del hongo en cada placa. La medida también se podría haber hecho directamente con una regla sobre la placa y registrando el diámetro en cm, sin embargo el total de placas era de 126. Las ventajas de fotografiar en lugar de medir directamente es que se obtiene un registro, se aumenta la imagen, la manipulación es más sutil y las placas permanecen menos tiempo fuera de la cámara de cultivo. La desventaja es que el error de medición aumenta porque se calcula indirectamente mediante regla de tres. Una diferencia de un pixel en la fotografía se traduce en 0,34 mm. Sin embargo, una diferencia de 0,5 mm puede ser imperceptible al ojo humano al medir con regla.

Los compuestos fueron recibidos en estado puro en microtubos resguardados de la luz solar y fueron almacenados en refrigerador hasta su preparación. Luego de solubilizarlos en etanol se guardaron en el congelador para evitar cambios cualitativos o de carácter estructural, ya que se desconoce su comportamiento en condiciones ambientales por tiempo prolongado. Además el etanol podría evaporarse y la molaridad de la solución cambiar. Para el caso en que se solubilizan mediante la encapsulación con micelas poliméricas, sólo se deben resguardar de la luz y permanecer en un lugar fresco y seco. Las micelas otorgan mayor protección a los compuestos y no hay riesgo de que ningún componente de la mezcla se volatilice.

Como se puede ver en la Tabla 1 a mayor concentración de los compuestos sin encapsular, se obtuvo un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *B. cinerea*. Es decir, el efecto antifúngico es directamente proporcional a la concentración de los compuestos, que en todos los casos provocaron inhibición. El menor porcentaje de inhibición se registró para la réplica 1 del compuesto L2 a 50 ppm con un valor de 25,2%, mientras que el mayor porcentaje de inhibición se registró para la réplica 3 del compuesto H1 a 250 ppm con un valor de 87,3%, superando incluso el porcentaje de inhibición exhibido por cualquier réplica del Captan a 250 ppm.

Tabla 1: Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* a las 48 h para cada concentración de cada compuesto sin encapsular, por triplicado.

	Concentración (ppm)	% de Inhibición Réplica 1	% de Inhibición Réplica 2	% de Inhibición Réplica 3
Control Positivo 1		0,0	0,0	0,0
Control Positivo 2		94,0	94,1	95,0
Control Negativo 1		13,4	7,4	15,8
H1	50	56,1	60,4	58,4
	150	85,4	79,5	81,2
	250	85,8	84,6	87,3
M1	50	39,7	32,5	46,9
	150	65,7	68,6	65,7
	250	74,6	77,6	76,7
I1	50	38,0	37,7	37,6
	150	75,2	62,3	60,7

	250	80,1	79,8	84,4
I5	50	26,9	35,8	36,9
	150	54,8	54,4	57,7
	250	73,1	71,4	72,6
L1	50	43,6	46,0	45,9
	150	62,2	62,9	63,5
	250	73,9	70,4	72,7
L2*	50	25,2	29,7	29,1
	150	49,9	60,9	58,0
	250	64,8	65,7	62,3
Captan*	50	31,7	46,2	40,2
	150	49,9	63,9	65,2
	250	78,1	79,2	83,6

* Medición realizada a las 72 h y calculada con respecto a un Control Positivo 1 de 72 h (no presentado).

Los resultados de la Tabla 2 demuestran que al encapsular los compuestos también se produce inhibición del crecimiento del hongo y que también es proporcional a la concentración a la que el compuesto se encuentre presente en el medio de cultivo. Sin embargo, en el caso de los compuestos I1, M1 y L2 se observó disminución del efecto antifúngico al aumentar la concentración. Para M1 se obtuvo un porcentaje de inhibición a 150 ppm menor que a 50 ppm ($42,31\% \pm 13,47$ a 50 ppm y $41,98\% \pm 2,92$ a 150 ppm) con una desviación estándar muy alta a 50 ppm, la causa es que la réplica 2 aumenta considerablemente el promedio y la desviación con un 57,8% de inhibición, incluso mayor a todas las demás réplicas, incluidas las de 250 ppm, por lo que este dato podría ser atípico. Si este dato es eliminado y se utiliza el promedio de la réplica 1 y 3 a 50 ppm el valor que se obtiene es $35\% \pm 1,97$ que se ajusta mejor a una curva y a los demás resultados. En el caso de I1 se obtuvo un porcentaje de inhibición a 250 ppm menor que a 150 ppm pero mayor a 50 ppm ($24\% \pm 0,49$ a 50 ppm, $40\% \pm 1,31$ a 150 ppm y $26\% \pm 1,14$ a 250ppm) pero no hay datos atípicos en esta oportunidad. Para L2 se obtuvo un porcentaje de inhibición a 150 ppm menor a 50 ppm ($30\% \pm 6,48$ a 50 ppm, $23\% \pm 15,22$ a 150 ppm y $33\% \pm 8,93$ a 250 ppm) con una desviación estándar muy alta a 150 ppm y alta a 50 y 250 ppm, por lo que es difícil hacer un juicio respecto a la causa de estos resultados. Cabe mencionar que este experimento se realizó separado del experimento del resto de los compuestos.

Tabla 2: Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* a las 48 h para cada concentración de cada compuesto encapsulado, por triplicado.

	Concentración (ppm)	% de Inhibición Réplica 1	% de Inhibición Réplica 2	% de Inhibición Réplica 3
Control Positivo 1		0,0	0,0	0,0
Control Positivo 2		93,6	93,8	94,6
Control Negativo 1		-8,7	0,5	4,2
H1	50	48,0	46,0	46,8
	150	64,1	58,7	56,6

	250	71,3	71,3	70,2
M1	50	36,0	57,8	33,2
	150	39,3	41,6	45,1
	250	46,2	53,8	48,9
I1	50	24,4	23,5	24,3
	150	39,1	39,7	41,6
	250	25,0	27,2	25,6
I5	50	21,8	24,7	21,0
	150	27,0	24,0	22,0
	250	23,5	25,0	33,5
L1	50	34,9	35,4	37,1
	150	38,3	44,1	40,3
	250	42,0	46,2	44,6
L2*	50	32,2	22,5	34,8
	150	40,5	16,3	12,4
	250	40,9	23,4	35,2
Captan*	50	67,3	82,0	86,6
	150	90,6	90,2	91,8
	250	96,3	96,1	90,0

* Medición realizada a las 72 h y calculada con respecto a un Control Positivo 1 de 72 h (no presentado).

En el estudio con encapsular el menor porcentaje de inhibición se observó en la réplica 3 del compuesto L2 a 150 ppm con un valor de 12,4% y el mayor porcentaje de inhibición se observó en las réplicas 1 y 2 del compuesto H1 a 250 ppm con un valor de 71,3%. En esta oportunidad el Captan encapsulado resultó con mayor poder antifúngico que cualquier compuesto en sus respectivas concentraciones.

El resultado negativo que se observa en el porcentaje de inhibición de la réplica 1 del Control Negativo 1 se interpreta como que la *Botrytis* en ese caso creció más que en el Control Positivo 1.

Con respecto a los controles utilizados, el Captan a 400 ppm (Control Positivo 2) resultó tener un alto poder inhibidor del crecimiento de *Botrytis cinerea* con 94%. El Control Negativo 1 en el caso sin encapsular arrojó un 12% de inhibición, es decir, el etanol es tóxico para el hongo, pero en un porcentaje significativamente menor a lo obtenido por cualquier compuesto a cualquier concentración sin encapsular. Se puede postular que el uso de etanol para solubilizar los compuestos suma su efecto antifúngico al de los compuestos, aunque no se conoce el tipo de interacción entre los compuestos y el etanol con respecto a actividad inhibitoria y se podría estudiar para observar si es un efecto aditivo o sinérgico. En ese caso se podría utilizar también otro tipo de diluyente como metanol. Para el Control Negativo 1 en el ensayo de los compuestos encapsulados, el control consiste en 40 µl de micelas de Pluronic F127 0,01 M, que corresponde al mayor volumen aplicado (al utilizar los compuestos encapsulados a 250 ppm). Como se puede ver en la tabla anterior el valor de la réplica 1 es negativo, lo que quiere decir que hubo un

crecimiento mayor al del Control Positivo 1, esto podría otorgarle a las micelas cierto valor nutritivo para el hongo, como fuente de carbono por ejemplo, sin embargo, el valor de las réplicas 2 y 3 sí presentan un porcentaje de inhibición, aunque bajo, que es lo que se busca en un control negativo, por lo que el valor de la réplica 1 podría considerarse atípico. Al eliminar el valor de la réplica 1 se obtiene un valor promedio de 2%.

El promedio de las tres réplicas y la desviación estándar por compuesto más el Captan, se presentan a continuación.

Tabla 3: Inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea* a las 48 h para cada concentración de cada compuesto sin encapsular y encapsulado. Se presenta promedio y desviación estándar.

Compuesto	Sin Encapsular			Con Encapsular		
	50 ppm	150 ppm	250 ppm	50 ppm	150 ppm	250 ppm
H1	58% ± 2,2	82% ± 3,0	86% ± 1,4	47% ± 1,0	60% ± 3,9	71% ± 0,6
M1	40% ± 7,2	67% ± 1,7	76% ± 1,5	42% ± 13,5	42% ± 2,9	50% ± 3,9
I1	38% ± 0,2	66% ± 8,0	81% ± 2,6	24% ± 0,5	40% ± 1,3	26% ± 1,1
I5	33% ± 5,5	56% ± 1,8	72% ± 0,9	23% ± 2,0	24% ± 2,5	27% ± 5,4
L1	45% ± 1,4	63% ± 0,7	72% ± 1,8	36% ± 1,2	41% ± 3,0	44% ± 2,1
L2*	28% ± 2,4	56% ± 5,7	64% ± 1,8	30% ± 6,5	23% ± 15,2	33% ± 8,9
Captan*	39% ± 7,3	60% ± 8,5	80% ± 2,9	79% ± 10,1	91% ± 0,8	94% ± 3,6

* Medición realizada a las 72 h y calculada con respecto a un Control Positivo 1 de 72 h (no presentado).

Se presenta dos figuras a continuación (Figura 10 y Figura 11) donde se observa el porcentaje de inhibición de cada compuesto con barras de desviación estándar. Se puede apreciar que en el caso sin encapsular, el porcentaje de inhibición es directamente proporcional a la concentración, es decir, a mayor concentración, mayor es la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea*. Aunque también se observa que aumenta pero no linealmente, para determinar una curva se deberían tomar varias concentraciones y hacer una curva dosis-respuesta, estudio que sería interesante a futuro, especialmente para el mejor candidato H1; para estos efectos se debe contar con mayores cantidades que las utilizadas en este trabajo, es decir, aumentar la producción de H1.

Este fenómeno de proporción directa concentración-porcentaje de inhibición no ocurre tan claramente al usar un sistema de encapsulamiento, ya que en el caso de M1, I1 y L2 a algunas concentraciones, el porcentaje de inhibición es inversamente proporcional. Como se mencionó anteriormente, en el caso de M1 se puede deber a un valor atípico pero para I1 y L2 no se puede aplicar esa justificación.

Al analizar la Figura 12 en que los porcentajes de inhibición de cada compuesto se agrupan en las tres concentraciones utilizadas, se observa claramente que el compuesto H1 resulta ser el más inhibidor para 50, 150 y 250 ppm. Pero el orden no necesariamente se mantiene, para 50 ppm el

orden de más inhibidor a menos inhibidor es H1>L1>M1>Captan>I1>I5>L2 en que la mitad de los compuestos resultan más antifúngicos que el Control Positivo 2 a la misma concentración, luego al comparar a 150 ppm el orden es H1>M1>I1>L1>Captan>L2>I5 con cuatro compuestos más antifúngicos que el Captan y con varios cambios en el orden, a 250 ppm el orden es H1>I1>Captan>M1>I5>L1>L2 y el número de compuestos que superan al Captan son sólo dos. Como hay variabilidad en el orden de efectividad de los compuestos no es directo hacer un orden global de rendimiento considerando sólo el compuesto y no la concentración específica a la que se encuentra.

En la Figura 13 se presentan los resultados para los compuestos encapsulados agrupados por concentración, notando que son diferentes a los resultados de los compuestos sin encapsular. Al encapsular el orden para 50 ppm de compuesto con mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis* es Captan>H1>M1>L1>L2>I1>I5 resultando todos los compuestos inferiores al Captan encapsulado, al comparar a 150 ppm se obtiene Captan>H1>M1>L1>I1>I5>L2 resultado similar a 50 ppm pero con diferencias en los últimos puestos, a 250 ppm el orden es Captan>H1>M1>L1>L2>I5>I1 en que nuevamente cambia el orden de los últimos tres puestos pero se mantiene los tres primeros H1, M1 y L1 siempre por debajo del Captan.

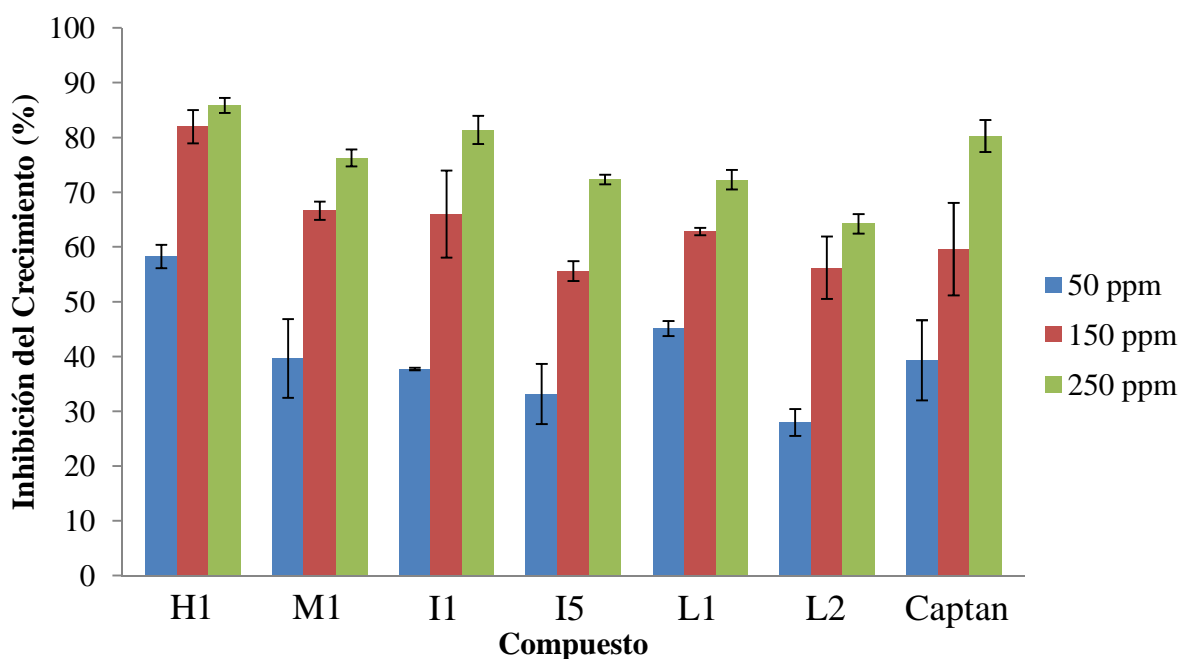


Figura 10: Efecto de los compuestos sin encapsular en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas y desviación estándar para cada concentración utilizada, agrupadas por compuesto.

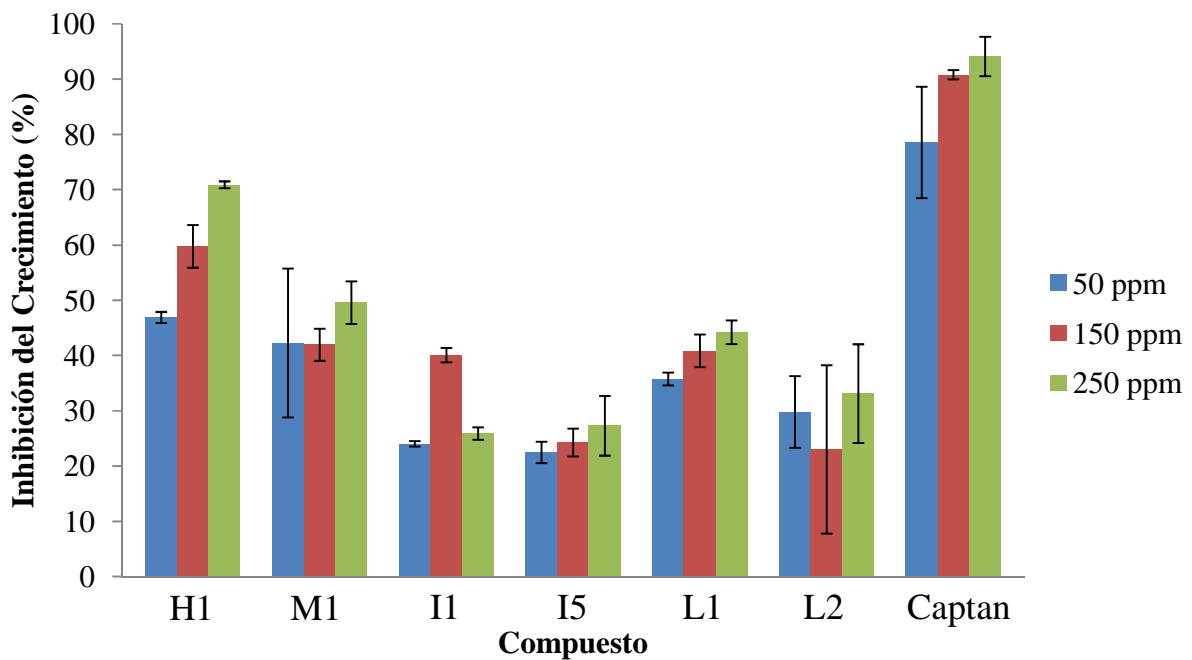


Figura 11: Efecto de los compuestos encapsulados en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas y desviación estándar para cada concentración utilizada, agrupadas por compuesto.

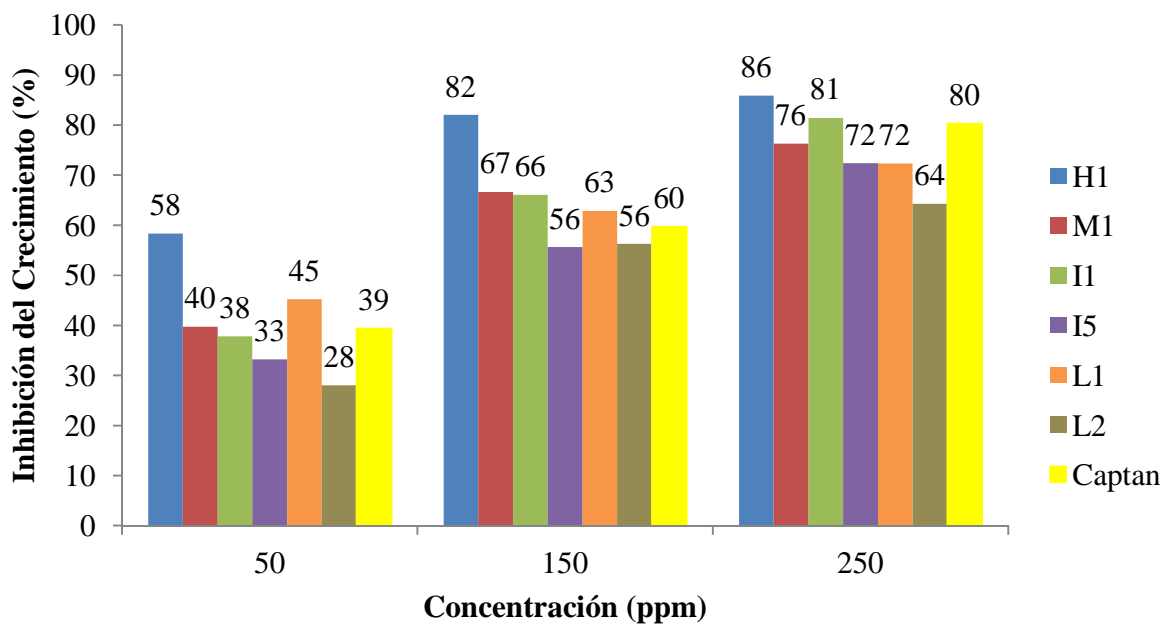


Figura 12: Efecto de los compuestos sin encapsular en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas para cada compuesto, agrupados por concentración.

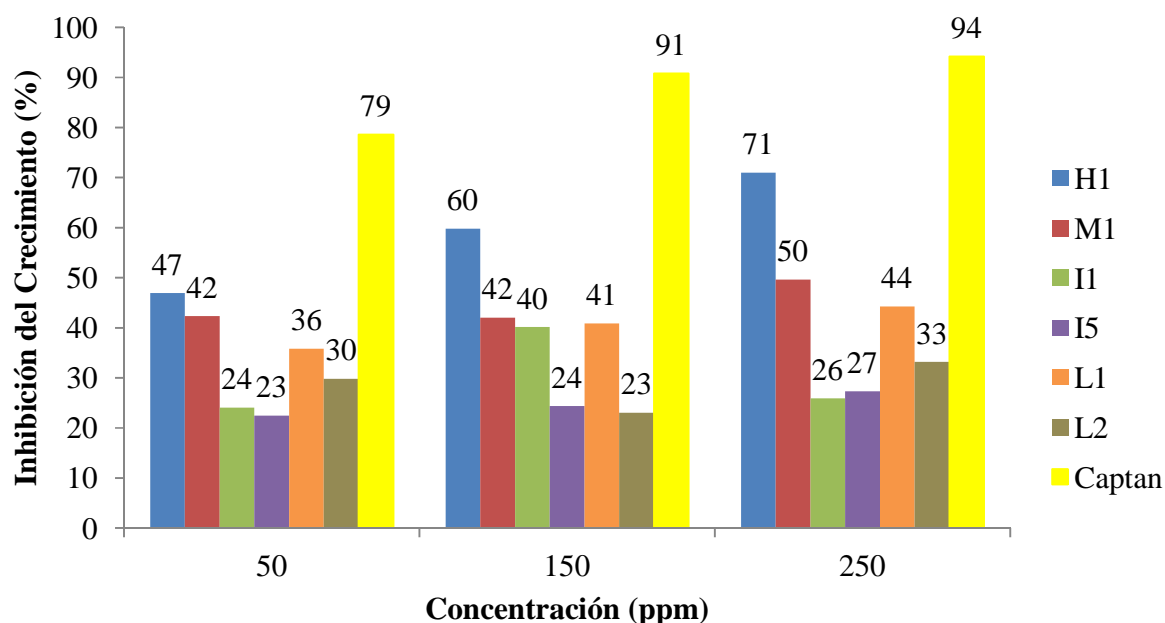


Figura 13: Efecto de los compuestos encapsulados en la de inhibición del crecimiento de *B. cinerea*. Promedio de tres réplicas para cada compuesto, agrupados por concentración.

Una de las observaciones más importante del estudio es la disminución de la actividad inhibitoria del crecimiento sobre *B. cinerea* al encapsular los compuestos. Se esperaba que los compuestos al tener un carácter hidrofóbico y ser encapsulados en micelas que facilitarían su dilución en un ambiente hidrofílico aumentarían su antifungicidad, sin embargo los ensayos demostraron lo contrario. El compuesto al pasar por el proceso de encapsulamiento, encuentra un equilibrio dentro y fuera de las micelas, por lo tanto la fracción del compuesto que está fuera de las micelas está disponible para reaccionar y el compuesto que está dentro de las micelas es liberado en el tiempo para mantener ese equilibrio. También se postula que las micelas podrían liberar el compuesto frente a un cambio en el medio, como cambios en la temperatura, el pH, etc. situación que debería estudiarse a futuro. En un intento por dilucidar la cinética de liberación de los compuestos, se realizó un experimento con Celdas de Franz (ver Anexo A.4 Cinética de Liberación), en que no se observó que el compuesto se liberara en medio acuoso durante un tiempo total de reacción de 3 días (datos no mostrados), es decir 72 h, lo que excede el tiempo de observación del crecimiento en placas, ya que en el Control Positivo 1 el hongo alcanza los bordes a las 48 h. Es decir, por lo menos durante 72 h el compuesto no se libera desde las micelas por difusión, lo cual hace pensar en una fuerte interacción del compuesto con la cara interna de las micelas de carácter hidrofóbico al igual que el compuesto. Esta interacción debía permitir el ingreso del compuesto a las micelas pero no impedir su salida.

Tabla 4: Compuestos sin encapsular a diferentes concentraciones (50, 150 y 250 ppm) ordenados desde el que posee mayor porcentaje de inhibición al que posee menor. Valores a las 48 h.

Lugar	Compuesto	Concentración (ppm)	Porcentaje de Inhibición %	Desviación Estándar
1	H1	250	85,9	1,4

2	H1	150	82,0	3,0
3	I1	250	81,4	2,6
4	Captan*	250	80,3	2,9
5	M1	250	76,3	1,5
6	I5	250	72,4	0,9
7	L1	250	72,3	1,8
8	M1	150	66,7	1,7
9	I1	150	66,1	8,0
10	L2*	250	64,3	1,8
11	L1	150	62,9	0,7
12	Captan*	150	59,7	8,5
13	H1	50	58,3	2,2
14	L2*	150	56,3	5,7
15	I5	150	55,6	1,8
16	L1	50	45,2	1,4
17	M1	50	39,7	7,2
18	Captan*	50	39,4	7,3
19	I1	50	37,8	0,2
20	I5	50	33,2	5,5
21	L2*	50	28,0	2,4

* Medición realizada a las 72 h y calculada con respecto a un Control Positivo 1 de 72 h (no presentado).

Sin embargo, el Captan aumentó su capacidad antifúngica al ser encapsulado, esto se puede deber a que la interacción dentro de la micela fue débil y el Captan fue liberado rápidamente al medio, aumentando su porcentaje de inhibición del crecimiento. El Captan si bien es un compuesto hidrosoluble, sedimenta con mucha facilidad al diluirse en agua y se debe agitar constantemente para obtener una mezcla algo homogénea, ya que no se logra su completa dilución (se puede observar el polvillo flotando en el tubo en el que se le prepara). Por esto último, las micelas pueden haber ayudado a impedir la sedimentación y que el compuesto se repartiera uniformemente por todo el medio, aumentando su solubilidad y liberando sin problemas la fracción desde dentro de las micelas.

En la Tabla 4 se ordenan los compuestos sin encapsular con su respectiva concentración según el porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea*.

3.2 ESTUDIO II: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Debido a una contaminación accidental mientras se realizaban los experimentos del Estudio I se descubrió un potencial poder bactericida de los compuestos. Inmediatamente se decidió investigar la actividad antibacteriana. Se eligió el fitopatógeno *Erwinia carotovora* para probar el potencial, por las razones expuestas anteriormente en este trabajo.

En un estudio preliminar se utilizaron los compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2 sin encapsular para probar si existía actividad antibacteriana en alguno de ellos contra el patógeno *Erwinia carotovora*. Del ensayo de actividad, en que cada compuesto se probó a 80, 150 y 220 ppm, se obtuvieron resultados promisorios para el compuesto L1, estos resultados se observan en la Figura 14 como porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano.

Se usaron como controles del crecimiento: control negativo, el medio sin inóculo (LB en la Figura 14) y control positivo, el medio sólo con inóculo (*Erwinia* en la Figura 14). Como controles de la acción de los compuestos: el control positivo, Cloranfenicol a 500 ppm (Cloranfenicol en la Figura 14) y el control negativo, el medio con etanol al 1,1% (Etanol en la Figura 14). Se puede apreciar que en el medio LB sin inóculo y en el medio con Cloranfenicol no hubo crecimiento bacteriano, la inhibición fue total. En el control positivo del crecimiento sí hubo crecimiento y en particular, en el control negativo de la acción de los compuestos. En este último se aprecia un mayor porcentaje de inhibición que en el caso del medio LB sólo con inóculo, lo que significa que el etanol 1,1% tiene un efecto tóxico sobre *Erwinia* pero es una inhibición inferior a la que se experimenta al utilizar los compuestos.

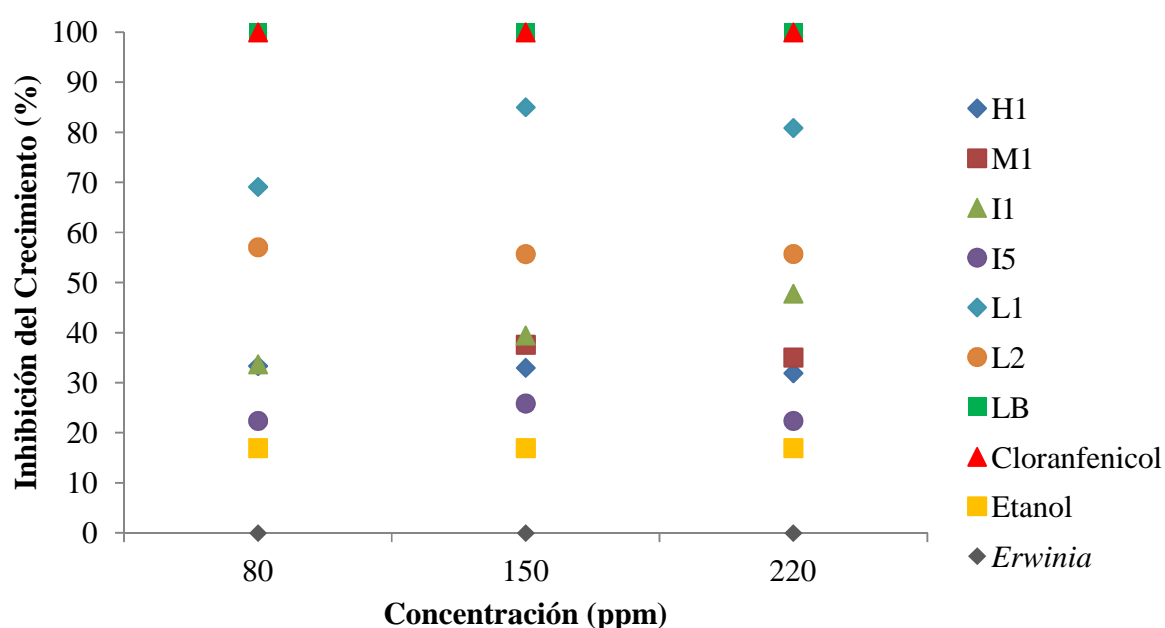


Figura 14: Efecto de los compuestos sin encapsular, utilizando tres concentraciones (80, 150 y 220 ppm), en el crecimiento de *E. carotovora*.

Se seleccionó el compuesto L1 para probar su efecto sobre el crecimiento bacteriano tanto en su forma encapsulada como sin encapsular, en concentraciones de 50, 100, 150 y 200 ppm. Además se utilizó la bacteria *Bacillus subtilis* como patógeno alternativo a *Erwinia carotovora*.

De este ensayo se obtiene la concentración a la cual el patógeno no prolifera utilizando L1 como inhibidor. En el caso de *E. carotovora* es 100 ppm y de *B. subtilis* es 50 ppm (ver Figura 15). Sin

embargo, al utilizar L1 en su forma encapsulada la actividad antibacteriana del compuesto disminuyó dramáticamente, siendo los valores de inhibición del crecimiento similares a inocular el medio LB y no utilizar ningún compuesto.

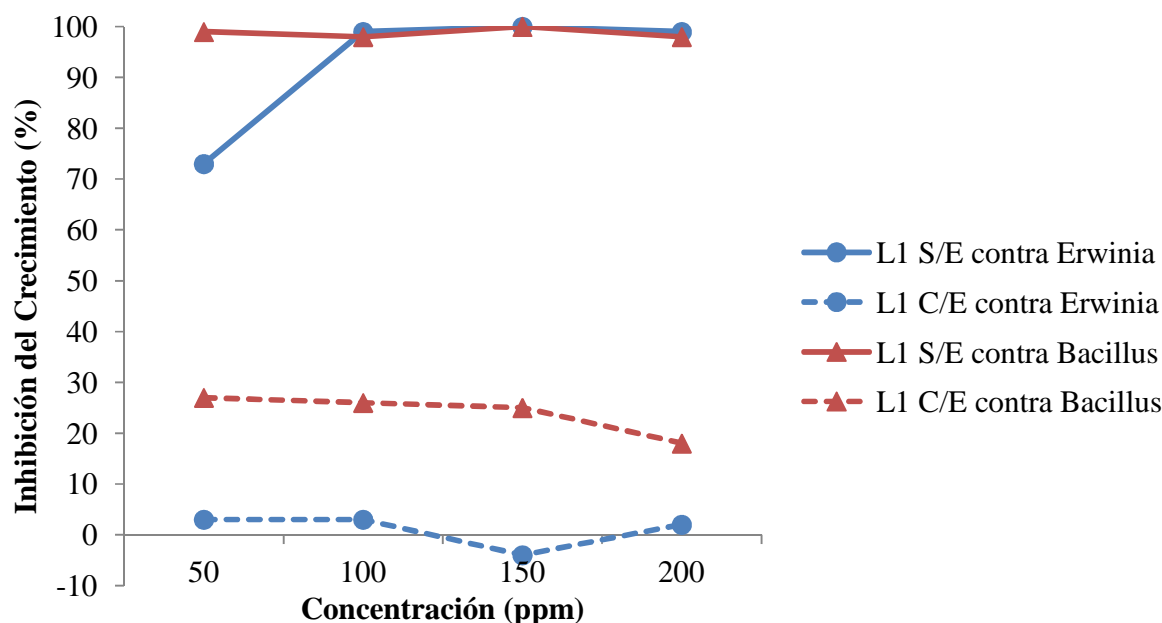


Figura 15: Efecto del compuesto L1, aplicado a diferentes concentraciones en su forma encapsulada (C/E) y sin encapsular (S/E), contra *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*.

Para corroborar los resultados obtenidos mediante la medición de densidad óptica, se realizó un conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) de las mismas soluciones utilizadas para determinar la concentración inhibitoria del crecimiento bacteriano. El contenido de cada pocillo del experimento se diluyó y se incubó en placas con agar. Se contó el número de colonias bajo lupa, valor que se multiplicó por el factor de dilución correspondiente. Los resultados de este experimento se presentan en la siguiente tabla. El conteo de UFC se corresponde con los resultados obtenidos mediante densidad óptica, ya que en los casos en que se obtuvo 100% de inhibición del crecimiento bacteriano, también se obtuvieron 0 UFC/ml. Además se corroboró que en los casos en que L1 estaba encapsulado, las bacterias proliferaron. También hubo una correlación con los controles de ambos experimentos.

Tabla 5: Efecto del compuesto L1 sin y con encapsular contra *Bacillus* (Ba) y *Erwinia* (Er) mediante el conteo de Unidades Formadoras de Colonias.

Compuestos Sin Encapsular	UFC/ml	Compuestos Con Encapsular	UFC/ml
Etanol 1,1% + Ba	1,58E+09	Pluronic F127 + Ba	5,00E+06
Cloranfenicol 500 ppm + Ba	0,00E+00	Cloranfenicol 500 ppm + Ba	0,00E+00
Vancomicina 500 ppm + Ba	0,00E+00	Vancomicina 500 ppm + Ba	0,00E+00
L1 50 ppm + Ba	0,00E+00	L1 50 ppm + Ba	5,00E+06
L1 100 ppm + Ba	0,00E+00	L1 100 ppm + Ba	5,00E+06
L1 150 ppm + Ba	0,00E+00	L1 150 ppm + Ba	5,00E+06

L1 200 ppm + Ba	0,00E+00	L1 200 ppm + Ba	5,00E+06
Etanol 1,1% + Er	3,48E+10	Pluronic F127 + Er	2,63E+10
Cloranfenicol 500 ppm + Er	0,00E+00	Cloranfenicol 500 ppm + Er	0,00E+00
L1 50 ppm + Er	5,00E+06	L1 50 ppm + Er	6,72E+10
L1 100 ppm + Er	0,00E+00	L1 100 ppm + Er	4,67E+10
L1 150 ppm + Er	0,00E+00	L1 150 ppm + Er	3,00E+10
L1 200 ppm + Er	0,00E+00	L1 200 ppm + Er	3,58E+10

En la Tabla 5 se puede apreciar que los Controles Negativos 2 (etanol 1,1% en el ensayo sin encapsular y 40 μ l de Pluronic F127 en el ensayo con encapsular) no impidieron la proliferación de la población bacteriana como era de esperar. Los Controles Positivos Cloranfenicol y Vancomicina a 500 ppm demostraron su poder antibacteriano. Para los compuestos en estudio, se pudo comprobar que la dosis antibacteriana de L1 contra *Bacillus* es 50 ppm y contra *Erwinia* es 100 ppm para el compuesto en su forma no encapsulada (en comparación con las concentraciones utilizadas). Al encapsular el compuesto, éste pierde su capacidad bactericida o esta capacidad es contrarrestada por las micelas poliméricas de Pluronic F127. Como se mencionó en el Estudio I, si la liberación desde las micelas es demasiado lenta o inclusive no se efectúa, el compuesto no estará disponible para ejercer su potencial antibacteriano. Incluso al ver la Figura 15, se puede observar que a 150 ppm hay una inhibición del crecimiento menor a 0%, lo que indicaría que en el ensayo con L1 encapsulado a 150 ppm la bacteria *Erwinia* proliferó más que en el ensayo del medio LB sólo con el inóculo.

ESTABILIDAD DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE EL CRECIMIENTO

Luego de determinar la concentración antibacteriana de L1 para cada patógeno, se realizó un estudio de estabilidad del compuesto con el fin de contestar dos preguntas:

1. Si el compuesto se aplica al mismo tiempo que la infección ¿cuánto tiempo se mantiene el efecto antibacteriano?
2. Si la infección ocurre posterior a la aplicación del compuesto ¿cuánto tiempo puede pasar entre la aplicación del compuesto y la infección manteniendo el efecto antibacteriano?

Bajo este marco, se realiza el estudio de estabilidad que presenta los resultados a continuación.

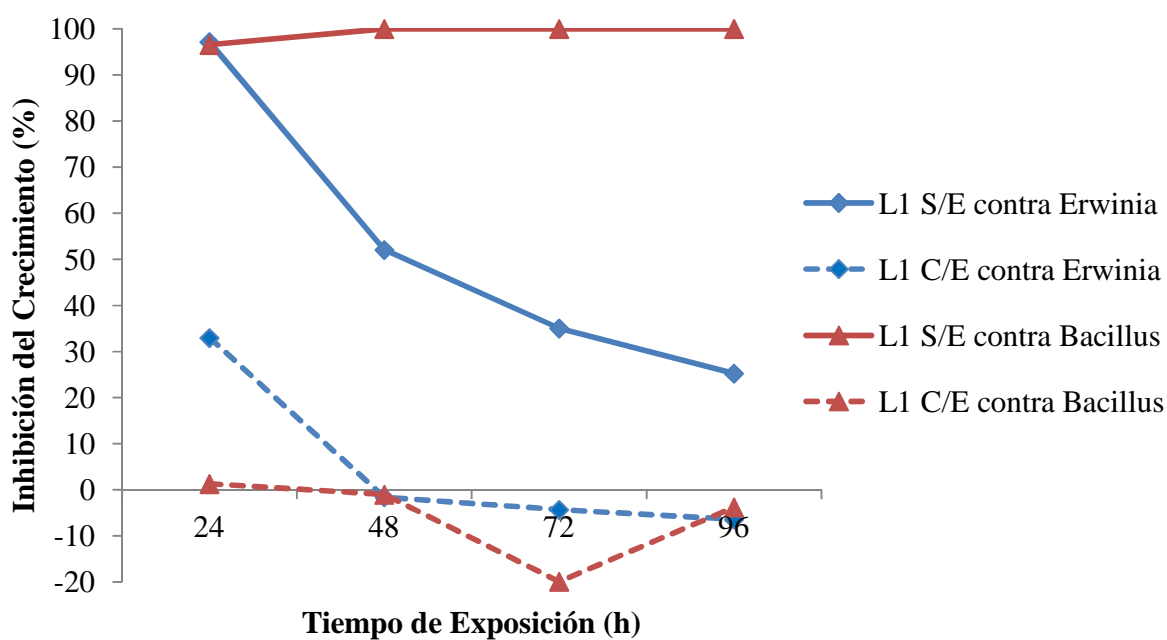


Figura 16: Efecto, según el tiempo de exposición, del compuesto L1 en su forma encapsulada (C/E) y sin encapsular (S/E), contra *Erwinia carotovora* a 100 ppm y contra *Bacillus subtilis* a 50 ppm.

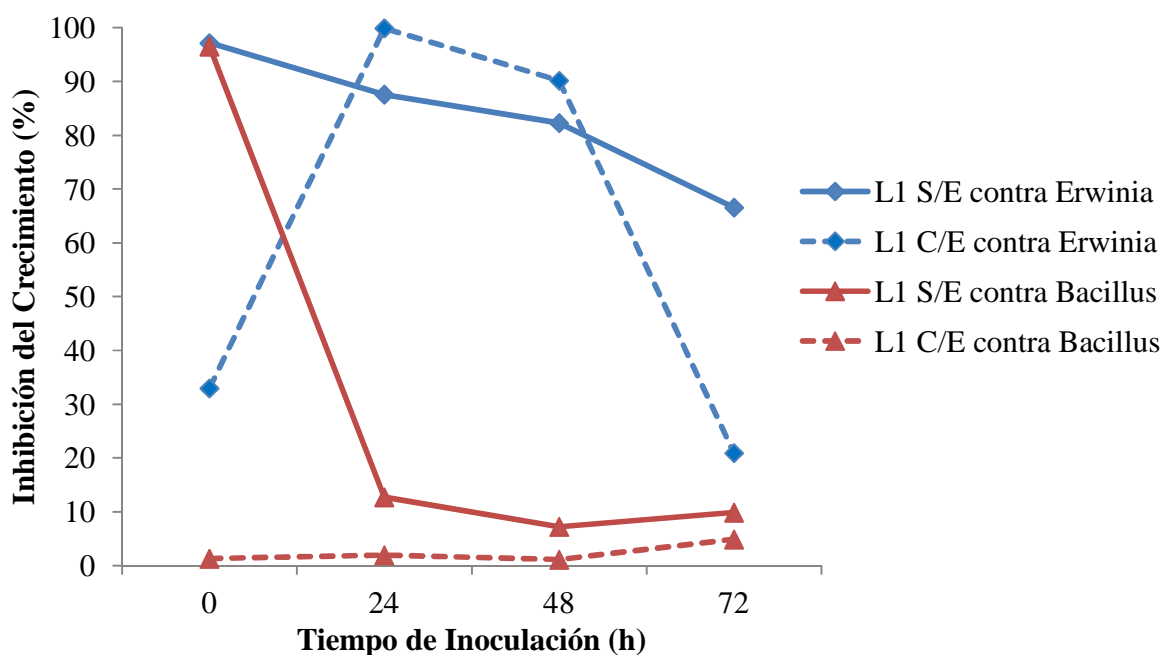


Figura 17: Efecto, según el tiempo de inoculación, del compuesto L1 en su forma encapsulada (C/E) y sin encapsular (S/E), contra *Erwinia carotovora* a 100 ppm y contra *Bacillus subtilis* a 50 ppm.

Al analizar los resultados presentados en la Figura 16 se puede responder la primera pregunta planteada con respecto a la estabilidad de L1 y su poder bactericida. El medio LB con compuesto L1 se inoculó al tiempo 0 h y se registró el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica durante 96 h. El efecto inhibitorio se pudo apreciar a las 24 en el caso de L1 sin encapsular y además para *Bacillus* se mantuvo durante todo el tiempo de exposición, no así para *Erwinia*, que proliferó después de las 48 h disminuyendo su efecto inhibitorio. Al utilizar L1 encapsulado, los porcentajes de inhibición son muy bajos, e incluso negativos, lo que significa que la bacteria creció más en presencia del compuesto que sólo en el medio de cultivo.

En la Figura 17 se hace el análisis pero para diferentes tiempos de inoculación. Se puede observar, en el caso de L1 sin encapsular, que la inhibición del crecimiento disminuye cuando aumenta el tiempo entre la aplicación del compuesto y la infección. Este disminución es menor en el caso de L1 sin encapsular contra *Erwinia* y más pronunciada en el caso contra *Bacillus*. En el caso de L1 encapsulado contra *Bacillus* se observa que la inhibición es prácticamente nula y contra *Erwinia*, se registra un fenómeno diferente a lo observado antes. Se obtiene que a las 24 h de inoculación hay un 99,9% de inhibición del crecimiento bacteriano, lo que podría tener relación con el tiempo de liberación del compuesto desde las micelas.

Para comparar y tener un referente de estabilidad, se realiza el mismo ensayo a dos antibióticos: Cloranfenicol y Vancomicina, utilizados como control a 500 ppm. Se presentan los resultados.

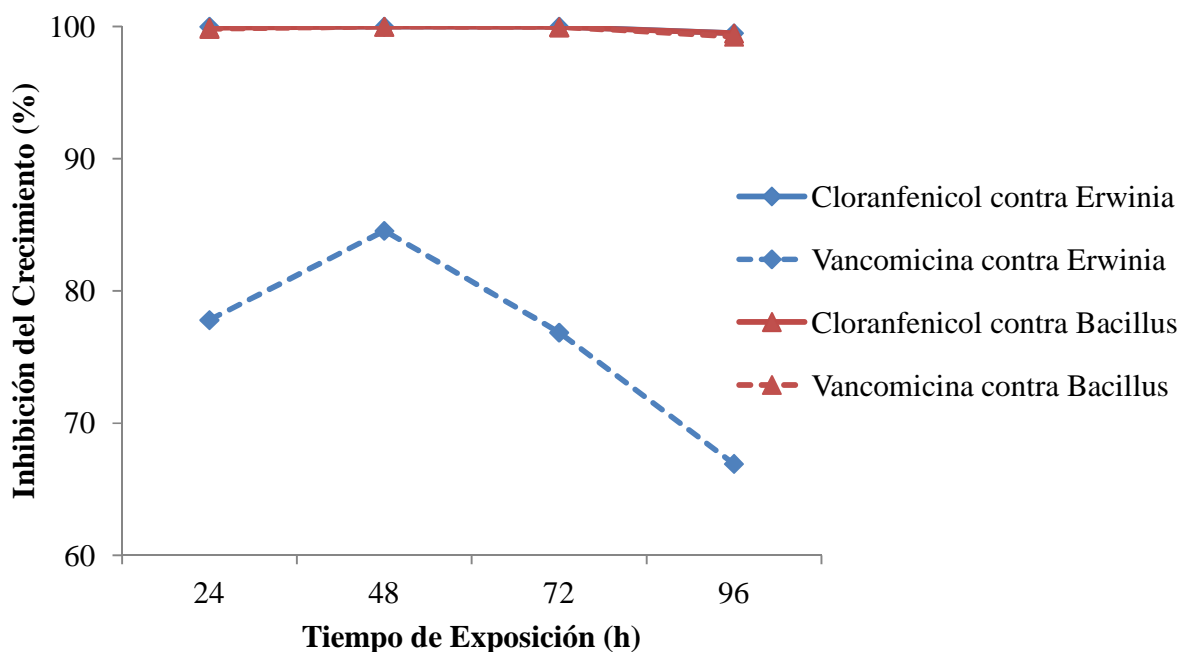


Figura 18: Efecto del Cloranfenicol y la Vancomicina contra *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*, según el tiempo de exposición.

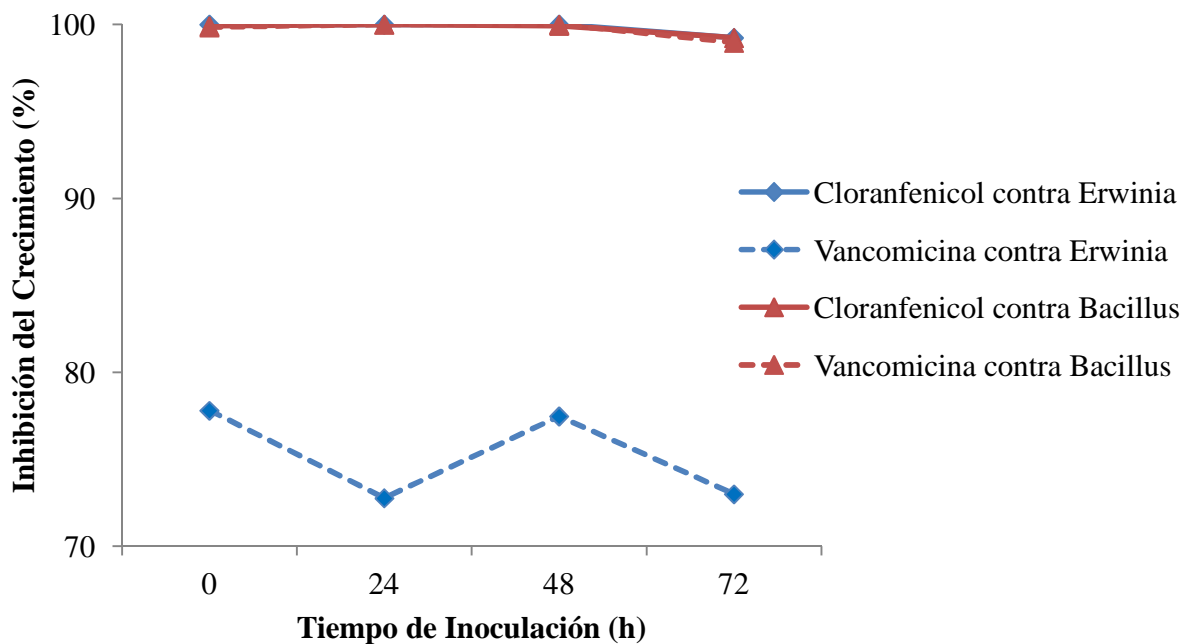


Figura 19: Efecto del Cloranfenicol y la Vancomicina contra *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*, según el tiempo de inoculación.

Como se puede observar en la Figura 18 y 19, la estabilidad del Cloranfenicol a 500 ppm para ambos patógenos se cumple a cabalidad, es decir, el efecto se mantiene en el tiempo y no depende del cuándo ocurre la infección (de acuerdo a la ventana de tiempo estudiada). Si el medio con Cloranfenicol es infectado 0, 24, 48 o 72 h no se registra crecimiento bacteriano 24, 48, 72 o 96 h después. Esto quiere decir que aunque pasen 72 h desde la aplicación del producto, éste tendrá efecto y ese efecto se mantendrá en el tiempo.

Para la Vancomicina, se repite lo descrito en el párrafo anterior para *Bacillus subtilis*, sin embargo Vancomicina contra *Erwinia* no. No presenta estabilidad contra *E. carotovora*, es más, si se infecta a las 0 h, se registra crecimiento a las 24 h, por lo que no presenta ningún tipo de efecto bactericida contra este patógeno. Sin embargo este resultado era de esperar, ya que la Vancomicina es utilizada en tratamientos de infecciones con bacterias Gram-positivas y *Erwinia* es una bacteria Gram-negativa.

CONCLUSIONES

En el Estudio I de actividad antifúngica se probó que efectivamente los 6 compuestos estudiados H1, M1, I1, I5, L1 y L2 poseen actividad contra *B. cinerea* mediante un Test de Difusión en placas de cultivo. Los porcentajes de inhibición del crecimiento del hongo fueron altos, alcanzando en algunos casos resultados mejores que los obtenidos a las mismas concentraciones con el compuesto comercial Captan, utilizado como Control Positivo 2.

En particular, hubo un compuesto que sostenidamente demostró tener un potencial antifúngico alto, el compuesto H1. Este compuesto presentó un porcentaje de inhibición del crecimiento de *Botrytis* de 58% al ser utilizado a una concentración de 50 ppm, 82% a una concentración de 150 ppm y 86% a 250 ppm. También se obtuvo excelentes resultados para los compuestos M1 e I1.

A una concentración de 250 ppm fueron dos los compuestos que produjeron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo en comparación con Captan: H1 e I1. A 150 ppm superaron al Captan cuatro compuestos: H1, M1, I1 y L1. Finalmente a 50 ppm fueron superiores los compuestos H1, L1 y M1 sobre el Captan. Cabe mencionar que H1 a 150 ppm logró un mayor porcentaje de inhibición que Captan a 250 ppm.

La evaluación de los resultados obtenidos por los compuestos en el Estudio I en su forma encapsulada es negativa. La inhibición del crecimiento por L1 encapsulado fue mucho menor que la obtenida sin el sistema de encapsulamiento. Se presume que la interacción entre la micela y el compuesto resultó muy estable.

El Estudio II demostró que los compuestos tienen poder antibacteriano, pero sólo del compuesto L1 se siguió investigando. Si bien H1, M1, I1, I5 y L2 también exhibieron porcentajes de inhibición mayores a los registrados por el Control Positivo 1 (*Erwinia* inoculada en medio LB) y mayores al Control Negativo 2 (*Erwinia* inoculada en medio LB con 1,1% de etanol), sus resultados no fueron tan significativos como para seguir adelante con una investigación (inferiores a 60% de inhibición del crecimiento bacteriano).

Se seleccionó L1 para estudiar más detalladamente su actividad antibacteriana contra *Erwinia carotovora* y además probar contra *Bacillus subtilis*, como un patógeno control. Se determinó que la concentración de inhibición del crecimiento bacteriano para *E. carotovora* es 100 ppm, mientras que para *B. subtilis* es 50 ppm. Cabe mencionar que las concentraciones utilizadas fueron 50, 100, 150 y 200 ppm, por lo que la concentración en realidad podría ser menor a menor a 100 y mayor a 50 ($50 \text{ ppm} < C < 100 \text{ ppm}$) en el caso de *Erwinia* y menor a 50 ($C < 50 \text{ ppm}$) en el caso de *Bacillus*.

Los resultados obtenidos para la estabilidad de L1 a las concentraciones determinadas anteriormente para cada patógeno, demostraron que L1 no es estable. El crecimiento bacteriano se hizo patente cuando el compuesto es adicionado al medio LB a las 0 h pero inoculado a las 24

h o más. Este resultado se observó tanto para *Erwinia* como para *Bacillus*. Es decir, el compuesto L1 no podría ser aplicado, según estos resultados, como un agente protector preventivo contra estos patógenos.

En el caso en que el compuesto y la bacteria son adicionados al mismo tiempo, los resultados son diferentes para cada patógeno. Contra el patógeno objetivo, *Erwinia carotovora*, se observó que el efecto bactericida presentado a las 24 h de comenzado el experimento, era revertido a las 48 h y más, es decir, la aniquilación de la población de bacterias no fue total y las que sobrevivieron pudieron proliferar. Esto está directamente relacionado con el punto descrito en el párrafo anterior, ya que la estabilidad pasadas las 24 h de adicionado el compuesto disminuye, lo que pudo haber sido una oportunidad de crecer para las bacterias. Sin embargo, a pesar de que la concentración en el experimento contra *Bacillus subtilis* era la mitad (50 ppm contra *Bacillus* versus 100 ppm contra *Erwinia*), resultó ser suficiente para exterminar cualquier colonia de esta bacteria, ya que al inocular al mismo tiempo que se adicionó el compuesto al medio, el registro del crecimiento bacteriano a las 24, 48, 72 y 96 h fue interpretado como cero.

Al igual que en el Estudio I, se quiso averiguar si el encapsulamiento podía aumentar el potencial bactericida del compuesto L1. La proliferación bacteriana se hizo presente en todos los tratamientos en que el compuesto se usó encapsulado. Incluso se ha postulado que las micelas de Pluronic F127 podrían ser una fuente de carbono para las bacterias, pero esto debería estudiarse si se quiere buscar una forma de encapsulamiento de estos compuestos.

RECOMENDACIONES

Se pudo observar una relación directamente proporcional entre la concentración de aplicación del compuesto en el medio de cultivo y el porcentaje de inhibición del crecimiento, lo que hace suponer que a mayores concentraciones de los compuestos, mayor es el poder antifúngico. Por esto, el próximo paso en este proyecto sería determinar la máxima concentración a la cual se puede aplicar el compuesto manteniendo un costo competitivo del producto en el mercado, en el caso de querer formular un biopesticida.

Se deberá realizar un estudio de la liberación de los compuestos desde las micelas, evaluando la cinética y la constante de reparto del compuesto para determinar la fracción que está en equilibrio dentro y fuera de la micela. En este trabajo de título se intentó estudiar la liberación, sin embargo, los resultados obtenidos fueron muy inverosímiles y no fueron presentados. De todas formas un protocolo adecuado para los compuestos en estudio fue detallado para su uso en el estudio del proyecto FONDECYT.

Se hace imprescindible realizar un Estudio de Cinética de Liberación si la vía de solubilización de los compuestos es el encapsulamiento. De esta forma resolver esa arista evitaría perder recursos y tiempo del estudio antes de realizar pruebas biológicas y ayudaría a comprender el mecanismo por el cual el compuesto es liberado desde la micela al medio.

BIBLIOGRAFÍA

- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Statistics. [En línea] <<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>> [Consulta 20/7/2012]
- Redagícola. [En línea] <<http://www.redagricola.com/noticias/chile/crece-la-produccion-y-exportacion-de-flores-en-chile>> [Consulta: 12/5/2013]
- AGRIOS, G. N. *Plant Pathology*. Academic, New York, 4th Ed. 1997.
- ALEXANDRIDIS, P., LINDMAN, B. Amphiphilic Block Copolymers, Self-Assembly and Applications. *Elsevier Science*. Amsterdam. 2000.
- ALTMAN, S. Chile Potencia Alimentaria: ¿slogan y comportamiento de la mano? [En línea] América Economía. 14 de Marzo, 2011. <<http://www.americaeconomia.com/politica-sociedad/sociedad/chile-potencia-alimentaria-calza-el-eslogan-con-el-comportamiento-aliment>> [Consulta: 23 de Octubre de 2011]
- ÁLVAREZ, M., PINILLA, B. En: Uva de mesa en Chile. J. Valenzuela, ed. Santiago, Chile, Instituto de Investigaciones Agropecuarias. 2000. 212-215 p.
- ASTAFIEVA, I. V., ZHONG, X. F., EISENBERG, A. *Macromolecules*. 1993. 26, 7339-7352 p.
- BAILEY, A. *Biopesticides: Pest Management and Regulation*. Oxfordshire, UK, CABI. 2011. 232 p.
- Banco Central de Chile. Indicadores de Comercio Exterior. Cuarto trimestre 2011. [En línea] <<http://www.bcentral.cl/publicaciones/estadisticas/sector-externo/pdf/ice042011.pdf>> [Consulta: 20/7/2012]
- BENSLIMANE, A. F., POUCHUS, Y. F., LE BOTERFF, J., VERBIST, J. F. *J. Nat. Prod.* 1988. 51, 582-583 p.
- BIFULCO, G., BRUNO, I., MINALE, L., RICCIO, R. *J. Nat. Prod.* 1995. 58, 1444-1449 p.
- BOHLMANN, F., ZDERO, C., SUWITA, A. *Chem. Ber.* 1975. 108, 2818-2821 p.
- BOWDEN, B. F., COLL, J. C. *Aust. J. Chem.* 1981. 34, 2677-2681 p.
- CAMPOS, J., POLIT, E. ODEPA, Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Nuevos Enfoques para Chile Potencia Alimentaria y Forestal. [En línea] <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/AGRO_Noticias/docs/PotenciaForestalAlimentariaChile.pdf> [Consulta: 23 de Octubre de 2011]
- CAPON, R. J., GHISALBERTI, E. L., JEFFERIES, P. R. *Phytochem.* 1981. 20, 2598-2600 p.

- CHAHIN, M. G. Producción de calas. 2001. [En línea]
<<http://www.tattersall.cl/revista/rev167/plagas.htm>> [Consulta: 12/5/2013]
- CIESIN Thematics Guides. The Montreal Protocol on Substances That Deplete the Ozone Layer. [En línea] <<http://www.ciesin.org/TG/PI/POLICY/montpro.html>> [Consulta: 5/8/2012]
- COLMENARES, A., ALEU, J., DURÁN-PATRÓN, R., COLLADO, I., HERNÁNDEZ-GALÁN, E. *J. Chem. Ecol.* 2002. 28, 997-1005 p.
- DANELUTTE, A. P., LAGO, J. H., YOUNG, M. C., KATO, M. J. *Phytochem.* 2003. 64, 555-559 p.
- DE ROSA, S., CRISPINO, A., DE GIULIO, A., IODICE, C., MILONE, A. *J. Nat. Prod.* 1995. 58, 1450-1454 p.
- DE ROSA, S., DE GIULIO, A., IODICE, C. *J. Nat. Prod.* 1994. 57, 1711-1716 p.
- DONG, X. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998. 1, 316-323 p.
- ELAD, Y. Responses of plants to infection by *Botrytis cinerea* and novel means involved in reducing their susceptibility to infection. *Biol. Rev. Cambridge Philosophical So.* 1997. 72, 381-422 p.
- ESTERIO, M., AUGER, J., RAMOS, C., ARANEDA, M. J. *Botrytis* en uva de mesa de exportación: PCR en Tiempo Real una innovadora herramienta tecnológica para la detección oportuna de resistencia a fungicidas. [En línea]
<http://www.fedefruta.cl/newsletter/123/docs/Marcela_Esterio_Botrytis.pdf> [Consulta: 2/8/2012]
- FAULKNER, D. *J. Nat. Prod. Rep.* 1986. 3, 1-33 p.
- FONTAINE, E., ICHAS, F., BERNARDI, P. *J. Biol. Chem.* 1998. 273, 25734-25740 p.
- GERWICK, W. H., FENICAL, W. *J. Org. Chem.* 1981. 46, 22-27 p.
- HOWARD, B. M., CLARKSON, K., BERNSTEIN, R. L. *Tetrahedron Lett.* 1979. 20, 4449-4452 p.
- KATAOKA, K., HARADA, A., NAGASAKI, Y. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001. 47, 113-131 p.
- LATORRE, B. A. *Revista Frutícola.* 1986. 7, 75-83 p.
- LI, X., CHOI, H. D., KANG, J. S., LEE, C., SON, B. W. *J. Nat. Prod.* 2003. 66, 1499-1500 p.
- MAHIOU, V., ROBLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVE, A. *J. Nat. Prod.* 1996. 59, 694-697 p.

MCPHAIL, K. L., DAVIES-COLEMAN, M. T., STARMER, J. *J. Nat. Prod.* 2001. 64, 1183-1190 p.

Merck Index, 9th ed, Merck, New Jersey, 1976. 1263-1291 p.

MOLKENBUHR, E. L., TAPIA, B. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Mercado de las flores de corte. 2005. <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/Mercados/nov-05.pdf>> [Consulta: 12/5/2013]

MORRÉ, D. J., MORRÉ, D. M. *Free Radic. Res.* 2003. 37, 795-808 p.

NAGARAJAN, R. *Colloids Surf., B.* 1999. 16, 55-72 p.

OCHI, M., KOTSUKI, H., INOUE, S., TANIGUCHI, M., TOKOROYAMA, T. *Chem. Lett.* 1979. 831-832 p.

PÉROMBELON, M. C. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1980. 18, 361-387.

PRINS, T., TUDZYNSKI, P., VON TIEDEMANN, A., TUDZYNSKI, B., HAVE, A., HANSEN, M., TENBERGE, K., VAN KAN, J. *In: Fungal Pathology.* J. Kronstad, ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. 2000. 33-64 p.

Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Agricultura Chilena 2014 Una Perspectiva de Mediano Plazo. [En línea] <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/publica/Agricultura2014.pdf>> [Consulta: 2/8/2012]

QUANG, D. N., HASHIMOTO, T., ARAKAWA, Y., KOHCHI, C., NISHIZAWA, T., SOMA, G. I., ASAKAWA, Y. *Bioorg. Med.Chem.* 2006. 14, 164-168 p.

RAVI, B. N., WELLS, R. J. *Aust. J. Chem.* 1982. 35, 105-112 p.

REDDY, P., URBAN, S. *Phytochemistry* 2009. 70, 250-255 p.

REPKA, V. *Biol. Plantarum.* 2006. 50, 94-106 p.

REYNOLDS, G., RODRIGUEZ, E. *Phytochem.* 1979. 18, 1567-1568 p.

REYNOLDS, G., RODRÍGUEZ, E. *Planta Medica.* 1981. 43, 187-193 p.

RODRIGUES, M. La producción y el comercio de la papa en el contexto internacional y latinoamericano. *Revista de la papa.* Achipa. 2004. 6(20), 8-9 p.

RODRÍGUEZ, E. Plant Resistance to Insects. P. Hedin; ACS Symposium Series Vol. 208; American Chemical Society: Washington, DC. 1983. Chapter 17, 291-303 p.

RUDALI, G. *C. R. Soc. Biol.* 1966. 160, 1365 p.

- RUDALI, G., MENETRIER, L. *Therapie*, 1967. 22, 895-899 p.
- SALAMANCA, C. H., BARRAZA, R. G., ACEVEDO, B., OLEA, A. F. *J.Chil.Chem.Soc.* 2007. 52, 1025-1029 p.
- SCHMIDT, L. Desafíos en innovación, producción limpia y capital humano en la agricultura. En: Seminario Chile Potencia Alimentaria. [diapositiva]. 2006. 2 p.
- SCHUERGER, A. C., BATZER, J. C. *Plant Dis.* 1993. 77, 472-477 p.
- SEPULVEDA, L., LISSI, E. A., QUINA, F. *Adv.Colloid Interf.Sci.* 1986. 25, 1-27 p.
- SMITH, M., DUNEZ, J., LELLIOTT, R. A., PHILLIPS, D. H., ARCHER, R. A. Manual de Enfermedades de las plantas. Traducido por Fernando García Arenal. Bilbao, España. Mundi - Prensa. 1992. 671 p.
- SON, B. W., KIM, J. C., CHOI, H. D., KANG, J. S. *Arch. Pharm. Res.* 2002. 25, 77-79 p.
- TARGETT, N. M., KEERAN, W. S. *J. Nat. Prod.* 1984. 47, 556-557 p.
- TRAUB, A. J., VICUÑA, B. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Flores de corte: Nuevas oportunidades. 2012. [En línea]
<<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones/doc/4639.pdf>> [Consulta: 12/5/2013]
- TURUNEN, M., WEHLIN, M., SJOBERG, J., LUNDAHL, J., DALLNER, G., BRISMAR, K., SINDELAR, P. J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. 296, 255-260 p.
- TZIVELEKA, L. A., KOUROUNAKIS, A. P., KOUROUNAKIS, P. N., ROUSSIS, V., VAGIASA, C. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 2002. 10, 935-939 p.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Types of Pesticides. [En línea]
<<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>> [Consulta: 5/8/2012]
- Unidad de Desarrollo Rural y Agrícola de la Región de América Latina y el Caribe del Banco Mundial (LCSAR), Ministerio de Agricultura de Chile (MINAGRI) & Fundación para la Innovación Agraria (FIA) del Gobierno de Chile. Sistema de Innovación para la Agricultura Chilena: Un Plan de Acción hacia el 2030. 2011. 34-51 p.
- VEGA, A. S., ROJANO, B., BLAIR, S., SEGURA, C., FIGADERE, B., SEON, B., GRELLIER, P., SÁEZ, J. *Pharmacologyonline.* 2008. 1, 1-8 p.
- WELSH, T. The New Zealand cala. Combined Proceedings International. *Propagators Society.* 1991. 41, 478-484 p.

YÁÑEZ, L. Publicación de la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. Balanza comercial de productos silvoagropecuarios. Avance mensual enero - junio 2012. [En línea] <<http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/servicios-informacion/BalanMen/jun-12.pdf>> [Consulta: 2/8/2012]

ANEXOS

ANEXO A: PROTOCOLOS

A.1 SISTEMA DE ENCAPSULAMIENTO

Preparación de Micelas

- Se usa Pluronic F68 o F127 disuelto en agua desionizada para preparar las micelas. La solución debe ser 0,01 M por lo que se pesan 4,2 g de F68 (8.400 g/mol) y 6,3 g de F127 (12.600 g/mol) respectivamente.
- En un vaso precipitado se mezcla Pluronic (sólido) con una parte del volumen de agua y se mezcla con una espátula hasta completar 50 ml. Alternadamente y por algunos minutos se pone el vaso a baño maría en una estufa a 52°C que es el punto de derretimiento de Pluronic.
- La solución final debe ser transparente, incolora y sin grumos. Dejar ON y usar al día siguiente.

Aumento de la Capacidad de las Micelas

- Las micelas en estado líquido son agrandadas debido a la alta concentración de compuesto que debe ingresar a éstas. Este paso no siempre es necesario, dependerá de la micela y el compuesto. En esta oportunidad este paso no fue necesario al utilizar F127.
- Se agrega una cantidad de diclorometano, se agita en el vórtex y se observa una emulsión, solución blanca y opaca. Cada 5 ml de micelas se ponen 400 µl de diclorometano. Al preparar 50 ml de Pluronic, se deben ingresar 10 veces 400 µl de diclorometano.
- Luego se calienta el tubo indirectamente a 60°C (T° de ebullición del diclorometano), por 30-50 segundos y se agita manualmente para repartir el calor en la mezcla. Se pone escasos segundos en un sonicador para que las burbujas que se encuentran en el fondo suban (cuidar de no rebalsar) y/o se agita en el vórtex.
- Los últimos dos puntos se repiten hasta que la mezcla se vuelva transparente.

Ingreso de los Compuestos a las Micelas

- Se inyecta la mitad del volumen total de compuesto disuelto en diclorometano en la mitad o tres cuartas partes del volumen de Pluronic líquido de acuerdo a la concentración que se quiera obtener finalmente.
- Debido a que los compuestos se encuentran disueltos en diclorometano hay que efectuar el paso 3 descrito en Aumento de la Capacidad de las Micelas, para evaporar el diclorometano.
- Se ingresa la mitad restante de compuesto y el volumen de Pluronic necesario para completar el volumen requerido y se vuelve a evaporar el diclorometano.
- El compuesto encapsulado debe ser transparente y no poseer grumos, sin embargo, mostrará el color característico del compuesto.
- Si se tienen 7,5 mg de compuesto para preparar una solución a 5000 ppm, se ponen 400 µl de diclorometano en el tubo ependorf que contiene el compuesto y se agita hasta disolver.

Luego se toman 200 µl del tubo ependorf y se pasan a un tubo que contenga 1 ml de Pluronic líquido, se procede a evaporar el diclorometano mediante calor y agitación. Luego se introducen los 200 µl restantes de compuesto y los 500 µl restantes de Pluronic lo que dará una solución de 1,5 ml de compuesto a 5000 ppm.

Para evitar la contaminación de los compuestos encapsulados, todos los procedimientos deben ser realizados en una cámara de flujo laminar y utilizar elementos estériles: agua, vasos precipitados, varillas, tubos, puntas, etc.

A.2 ESTUDIO I: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

TEST DE DIFUSIÓN

Consiste en medir el halo de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* en presencia de un compuesto en su estado encapsulado y sin encapsular. La *Botrytis* se inocula en una placa con medio PDA y el compuesto a 50, 150 y 250 ppm y se registra su crecimiento hasta que el Control Positivo 1 alcance los bordes de la placa.

En esta oportunidad se utilizaron los compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y L2 y además se usaron los controles:

- Control Positivo 1, con respecto al crecimiento de *Botrytis* (*Botrytis* en medio PDA).
- Control Positivo 2, con respecto a la acción de los compuestos (*Botrytis* en medio PDA con Captan a 400 ppm).
- Control Negativo 1, con respecto a la acción de los compuestos (*Botrytis* en medio PDA con etanol 1,1% para el test sin encapsular y *Botrytis* en medio PDA con 250 µl de Pluronic F127 para el test con encapsular).

Preparar compuestos sin encapsular

- Se hace una solución stock de 5000 ppm.
- El compuesto es puesto en un microtubo y es pesado, luego se introduce etanol y se disuelve, se extrae el volumen necesario para preparar una solución a 5000 ppm en el volumen deseado que se completa con agua estéril. El volumen de etanol debe ser tal, que al poner el compuesto en la placa, el etanol no supere el 1,1%.
- Si se tienen 10 mg de un compuesto y se desean preparar 2 ml de solución stock, se deben ingresar 450 µl de etanol al tubo ependorf, mezclar hasta disolver y luego traspasar a un tubo falcon los 450 µl y llenar con 1550 µl de agua estéril (la solución stock será 22,5% etanol, lo que producirá que al preparar una placa de 250 ppm, la concentración de etanol en ella sea de 1,1% etanol). Este procedimiento se realiza bajo cámara de flujo laminar y todos los objetos utilizados deben estar estériles para evitar la contaminación de los compuestos.

Preparar compuestos encapsulados

Ver Sistema de Encapsulamiento.

Preparar placas de cultivo

- Se prepara medio PDA agar usando la proporción de 39 g para 1 litro de agua mQ. Este medio se autoclava y luego gelifica, para ser usado debe ser calentado en microondas hasta disolverse por completo y no observar grumos, sin embargo no se puede utilizar inmediatamente ya que el alto calor puede dañar los compuestos, hay que esperar a que disminuya su temperatura, pero no dejar que gelifique.
- Para las placas Petri pequeñas en que el compuesto va a 50 ppm, se ponen 4950 µl de medio de cultivo e inmediatamente se colocan 50 µl de compuesto con o sin encapsular en la placa y se agita sobre el plano de forma de esparcir el compuesto por la placa, se deja gelificar. Se repite el procedimiento para los 150 ppm (150 µl de compuesto y 4850 µl de medio) y 250 ppm (250 µl de compuesto y 4750 µl de medio). Este procedimiento también se realiza en cámara de flujo laminar con objetos estériles.

Inoculación con *Botrytis cinerea*

- 72 horas antes de empezar el experimento la *Botrytis* se replica desde una placa anterior, extrayendo un pequeño trozo de la placa antigua y poniéndolo en el centro de la nueva.
- Las placas son puestas en cámaras de cultivo con fotoperiodo controlado bajo un régimen de 16/8 horas de luz/oscuridad a 20°C.
- Cuando se va a inocular las placas que contienen los compuestos y los controles, a la placa que tiene 72 horas se le cortan discos de 3 mm de diámetro y se colocan al centro de las nuevas placas. Procedimiento en cámara de flujo laminar y con objetos estériles.

Medición del Halo de Crecimiento

- Cada 24 horas y hasta que el hongo toque las paredes de la placa Control Positivo 1 se mide el halo de crecimiento del hongo en cada placa.
- Se tomaron fotografías de alta calidad con una cámara Nikon Coolpix P510, luego las fotografías fueron observadas con la herramienta Microsoft Office Picture Manager con la cual se puede medir en pixeles el halo de crecimiento y hacer una regla de tres con el diámetro de la placa y obtener la medida en centímetros. Luego se calcula el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al Control Positivo 1. Si el ensayo se realiza en triplicado se puede promediar y calcular la desviación estándar.

A.3 ESTUDIO II: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

ENSAYO DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se realiza un *screening* de los diferentes compuestos y/o concentraciones de éste para observar si existe actividad antibacteriana contra cierto patógeno. En este caso *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*.

En esta oportunidad se utilizó el compuesto L1 (ya que de acuerdo a un ensayo previo fue el único que mostró actividad antibacteriana) y además se usaron los controles:

- Control Positivo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (*E. carotova* en medio LB).
- Control Positivo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Cloranfenicol a 500 ppm).
- Control Positivo 3, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Vancomicina a 500 ppm).
- Control Negativo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (medio LB sin inóculo).
- Control Negativo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con etanol 1,1% para el test sin encapsular y *E. carotovora* en medio LB con 40 µl de Pluronic F127 para el test con encapsular).

Preparar compuestos sin encapsular

Ver Test de Difusión.

Preparar compuestos encapsulados

Ver Sistema de Encapsulamiento.

Preparar placas de cultivo

- Se prepara medio LB usando la proporción de 10 g de Triptona, 5 g de Extracto de Levadura y 10 g de NaCl para 1 litro de agua mQ. Este medio se autoclava.
- Se utilizan placas de cultivo estériles de 12 pocillos y fondo plano. En éstas se colocan los compuestos y controles en triplicado y se completa con medio LB hasta alcanzar 1 ml.
- Si se quiere probar un compuesto a 200 ppm se debe introducir en el pocillo 40 µl de la solución stock a 5000 ppm en 960 µl de medio LB.

Inoculación con *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*

- El día anterior se prepara el preinóculo: se deja creciendo la bacteria en un tubo con medio LB y agitación a 150 RPM ON. La bacteria es extraída de cultivo previo.
- Luego se toma un volumen pequeño (20 µl por ejemplo) de preinóculo y se pone en un volumen de LB hasta ajustar según McFarland 0,5 (ver Preparación del Estándar de Turbidez). De esta forma el inóculo preparado tendrá una concentración de 10^8 UFC/ml.
- En cada placa según corresponda se ponen 2,5 µl de inóculo.
- Luego las placas son puestas en un agitador a 27°C durante toda la noche a 120 RPM.

Medición del Crecimiento Bacteriano

- De cada pocillo se extraen 150 µl que son puestos en una placa de cultivo de 96 pocillos y se mide densidad óptica a 595 nm correspondiente al Carril 3 del equipo Microplate Reader Biorad Model 550. Luego se calibra cada pocillo de acuerdo a los componentes y se analizan los resultados.

Cálculo de Unidades Formadoras de Colonias

- Se preparan un día antes placas Petri medianas con medio PDA como se describió en Test de Difusión y se dejan dentro de la cámara de flujo laminar hasta el día siguiente.
- Debido a la alta carga bacteriana que podrían tener los pocillos en que hubo crecimiento bacteriano, es que se hacen diluciones consecutivas en tubos ependorf extrayendo 100 µl cada vez y llevando a un volumen total de 1 ml en medio LB.
- Cuando se ha alcanzado la dilución necesaria (hacer un pre-ensayo para determinar este número) se extraen 20 µl y se vierten formando una gota sobre la placa (se ponen tres gotas para un triplicado) y la placa se inclina hasta que la primera gota llegue al borde inferior.
- Las placas se dejan incubando en una estufa a 24°C y al día siguiente se observan a la lupa, se cuentan las colonias de cada réplica y se promedian. Las colonias deben estar en un rango de 30 a 300 para poder utilizar la siguiente fórmula:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{\text{número de colonias}}{\text{volumen de la muestra} * \text{dilución de la muestra}}$$

Preparación del Estándar de Turbidez

- El estándar de turbidez de McFarland se prepara como una mezcla de cloruro de bario dihidratado ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) 0,18 M y ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,048 M (ver volumen en la siguiente tabla). Al mezclar los dos componentes se forma un precipitado de sulfato de bario, lo que produce turbidez en la solución.
- El estándar puede ser comparado visualmente con una suspensión de bacterias en medio nutritivo.
- Se prepara en un tubo de vidrio y es guardado en refrigerador, resguardado de la luz. Al ser utilizado debe ser agitado para que el precipitado fluya. Si la solución bacteriana que se quiere comparar es demasiado turbia, se diluye con medio de cultivo. Si la solución bacteriana no es lo suficiente turbia, se debe añadir más inóculo.
- Para preparar los diferentes estándares (0,5; 1, 2, 3 y 4) se utiliza la tabla a continuación, que además muestra la correlación con la densidad celular.

Tabla A.1: Nefelómetro del estándar de McFarland.

Nº Estándar de McFarland	0,5	1	2	3	4
Cloruro de Bario (ml)	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Ácido Sulfúrico (ml)	9,95	9,9	9,8	9,7	9,6
Densidad Celular aprox (1×10^8 UFC/ml)	1,5	3,0	6,0	9,0	12,0

ENSAYO DE ESTABILIDAD FRENTE A ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Este ensayo tiene por objetivo determinar la estabilidad de un compuesto en el tiempo. Mediante la medición del crecimiento bacteriano se puede saber si el compuesto es estable en el tiempo. Además se hace el ensayo para un compuesto conocido para obtener una referencia, como Cloranfenicol y Vancomicina.

En esta oportunidad se utilizó el compuesto L1 y además se usaron los controles:

- Control Positivo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (*E. carotova* en medio LB).
- Control Positivo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Cloranfenicol a 500 ppm).
- Control Positivo 3, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con Vancomicina a 500 ppm).
- Control Negativo 1, con respecto al crecimiento de la bacteria (medio LB sin inóculo).
- Control Negativo 2, con respecto a la acción del compuesto (*E. carotovora* en medio LB con etanol 1,1% para el test sin encapsular y *E. carotovora* en medio LB con 40 µl de Pluronic F127 para el test con encapsular).

Preparar compuestos sin encapsular

Ver Test de Difusión.

Preparar compuestos encapsulados

Ver Procedimiento de Encapsulamiento.

Preparar placas de cultivo

Ver Ensayo de Actividad Antibacteriana.

Inoculación con *Erwinia carotovora* y *Bacillus subtilis*

- El día anterior se prepara el preinóculo: se deja creciendo la bacteria en un tubo con medio LB y agitación a 150 RPM ON. La bacteria es extraída de cultivo previo.
- Luego se toma un volumen pequeño (20 µl por ejemplo) de preinóculo y se pone en un volumen de LB hasta ajustar según McFarland 0,5 (ver Preparación del Estándar de Turbidez). De esta forma el inóculo preparado tendrá una concentración de 10^8 UFC/ml.
- En cada placa según corresponda se ponen 2,5 µl de inóculo.
- Luego las placas son puestas en un agitador a 27°C durante toda la noche a 120 RPM.
- Como este ensayo dura 72 horas y el inóculo debe ser fresco, para el pocillo inoculado a las 0 h se utiliza el preinóculo, para el de las 24 h se utiliza el pocillo de las 0 h y se ajusta con McFarland, para el de las 48 h el de las 24 h y así consecutivamente.

Medición del Crecimiento Bacteriano

- De cada pocillo se extraen 150 µl que son puestos en una placa de cultivo de 96 pocillos y se mide turbidez a 595 nm correspondiente al Carril 3 del equipo Microplate Reader Biorad Model 550. Luego se calibra cada pocillo de acuerdo a los componentes y se analizan los resultados.
- Esta medición debe realizarse cada 24 h hasta completar un total de 72 h, debido a que la medición se realiza luego de 24 h transcurrida la inoculación, la primera medición será a las 24 h y la última será a las 96 h.
- Para además corroborar la existencia o ausencia de UFC se realiza el experimento de Cálculo de Unidades Formadoras de Colonias descrito en Ensayo de Actividad

Antibacteriana, pero sin realizar dilución y sin conteo, es decir, sólo para observar la formación o no de colonias. Cabe mencionar que el conteo correspondiente a las 0 h se hará a las 48 h y el último se hará a las 120 h.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

Se calculó utilizando los valores de densidad óptica obtenidos para cada compuesto y concentración, con respecto al resultado obtenido por el Control Positivo 1. Se tomó como restricciones de borde que el Control Positivo 1 corresponde a un 0% de inhibición del crecimiento y que 100% de inhibición es cuando la densidad óptica calibrada vale 0.

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{-100}{\text{densidad óptica Control Positivo 1}} + 100$$

A.4 CINÉTICA DE LIBERACIÓN

Con este ensayo se busca determinar la cinética de liberación de un compuesto desde las micelas del polímero que se ha utilizado para aumentar su solubilidad.

Preparar compuestos sin encapsular

- Pesarse el tubo eppendorf que contiene el compuesto y disolver con 500 µl de diclorometano. Luego traspasar el contenido a un tubo de vidrio aforado y completar hasta 2 ml. El tubo aforado se usa debido a que se manipulará y el diclorometano es muy volátil, de esta forma se conoce el volumen y se rellena si es necesario.

Preparar compuestos encapsulados

Ver Procedimiento de Encapsulamiento.

Curvas de Calibración

Para poder conocer la cinética de liberación, es necesario preparar una curva de calibración, de esta forma al ingresar una medida de absorbancia se puede conocer la molaridad de la muestra. Esto permitirá determinar el Coeficiente de Extinción Molar.

- Se toman 150 µl desde el tubo aforado y se ponen en una cubeta y se mide con un espectrofotómetro UV-Visible, Shimadzu UV-1700.
- Luego se realizan diluciones con diclorometano de la muestra original y se mide absorbancia.
- Se calcula la molaridad, se asocia a cada absorbancia y se hace la curva de calibración. La pendiente de esta curva (que debe pasar por cero) es el Coeficiente de Extinción Molar ϵ .

Medición de la Cinética de Liberación

- El sistema a utilizar son celdas de difusión bicompartimentales, tipo Franz.
- En la parte superior de la celda, el medio dador es llenado con el compuesto encapsulado (700 μM). El compartimiento receptor consiste de agua mQ. Separando ambos compartimientos se ubica una membrana semisintética de celulosa (Sigma, D9570 de 12kD) cuyo paso de difusión tiene un área dependiente del radio de cada celda.
- 1 ml se extrae a intervalos de tiempo preestablecidos (15 minutos) para cuantificar la concentración de compuesto liberado a las longitudes máximas de absorción UV de cada compuesto, utilizando el espectrofotómetro y acorde a las calibraciones previamente realizadas. El volumen de medio receptor es repuesto inmediatamente con medio fresco.
- Cada celda cuenta con un sistema de agitación magnética y la temperatura se mantiene constante (37°C) usando un baño de circulación de agua.
- Los perfiles de liberación se expresan como la fracción porcentual de fármaco liberado respecto al total colocado en el medio dador en función del tiempo.
- La cinética de liberación también es calculada utilizando la ecuación de difusión de Higuchi o Fick, y se aproxima a un valor de velocidad de liberación mediante la recta obtenida de los perfiles de liberación en función de la raíz cuadrada del tiempo.
- Algunas ecuaciones utilizadas son:

$$\text{Molaridad de la muestra (M)} = \frac{\text{abosorbancia de la muestra}}{\epsilon}$$

Compuesto Liberado (g)_t

$$= \text{molaridad de la muestra}_t * \text{volumen de la celda} * \text{PM del compuesto} \\ + \text{compuesto liberado}_{t-1} * \frac{\text{volumen de la muestra}}{\text{volumen de la celda}}$$

$$\% \text{ Compuesto Liberado} = \frac{\text{compuesto liberado}}{\text{masa del compuesto}} * 100$$

ANEXO B: RESULTADOS PRELIMINARES

La primera actividad a desarrollar luego de la inducción al CB-DAL fue el cálculo de los volúmenes de cada compuesto a agregar a las placas de agar para obtener las concentraciones deseadas. Debido a la naturaleza hidrofílica de los compuestos, estos deben disolverse en solvente orgánico, por lo que se decidió utilizar etanol. Sin embargo, el etanol podría resultar tóxico para *B. cinerea*, impidiendo o retrasando su crecimiento y por ende arrojando falsos positivos en los ensayos.

Se utilizaron placas con los volúmenes de etanol necesarios para igualar el porcentaje de etanol que llevarían las placas cuando se hicieran los ensayos con los compuestos. *Botrytis* fue infectada en las placas con etanol, crecida durante 120 horas y se pudo observar que el etanol sí influye en el crecimiento del hongo, inversamente proporcional (a mayor concentración de etanol, menor crecimiento del hongo), pero los resultados no eran lo suficientemente significativos para los porcentajes de estos ensayos y pueden considerarse despreciables. Finalmente se utilizó una concentración del 1,1% en la placa como máximo.

Una vez que se descartó el efecto del etanol en el crecimiento del hongo, se procedió a realizar los ensayos en placa con agar PDA y 10, 100 y 500 μM de cada compuesto. Los compuestos tienen las denominaciones H1, M1, I1, I5, L1, L2. Los ensayos se realizan en triplicado para descartar errores de procedimiento y para promediar los resultados obtenidos. A continuación se muestran los resultados obtenidos para cada compuesto resumidos en tres etapas del crecimiento (24, 72 y 120 horas) y su comparación respecto al Control Negativo (agar + *Botrytis*, sin compuestos) y el Control Positivo (agar + Captan, sin compuestos). Las imágenes que se presentan a continuación fueron registradas con un scanner y no con una cámara fotográfica.

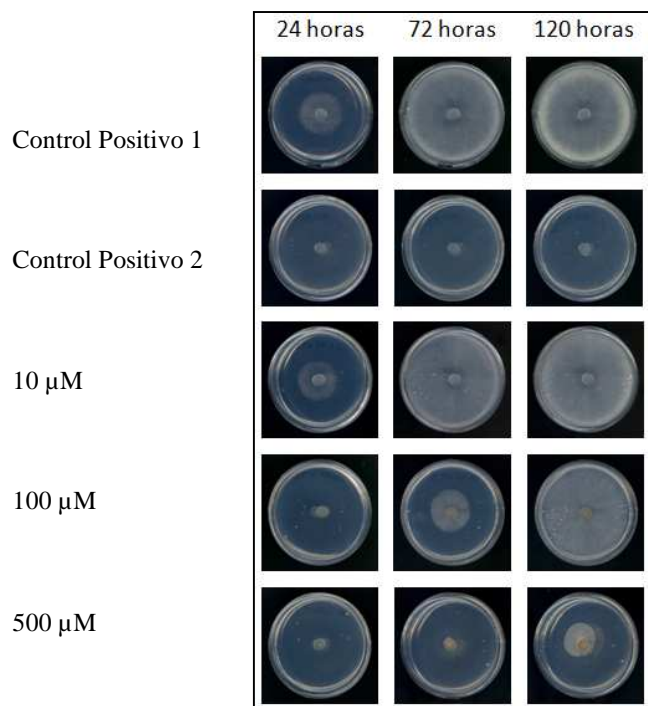


Figura B.1: Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar en presencia de H1 a 10, 100 y 500 μM durante 120 horas.

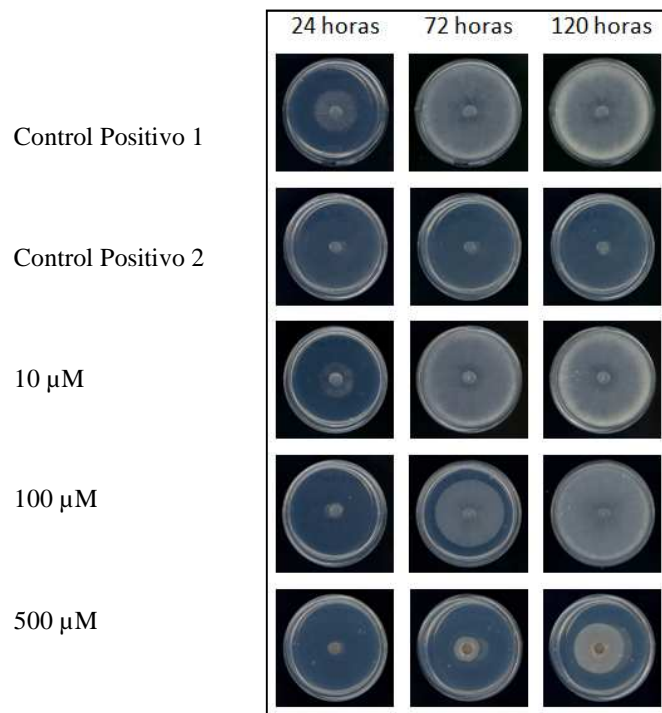


Figura B.2: Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar en presencia de M1 a 10, 100 y 500 μM durante 120 horas.

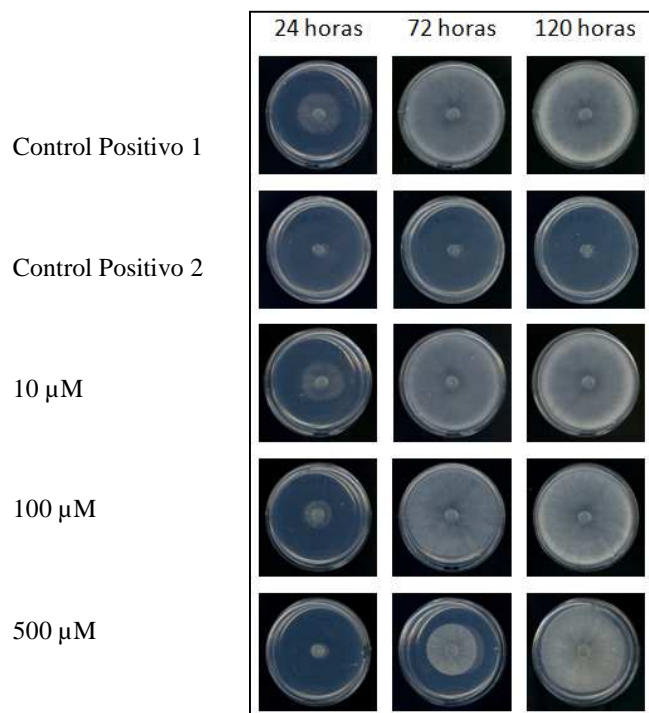


Figura B.3: Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar en presencia de I1 a 10, 100 y 500 μM durante 120 horas.

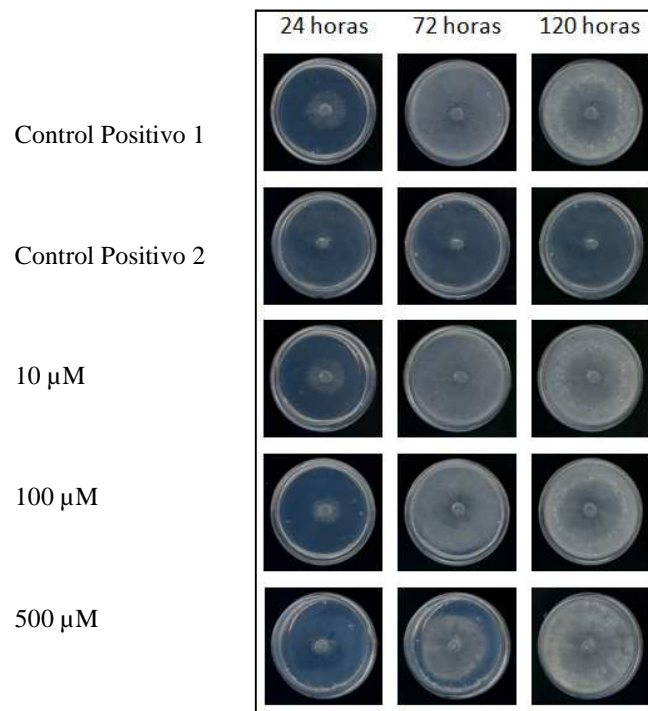


Figura B.4: Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar en presencia de I5 a 10, 100 y 500 μM durante 120 horas.

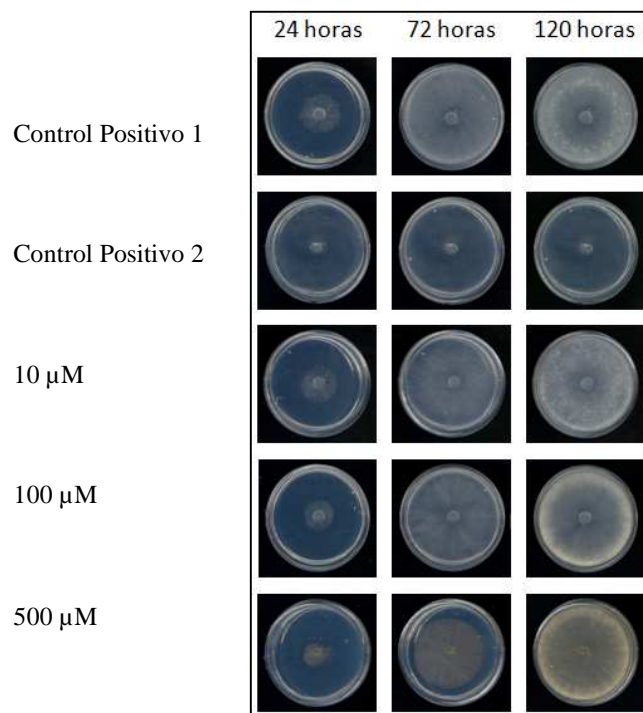


Figura B.5: Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar en presencia de L1 a 10, 100 y 500 μM durante 120 horas.

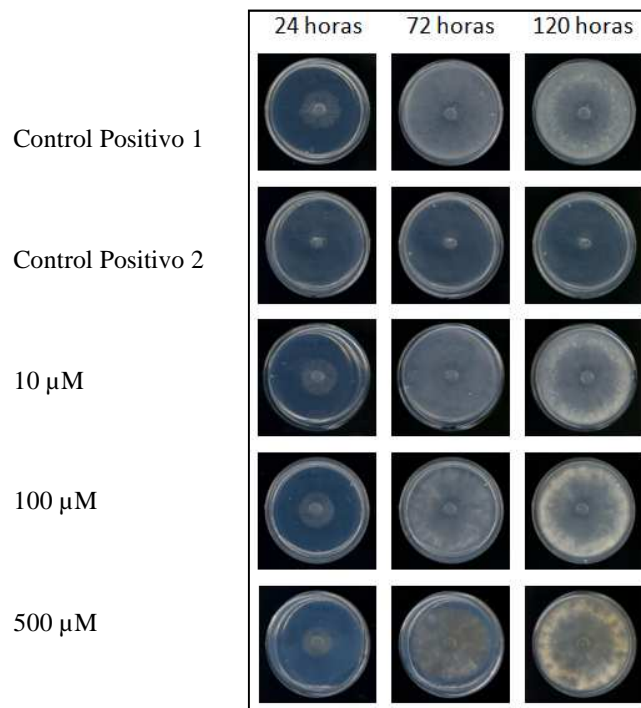


Figura B.6: Crecimiento de *Botrytis cinerea* en placas de agar en presencia de L2 a 10, 100 y 500 μ M durante 120 horas.

Para el ensayo de actividad antibacteriana se hizo un ensayo preliminar para observar qué compuestos tenían potencial. A continuación se presentan dos fotografías ilustrativas de los resultados observados para los compuestos en las placas de cultivo para *Erwinia carotovora* y de la placa control.

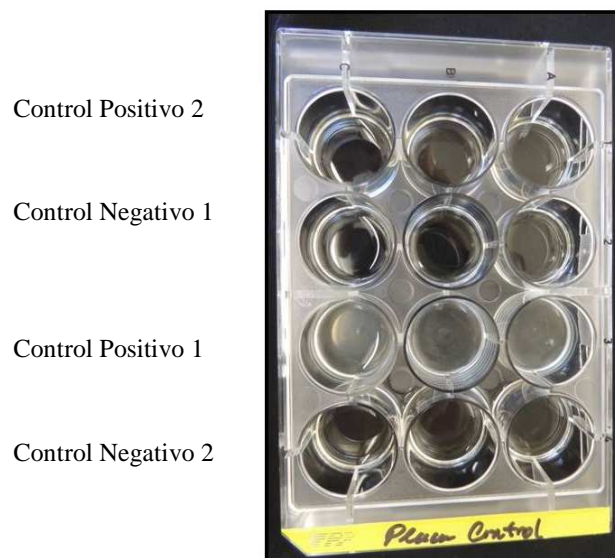


Figura B.7: Placa Control, en el Control Positivo 1 se usó sólo la bacteria en el medio, en el Control Positivo 2 el medio LB con Cloranfenicol, Control Negativo 1 solamente medio y Control Negativo 2 etanol al 1,1%.

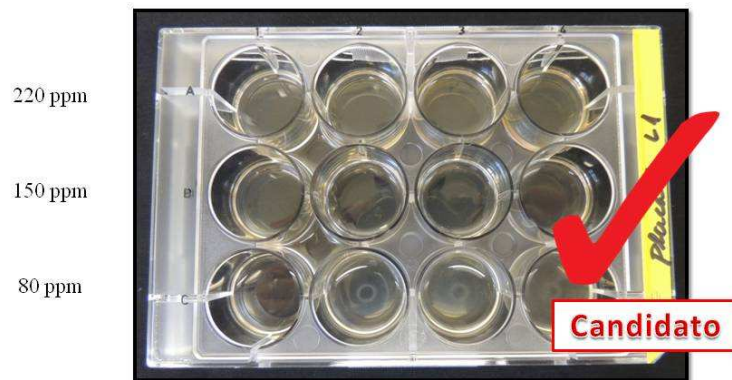


Figura B.8: Placa con el compuesto L1 a 80, 150 y 220 ppm donde se puede apreciar que no hubo crecimiento bacteriano.



Figura B.9: Placa para el compuesto H1 a 80, 150 y 220 ppm donde sí se puede apreciar crecimiento bacteriano.

ANEXO C: RESULTADOS COMPLEMENTARIOS

C.1 SISTEMA DE ENCAPSULAMIENTO

A continuación se presenta una fotografía de los compuestos encapsulados.



Figura C.1: Compuestos H1, M1, I1, I5, L1 y Captan encapsulados (de izquierda a derecha). Cabe mencionar que en esa oportunidad no se disponía de compuesto L2. Como se puede apreciar los compuestos poseen un color anaranjado y amarillento, siendo los más intensos H1 y L1.

C.2 ESTUDIO I: ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

A continuación se presentan las fotografías tomadas de las placas de cultivo de *Botrytis cinerea* en el Test de Difusión. Se presenta la mejor fotografía de las tres réplicas retratadas.

Control Positivo 1 corresponde a *Botrytis* en medio PDA sin ningún compuesto, Control Negativo 1 es *Botrytis* en medio PDA con etanol 1,1% para el test sin encapsular y *Botrytis* en medio PDA con 250 μ l de Pluronic F127 para el test con encapsular, y Control Positivo 2 es *Botrytis* en medio PDA con Captan a 400 ppm.

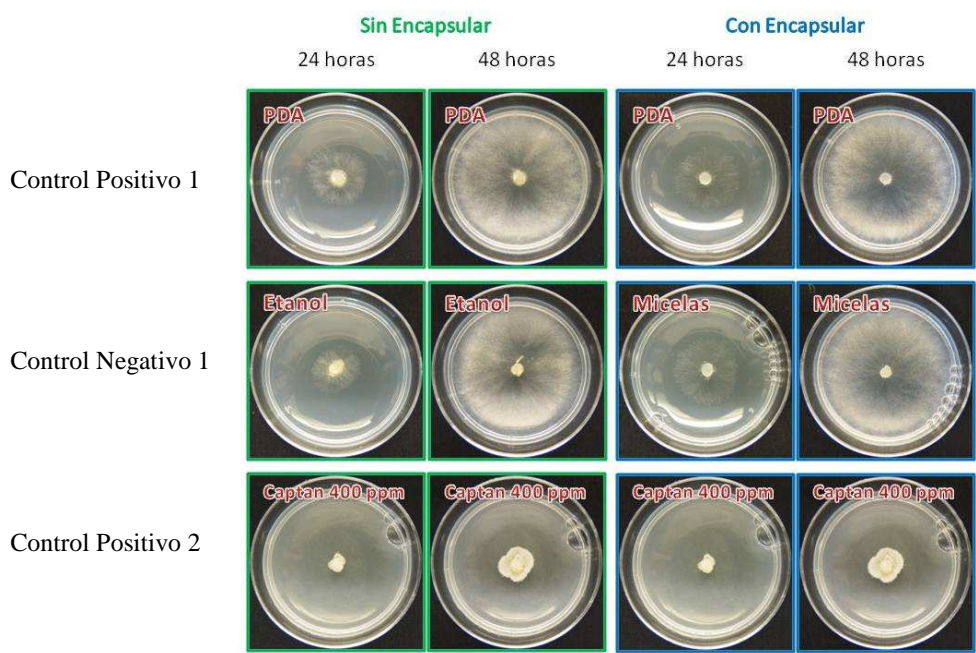


Figura C.2.1: Fotografías de placas control del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

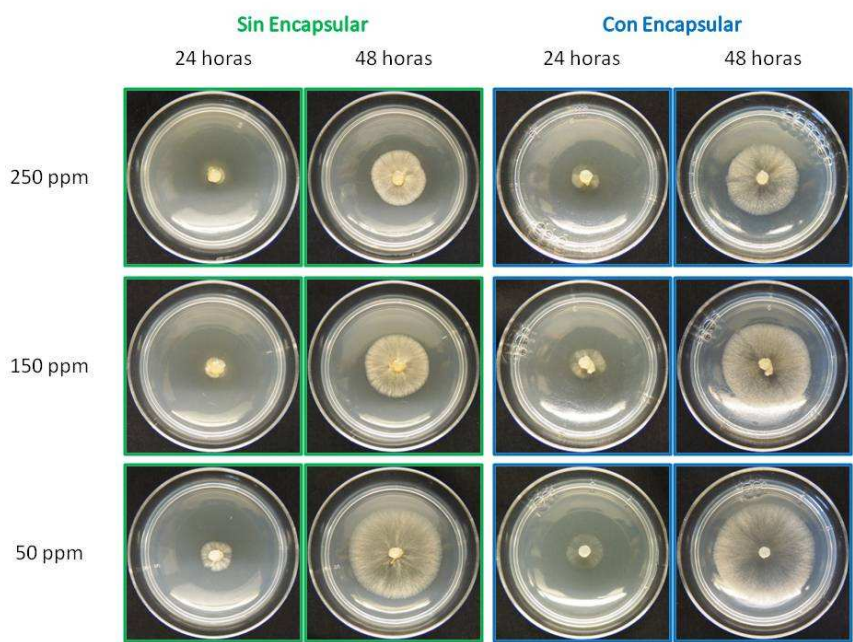


Figura C.2.2: Fotografías de placas H1 a 50, 150 y 200 ppm del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

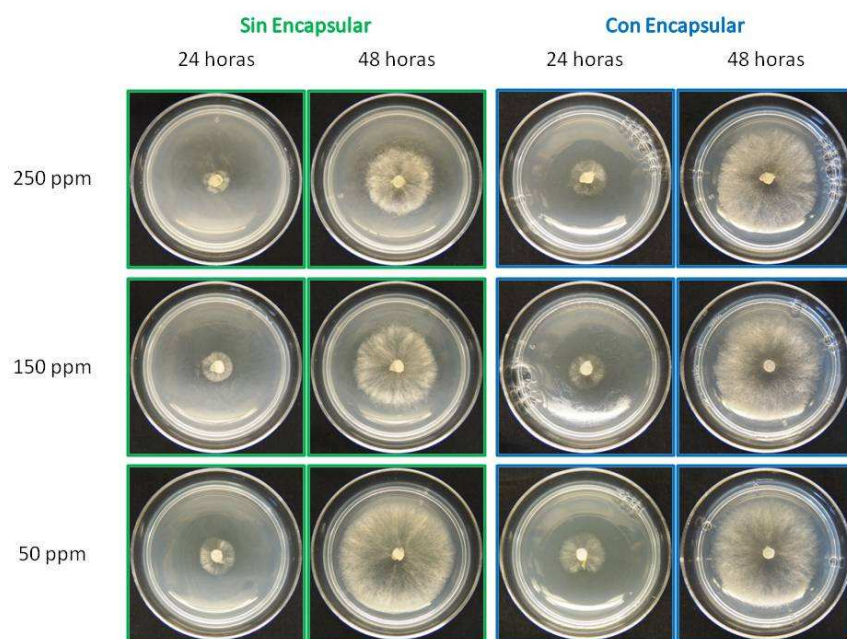


Figura C.2.3: Fotografías de placas M1 a 50, 150 y 200 ppm del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

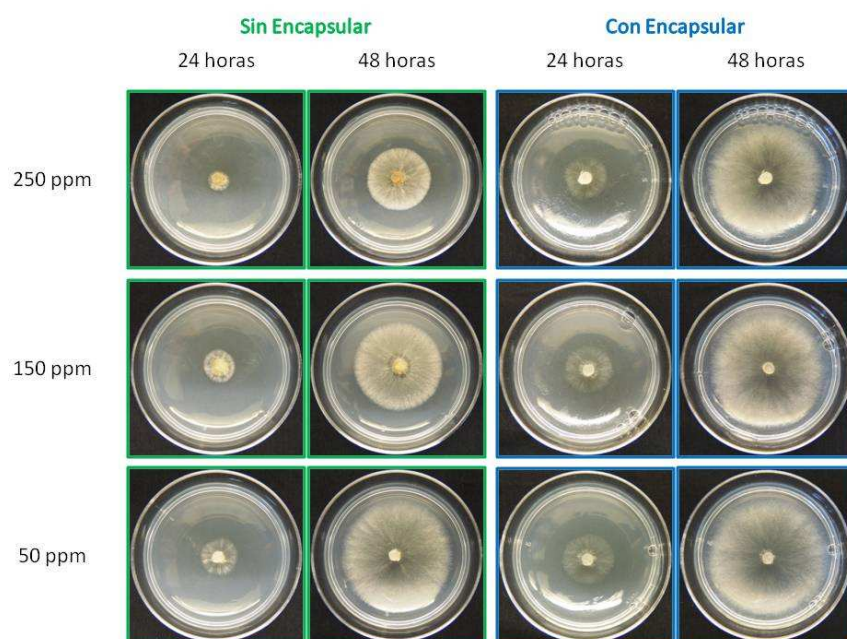


Figura C.2.4: Fotografías de placas I1 a 50, 150 y 200 ppm del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

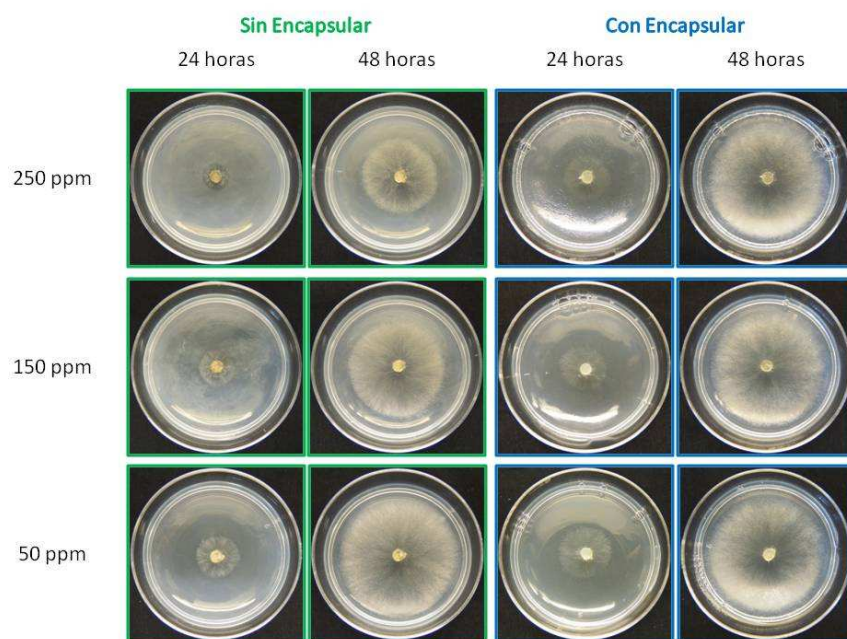


Figura C.2.5: Fotografías de placas I5 a 50, 150 y 200 ppm del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

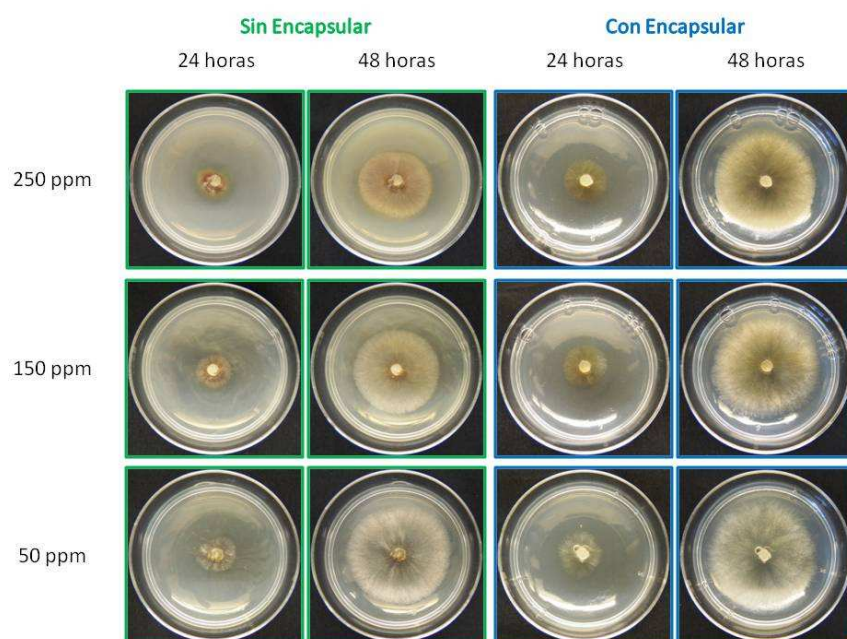


Figura C.2.6: Fotografías de placas L1 a 50, 150 y 200 ppm del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

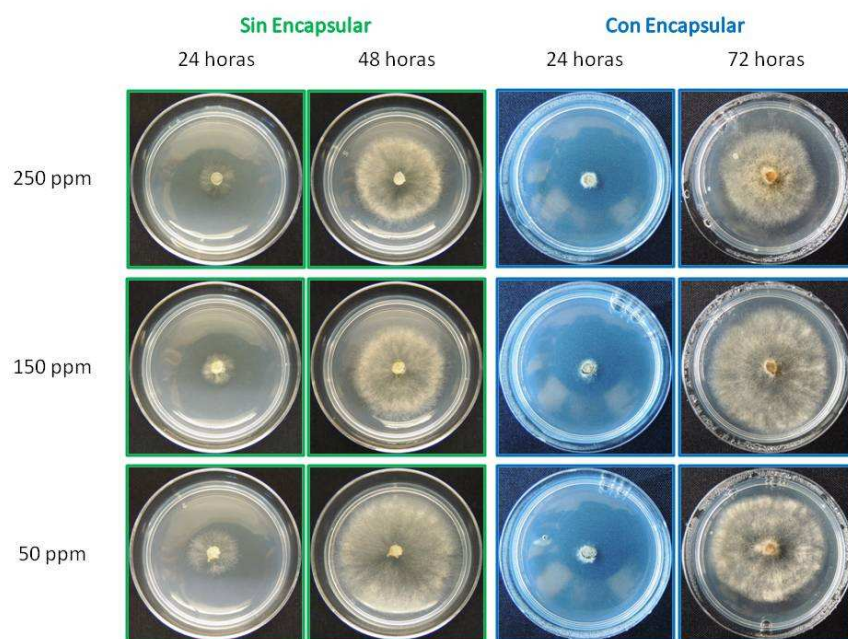


Figura C.2.7: Fotografías de placas L2 a 50, 150 y 200 ppm del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

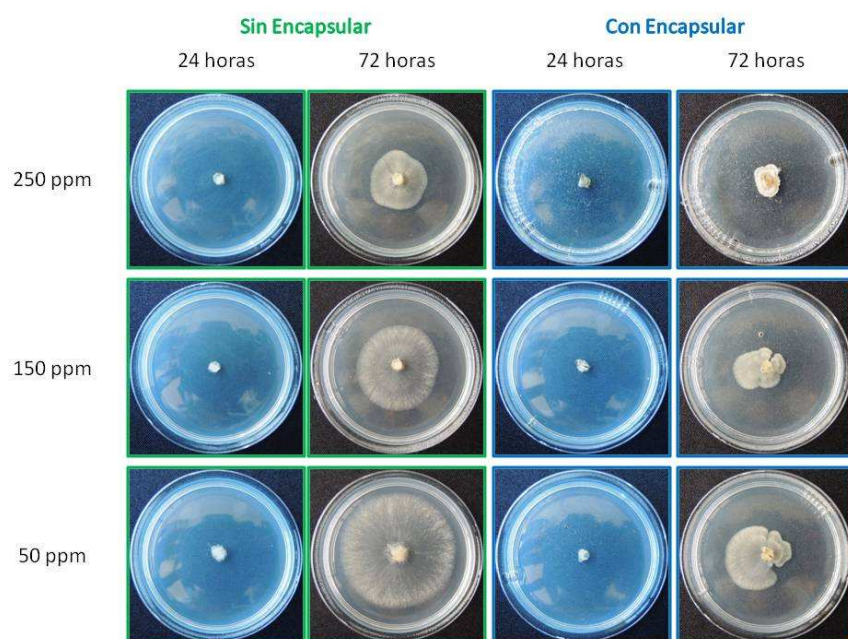


Figura C.2.8: Fotografías de placas Captan a 50, 150 y 200 ppm del test sin encapsular y con encapsular a las 24 y 48 h.

C.3 ESTUDIO II: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se presentan fotografías de las placas utilizadas en el conteo de UFC para el ensayo en que se determinó la concentración de inhibición del crecimiento bacteriano, previo al ensayo de estabilidad.

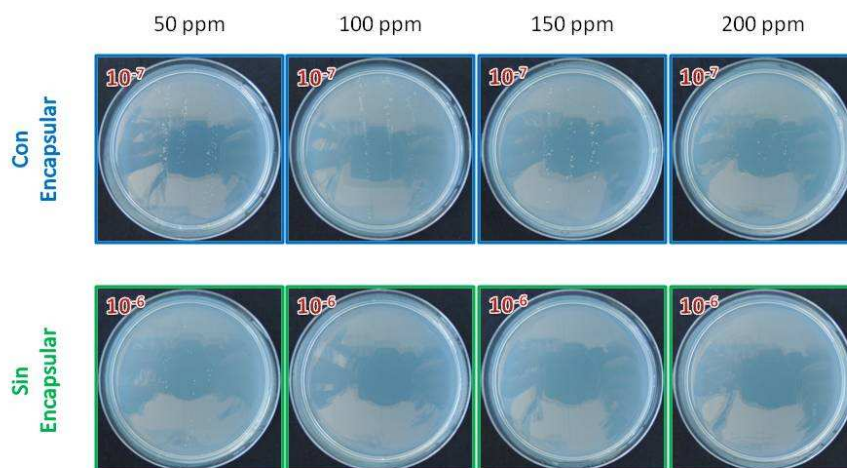


Figura C.3.1: UFC en triplicado para placas con tratamiento de L1 a 50, 100, 150 y 200 ppm con y sin encapsular contra *Erwinia carotovora*. Las colonias pudieron ser observadas a todas las concentraciones del compuesto encapsulado y sólo a 50 ppm del compuesto sin encapsular.

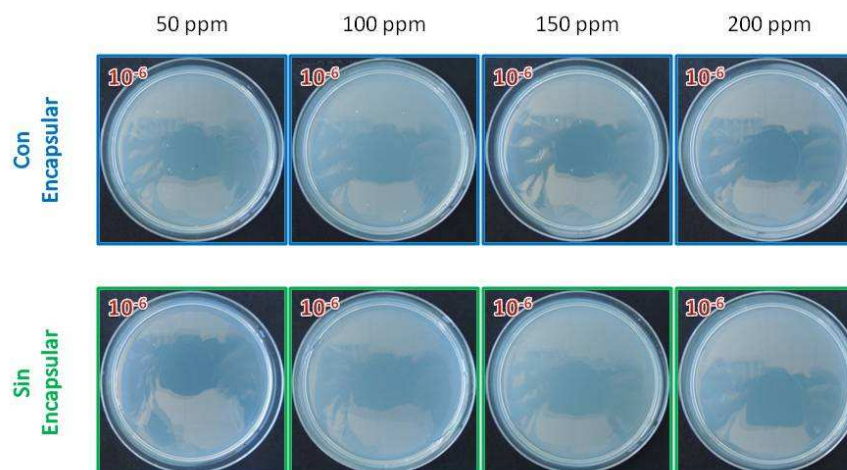


Figura C.3.2: UFC en triplicado para placas con tratamiento de L1 a 50, 100, 150 y 200 ppm con y sin encapsular contra *Bacillus subtilis*. Las colonias pudieron ser observadas a todas las concentraciones del compuesto encapsulado y a ninguna concentración del compuesto sin encapsular.