

## CONCURSO NACIONAL

### ESTUDIOS Y PROYECTOS DE INNOVACIÓN AGRARIA 2014-2015

#### PLAN OPERATIVO

Nombre iniciativa:	Desarrollo de un desinfectante ambiental basado en compuestos de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha de la industria agroalimentaria
Ejecutor:	Universidad de Concepción
Código:	PYT-2015-0127
Fecha:	29.05.2015



## Tabla de contenidos

Tabla de contenidos .....	2
I. Plan de trabajo.....	3
1. Configuración técnica del proyecto .....	3
2. Costos totales consolidados .....	27
3. Anexos .....	29
II. Detalle administrativo (Completado por FIA).....	38

## I. Plan de trabajo

### 1. Configuración técnica del proyecto

#### 1.1. Objetivos del proyecto

##### 1.1.1. Objetivo general<sup>1</sup>

Obtener un desinfectante ambiental basado en compuestos de origen natural para el control de fitopatógenos (hongos y bacterias) de postcosecha para aplicar en la industria agroalimentaria

##### 1.1.2. Objetivos específicos<sup>2</sup>

Nº	Objetivos Específicos (OE)
1	Obtener extractos algales con efecto inhibidor o supresor de fitopatógenos como <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , y <i>Penicillium sp.</i>
2	Generar extractos algales activos cuyas dosis sean efectivas contra los patógenos e inocuas para el ser humano y el medio ambiente.
3	Desarrollar una formulación del desinfectante ambiental en base a extractos naturales activos.
4	Reducir significativamente la pudrición postcosecha en frutales, causada por la carga ambiental de agentes fitopatógenos, mediante el uso de la formulación seleccionada.
5	Obtener un producto competitivo, de aplicación comercial y lograr la transferencia al sector de los resultados, un modelo de negocios y una estrategia de comercialización.

<sup>1</sup> El objetivo general debe dar respuesta a lo que se quiere lograr con el proyecto. Se expresa con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

<sup>2</sup> Los objetivos específicos constituyen los distintos aspectos que se deben abordar conjuntamente para alcanzar el objetivo general del proyecto. Cada objetivo específico debe conducir a uno o varios resultados. Se expresan con un verbo que da cuenta de lo que se va a realizar.

1.2. Resultados esperados e indicadores: Indique los resultados esperados y sus indicadores para cada objetivo específico de acuerdo a la siguiente tabla.

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado <sup>3</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR) <sup>4</sup>				
			Nombre del indicador <sup>5</sup>	Fórmula de cálculo <sup>6</sup>	Línea base del indicador <sup>7</sup> (situación actual)	Meta del indicador <sup>8</sup> (situación final)	Fecha alcance meta <sup>9</sup>
1	1	Colección y selección de extractos de algas con actividad bacteriostática/bactericida y/o fungistática/fungicida sobre fitopatógenos de postcosecha de la industria agroalimentaria.	Inhibición del crecimiento micelial (IM) de fitopatógenos bajo la acción de extractos de algas.	% Inhibición micelial (IM) = $(\pi r_E^2 / \pi r_C^2) \times 100$ , $r_C$ =radio del área de patógeno en el control, y $r_E$ =radio del área de patógeno en presencia del extracto	%IM=61-91% (cloruro de benzalconio, CFQ Sanitizer)	%IM>61% ( <i>Botrytis cinerea</i> ); %IM>87% ( <i>Penicillium sp.</i> ); %IM~91% ( <i>Aspergillus sp.</i> )	Febrero de 2016
			Inhibición de la germinación (IG) de fitopatógenos bajo la acción de extractos de algas	% Inhibición de la germinación (IG) = $100 - (\% \text{ germinación en presencia del extracto } / \% \text{ germinación en el control}) \times 100$	%IG=77-99% (cloruro de benzalconio, CFQ Sanitizer)	%IG>77 ( <i>Botrytis cinerea</i> ); %IG>97% ( <i>Penicillium sp.</i> ); %IG>~99% ( <i>Aspergillus sp.</i> )	Febrero de 2016
			Área de Inhibición de fitopatógenos bajo la acción de extractos de algas	Área de Inhibición = $\pi r_E^2$ con $r_E$ =radio de la zona de inhibición en presencia del extracto	Área inhibición: 0,7-2,9 cm <sup>2</sup> (cloruro de benzalconio, CFQ Sanitizer)	Área de inhibición >0,7 cm <sup>2</sup> ( <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium sp.</i> ) >0,78cm <sup>2</sup> ( <i>Aspergillus sp.</i> ) >2.9 cm <sup>2</sup> ( <i>Pseudomonas sp.</i> )	Febrero de 2016

<sup>3</sup> Considerar que el conjunto de resultados esperados debe dar cuenta del logro del objetivo general de la propuesta.

<sup>4</sup> Los indicadores son una medida de control y demuestran que efectivamente se obtuvieron los resultados. Pueden ser tangibles o intangibles. Siempre deben ser: cuantificables, verificables, relevantes, concretos y asociados a un plazo.

<sup>5</sup> Indicar el nombre del indicador en forma sintética.

<sup>6</sup> Expresar el indicador con una fórmula matemática.

<sup>7</sup> Completar con el valor que tiene el indicador al inicio de la propuesta.

<sup>8</sup> Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar en la propuesta.

<sup>9</sup> Indicar la fecha en la cual se alcanzará la meta del indicador de resultado.



Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado <sup>3</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR) <sup>4</sup>				
			Nombre del indicador <sup>5</sup>	Fórmula de cálculo <sup>6</sup>	Línea base del indicador <sup>7</sup> (situación actual)	Meta del indicador <sup>8</sup> (situación final)	Fecha alcance meta <sup>9</sup>
2	2	Extractos con actividad antimicrobiana inocuos y ecotoxicológicamente permitidos y caracterizados	Concentración inhibitoria máxima media determinada en cultivo celular (según Res. 1557/2014)	$IC_{50} = (50\% - L_{inf}) / (L_{sup} - L_{inf}) (C_{sup} - C_{inf}) + C_{inf}$ ; con $L_{sup}$ : límite superior; $L_{inf}$ : límite inferior; $C_{sup}$ : concentración superior; $C_{inf}$ : concentración inferior.	IC50: 0,07 mg/L (Cloruro de benzalconio, CFQ Sanitizer)	IC50 > 0,07 mg/L	Julio de 2016
			Toxicidad aguda en organismos acuáticos determinada como Concentración letal media (LC50) (según Res. 1557/2014))	$LogLC50 = Xk - d(\sum p - 0,5)$ . Con Xk: log de la concentración con 100% mortalidad; d: intervalo logarítmico; $\sum p$ : suma de mortalidades en todos los ensayos	LC50 = 0.515 mg/L (peces); 0,1 mg/L (Dafnia) (Cloruro de benzalconio, CFQ Sanitizer)	LC50 > 0,1 mg/L	Julio de 2016
			• Toxicidad crónica en organismos acuáticos determinada, cómo concentración de efecto no observado (NOEC) y Mínima concentración de observación de efecto (LOEC) (según Res. 1557/2014)	Valor anterior (NOEC) y posterior (LOEC) para $D_i = D_{(i-1)} + n \times D_{0.01}$ Con $D_i$ : Dosis respuesta n: factor seleccionado para obtener set de 10 tratamientos; $D_{0.01}$ : dosis correspondiente al 1% de la máxima respuesta.	NOEC: 0,056 mg/l LOEC: 0.1 mg/l (Cloruro de benzalconio, CFQ Sanitizer)	NOEC > 0,056 mg/l LOEC > 0, 1 mg/L	Julio de 2016
3	3	Formulación de desinfectante con base extractos naturales y solubles en solvente con actividad sobre fitopatógenos	Desinfectante ambiental contra fitopatógenos formulado	$F = (X \text{ g extracto activo} / Y \text{ volumen solvente})$ Tamaño partícula dispersada ( $\mu m$ ); Consumo de desinfectante ( $ml/m^3$ ) Recuentos postaplicación inferior al inicial (UFC/ $m^3$ ) Degradabilidad / durabilidad del producto	50 g extracto activo / 100 L Tamaño. partícula dispersada < $1\mu m$ ; Consumo de desinfectante 8 $ml/m^3$ Recuentos postaplicación < 2% inicial (UFC/ $m^2$ ) No disponible (CFQ Sanitizer + nebulizador 3X)	50 g extracto activo / 100 L (<2%) Tamaño partícula dispersada < $1\mu m$ ; Consumo de desinfectante < $10ml/m^3$ Recuentos postaplicación < 2% inicial (UFC/ $m^2$ ) Degradabilidad > 28 días (biodegradabilidad OECD 301)	Diciembre de 2016

Nº O E	Nº R E	Resultado Esperado <sup>3</sup> (RE)	Indicador de Resultados (IR) <sup>4</sup>				
			Nombre del indicador <sup>5</sup>	Fórmula de cálculo <sup>6</sup>	Línea base del indicador <sup>7</sup> (situación actual)	Meta del indicador <sup>8</sup> (situación final)	Fecha alcance meta <sup>9</sup>
4	4	Desinfectante ambiental a base de productos naturales con capacidad de disminuir la carga ambiental de fitopatógenos del sector agrícola postcosecha que reduzca la pudrición en frutos.	D (UFC/m <sup>2</sup> ) : contaminación fúngica usando desinfectante ambiental a base de productos naturales	D = recuento microbiano (UFC) /factor de superficie muestreada (m <sup>2</sup> )	D < 200 UFC/m <sup>2</sup> (CFQ Sanitizer + nebulizador 3X)	D < 200 UFC/m <sup>2</sup>	Mayo 2017
5	5	Taller sobre Transferencia de ecotecnologías naturales aplicadas al control de fitopatógenos postcosecha.	Capacitación de personas y profesionales de la industria	Número de personas y profesionales capacitados en el taller de transferencia (empresarios del área de agroalimentaria, investigadores y asociados).	0	>10	Junio 2017
5	6	Solicitud de propiedad intelectual "Desinfectante ambiental a base de extractos naturales para el control de fitopatógenos postcosecha"	Fecha de solicitud de protección de propiedad intelectual en el INAPI	Mes y año de ingreso de 1 solicitud de protección/proyecto al INAPI	0	solicitud de patente ingresada en Mayo de 2017 a INAPI	Junio de 2017
5	7	Modelo de negocios y comercialización de desinfectante ambiental	Costos de producción y comercialización determinado	Costos/beneficios=Σ(beneficios monetarios directos + beneficios sociales) - Σ(costos variables + costos fijos)	0	>1	Julio 2017
			Plan de negocios elaborado, que incluye estrategia de comercialización y plan de negocios	Documento con Plan de Negocio y estrategia de comercialización	0	1	Julio 2017
			Prospección de potenciales licenciatarios	Reporte con el resultado de la prospección de potenciales licenciatarios	0	1	Julio 2017
			Convenio de licenciamiento	Nº de convenios de licenciamiento obtenidos	0	1	Julio 2017



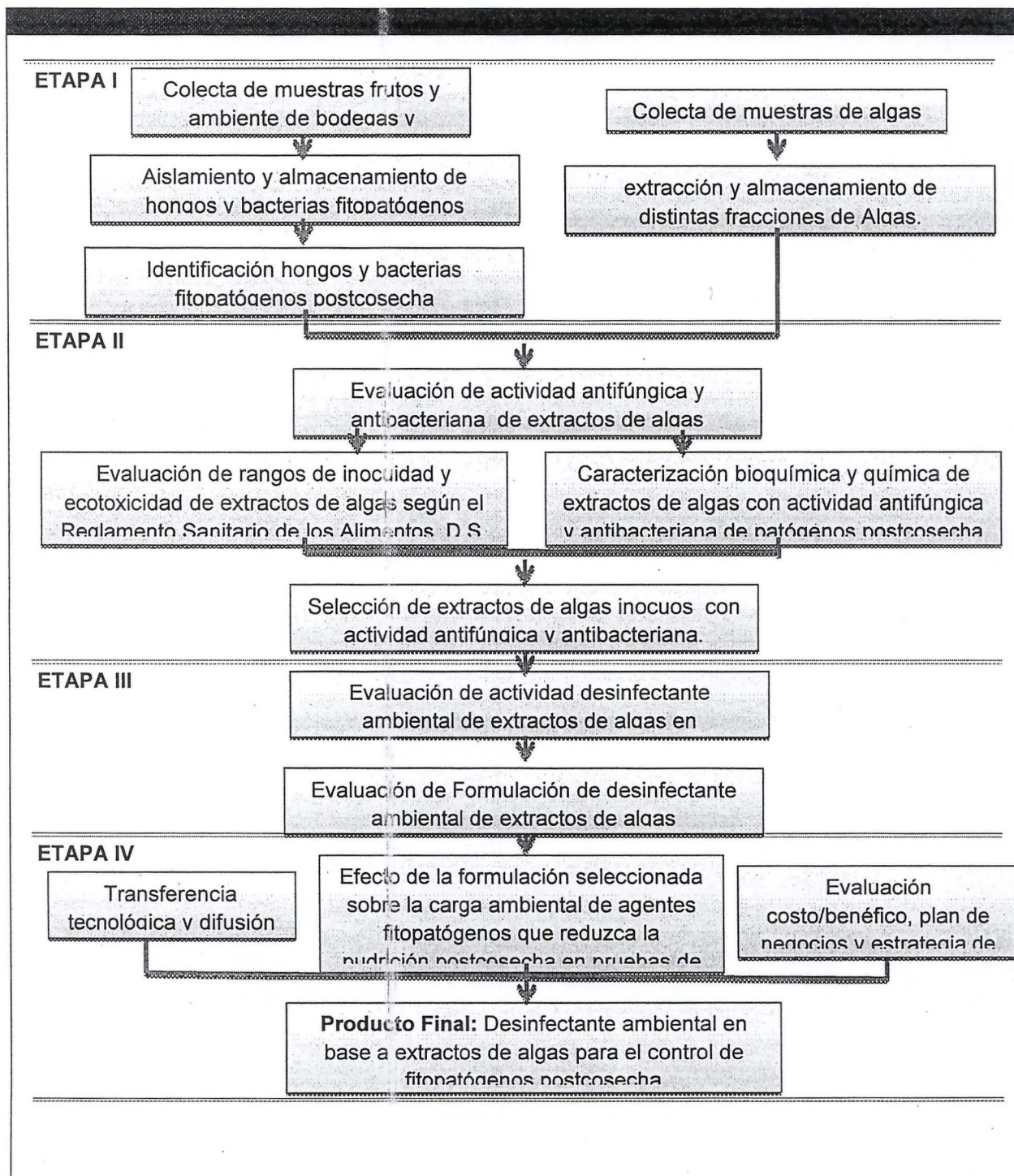
1.3. Indicar los hitos críticos para el proyecto.

Hitos críticos <sup>10</sup>	Resultado Esperado <sup>11</sup> (RE)	Fecha de cumplimiento (mes y año)
1. Colección de extractos de algas con actividad fungicida y/o bactericida	1) Colección de extractos de algas con actividad bacteriostática/ bactericida y/o fungistática/fungicida sobre fitopatógenos de postcosecha de la industria agroalimentaria	Febrero de 2016
2. Rango de concentración de la dosis efectiva de extractos de macroalgas determinada y ecotoxicológicamente permitidos	2) Extractos con actividad antimicrobiana ecotoxicológicamente permitidos con IC <sub>50</sub> >0,07 mg/L, LC <sub>50</sub> > 0,1 mg/L, NOEC > 0,056 mg/l	Julio de 2016
3. Formulación de desinfectante ambiental con extractos naturales	3) Formulación de desinfectante con base extractos naturales y solubles en solvente con actividad sobre fitopatógenos para ensayos <i>in vitro</i> (50 g extracto activo / 100 L (<2%))	Diciembre de 2016
4. Desinfectante ambiental a base de productos naturales contra patógenos agrícolas postcosecha que reduzca la pudrición en frutos	4) Desinfectante ambiental a base de productos naturales con capacidad de disminuir la carga ambiental de fitopatógenos a una concentración máxima esperada < 200 UFC/m <sup>2</sup>	Abril de 2017
5. Solicitud de protección de propiedad intelectual ingresada	5) Solicitud de propiedad intelectual "Desinfectante ambiental a base de extractos naturales para el control de fitopatógenos postcosecha"	Junio de 2017
6. Modelo de negocios y comercialización de desinfectante ambiental diseñado	6) Modelo de negocios y comercialización de desinfectante ambiental (con 1 convenio de licenciamiento obtenido)	Julio de 2017

<sup>10</sup> Un hito representa haber conseguido un logro importante en la propuesta, por lo que deben estar asociados a los resultados de éste. El hecho de que el hito suceda, permite que otras tareas puedan llevarse a cabo.

<sup>11</sup> Un hito puede estar asociado a uno o más resultados esperados y/o a resultados intermedios.

- 1.4. Método: identificar y describir los procedimientos que se van a utilizar para alcanzar cada uno de los objetivos específicos del proyecto. (Incluir al final, las actividades de difusión y transferencia de los resultados del proyecto) (máximo 8.000 caracteres para cada uno).





**Método objetivo 1:** Obtener extractos algales con efecto inhibidor o supresor de fitopatógenos como *Pseudomonas syringae*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus sp.*, y *Penicillium sp.*

### CONTRATACIÓN DE PERSONAL, IMPLEMENTACIÓN DE EQUIPOS

Diseño experimental: Esta etapa consta principalmente de dos actividades, la cual incluye la contratación de los profesionales para la ejecución del proyecto, y la adquisición de equipos necesarios para la realización de los ensayos.

**Actividad 0.1.-** Contratación de personal: Se contratarán los siguientes profesionales para el proyecto: investigador PhD: Nathaly Ruiz-Tagle, Dr. en Biología Celular y Molecular. El técnico y los tesisistas de Magister (Microbiología, Química) y de pregrado (Biotecnología, Bioingeniería, Bioquímica) serán elegidos por el equipo de investigadores nacionales del proyecto, en el momento adecuado.

**Actividad 0.2.-** Adquisición de equipos: Para realizar las actividades comprometidas en el proyecto, se comprarán los equipos necesarios que no estén disponibles en el Laboratorio de Biopelículas y Microbiología Ambiental del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción.

### RECOLECCIÓN DE ALGAS EN EL INTERMAREAL ROCOSO DE LA BAHÍA DE CONCEPCIÓN,

Durante esta etapa se realizará la colección de algas desde superficies rocosas intermareales y se realizarán extractos en distintos solventes.

**Actividad 1.1.-** Recolección de macroorganismos marinos. Se recolectarán manualmente macroalgas de diferentes localidades (ej. *Porphyra sp*, *Ulva sp*, *Chondrachantus chamissoi*, *Mastocarpus latissimus*, *Mazzaella sp.*,) mediante selección visual en la zona intermareal baja y media-alta en diferentes localidades de la VIII Región (Dichato, Cocholgue, Taucú, etc.). Las muestras de algas serán inmediatamente subdivididas para la obtención de extractos y depositadas en bolsas y mantenidas a 4°C hasta su manipulación en laboratorio (<6h).

### RECOLECCIÓN DE FRUTOS INFECTADOS Y AISLAMIENTO DE FITOPATÓGENOS

Durante esta etapa se realizará la colección de frutos desde líneas de almacenamiento de frutos. Se aislarán y caracterizarán fitopatógenos y se realizará un *screening* de inhibición de extractos de algas obtenidos por diferentes solventes sobre los fitopatógenos establecidos como modelos.

**Actividad 1.2.-** Colección de frutos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) y cerezos (*Prunus avium* L) con síntomas de patógenos desde postcosecha: detección y aislamiento de hongos y bacterias. Trozos de frutos con síntomas y signos de los patógenos serán incubados dentro de placas de Petri, con papel absorbente humedecido en agua destilada estéril, conformando una cámara húmeda hasta la esporulación del patógeno. Las conidias serán colectadas en agua destilada estéril (Sanfuentes and Ferreira, 1997) y transferidas a agar papa-dextrosa con 100 µg/mL de sulfato de estreptomycin y repicadas hasta obtener cultivos puros. El aislamiento de bacterias se realizará desde fragmentos de frutos con zonas necróticas, los cuales serán sonicados en PBS. La suspensión resultante será sembrada en estría en medio sólido King B, se seleccionará las colonias fluorescentes a radiación UV.

**Actividad 1.3.-** Identificación bioquímica y molecular de cepas/serovar de fitopatógenos

1.3.1.-Caracterización morfológica y bioquímica: Se examinarán las características morfológicas como forma y dimensiones de conidióforos, conidias, color y apariencia de la colonia (Lorenzini and Zapparoli, 2014). Bacterias fitopatógenas serán caracterizadas con tinción gram, morfología de sus



colonias, tamaño de halo de inhibición.

1.3.2.-Caracterización molecular: Desde colonias crecidas en medios sólidos, se extraerá el ADN mediante ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research). El ADNr 16S o 18S serán secuenciados para su determinación taxonómica. Para ello, el ADN será amplificado por medio de la PCR usando los partidores 9-27F y 1492R (Brosius et al., 1981) para bacterias y Fung-GC, ITS4 y NS1 y de acuerdo a (Lorenzini and Zapparoli, 2014) para fungi, en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Las condiciones de la PCR y temperaturas se llevarán a cabo de acuerdo a (Jopía et al., 2011). El producto de PCR será secuenciado en Macrogen, Inc. Corea (<http://www.macrogen.com>). Finalmente las secuencias de ADNr 16S serán analizadas usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) y comparadas con secuencias obtenidas desde GenBank.

### OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA

En esta etapa se realizarán extracciones y fraccionamiento de frondas de macroalgas en el Lab. Química de Productos Naturales de la Universidad de Concepción, la recolección de muestras se realizará en forma continua.

**Actividad 1.4.-** Obtención de extractos y fracciones desde macroalgas con actividad inhibitoria (Lab. Fitoquímica). Las especies de algas serán utilizadas para la extracción de compuestos antimicrobianos. La metodología está de acuerdo con las técnicas de detección, aislamiento, fraccionamiento (columna cromatográfica) y determinación estructural aplicadas en el estudio de componentes bioactivos a partir de material vegetal y/o animal. Se incluyen ensayos de bioactividad en microplaca de extractos, fracciones y compuestos puros.

Obtención de extractos desde algas: Las muestras de algas serán lavadas con agua de mar estéril para eliminar otros organismos asociados. El volumen de algas frescas será obtenido por desplazamiento de agua en un cilindro graduado. Se pesará aprox. 0,5 Kg de alga fresca y se dejará secar en estufa a 40 °C por 24 h. El producto seco se dejará macerando en metanol p.a por un periodo de 24 h y el líquido se filtrará en un embudo simple y se llevará a rotavapor hasta sequedad, obteniendo así un extracto metanólico total. El extracto metanólico polar será fraccionado mediante extracción líquido-líquido obteniendo fracciones orgánicas de hexano, diclorometano y acetato de etilo que luego se concentrarán en rotavapor a 40°C y almacenadas en refrigerador hasta su posterior análisis en CG-EM.

**Actividad 1.5.-** Ensayos de inhibición de extractos de algas contra patógenos: *B. cinerea*, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., y *P. syringae* (Lab. Biopelículas y Microbiología Ambiental y Lab. Fitopatología Forestal)

1.5.1.- Difusión de extractos algales con potencial antimicrobiano en discos de papel filtro sobre tapices del *P. syringae*: Se cultivarán *P. syringae* y luego serán transferidos a agar nutritivo. Sobre ellas se dispondrán discos circulares estériles (7 mm diámetro) de papel filtro, impregnados con extractos de algas. Discos con antibióticos conocidos serán utilizados como controles positivos de inhibición de crecimiento. Las placas de agar serán incubadas (temperatura 10-15°C) hasta que las bacterias desarrollen en tapiz. Se medirá el radio de la zona de inhibición entre el disco y la capa bacteriana. El radio de inhibición es un indicador semi-cuantitativo de la efectividad de la sustancia testada para inhibir el crecimiento del organismo blanco. Las imágenes serán capturadas mediante Sistema fotodocumentador de imágenes FireReader D56/software FireReader 1D (Uvitec, Cambridge) y analizadas mediante software Advanced UVI-Band (Uvitec, Cambridge)

1.5.2.- Ensayos de inhibición de extractos activos contra hongos patógenos (Lab. Biopelículas, Lab. Fitopatología Forestal), a) Obtención de conidias de *B. cinerea*, *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp.: Los hongos serán cultivados en agar-papa-dextrosa (APD, Difco) a 24°C, por 7-10 días,



procediéndose a colectar las colonias agregando agua destilada estéril (0,1% tween 20) y removiendo suavemente la superficie de las colonias (Sanfuentes and Ferreira, 1997). La concentración de la suspensión de conidias se ajustará utilizando un hematocitómetro. b) Ontención de micelio: Los hongos serán cultivados como se describe anteriormente (a). Después de una incubación por 4-7 días, se colectarán disco de agar (5 mm diámetro) con micelio desde los bordes de las colonias (crecimiento activo).

1.5.3.- Efecto de los extractos de algas en el crecimiento micelial de *B. cinerea*: La toxicidad de los extractos naturales y fungicidas comerciales serán evaluados usando el test de crecimiento radial en agar papa dextrosa (APD 50%). Extractos totales, fraccionados y fungicidas comerciales serán disueltos en metanol a diferentes concentraciones. 100  $\mu$ L de esta solución serán agregadas a 5 ml de medio (TSA 50%). El medio con y sin extractos será dispuesto en placas Petri (9 cm de diámetro) conteniendo agar APD 50%. Las placas serán ventiladas en una cámara de flujo laminar estéril, por al menos 30 min para evaporar el metanol. En el centro de cada placa de Petri será dispuesto un disco de micelio (5 mm diámetro) del hongo en prueba y luego incubados a 24°C por siete días, en oscuridad. Diariamente será medido el diámetro de la colonia, dos medidas perpendiculares. En las placas control, el medio de cultivo recibirá 5 ml de medio TSA. El experimento seguirá un diseño completamente al azar (Soylu et al, 2010), con tres repeticiones por especie fúngica.

Los discos de agar con micelio del patógeno que no presenten crecimiento serán transferidos a APD 50% sin extracto algal e incubados cinco días a 24°C. El extracto algal será considerado con actividad fungicida cuando no exista crecimiento micelial desde los disco con el patógeno, por otro lado, cuando ocurra crecimiento del patógeno el efecto será fungistático.

Para determinar la sensibilidad de aislados de *B. cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. hacia fungicidas, placas de Petri conteniendo 20 ml of MM (medio mínimo) (Maraite et al., 1980) suplementado con 0, 0.03, 0.1, 1.0, 3.0, 10.0, 30.0, y 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de fungicida serán centralmente inoculados con plugs de 5 mm de la periferia de cultivos de tres días de edad e incubados a 22°C. El crecimiento radial de la colonia será medida en dos direcciones perpendiculares 4 y 5 día después, y 50% inhibición del crecimiento micelial (CE50), los valores serán calculados para cada aislado/especie.

1.5.4.- Efecto de los extractos de algas en la germinación de conidias de *B. cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.: Los ensayos de germinación se llevaran a cabo en portaobjetos escavados depositándose 30  $\mu$ L del extracto algal para dar una concentración final de 40  $\mu$ g/mL. Se evaporará el metanol como se indicó previamente. Luego, en los portaobjetos se depositará 50  $\mu$ L de suspensión de conidias del patógeno en prueba ( $1 \times 10^5$  conidias /ml). Los portaobjetos serán mantenidos en cámara húmeda, a 24°C, por hasta 24h. La germinación será evaluada cada seis horas. Se considerará como una conidia germinada cuando la longitud del tubo germinativo sea igual o mayor que el diámetro de la conidia. El ensayo seguirá un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones, evaluándose 100 conidias por cada una. Para determinar la actividad fungicida de los extractos algales, se establecerá un ensayo semejante recientemente. Después se incubará por una hora extracto+patógeno, la suspensión en extracto será pasada por membrana de nitrocelulosa (0,8  $\mu$ m), lavada con 10 ml de ADE para colectar las conidias de la membrana. La suspensión será plaquada en medio de APD 50%, seguido de incubación a 24°C por un día. Será evaluado el número de colonias formadas (UFC) (Amiri et al, 2008). El ensayo seguirá un diseño completamente al azar, con tres repeticiones (placa de Petri).

**Actividad 1.6.-** Evaluación de actividad de los extractos sobre la formación de biopelículas de patógenos:

1.6.1.-Evaluación del efecto de los extractos sobre la formación de biopelículas de fitopatógenos: Cultivos de fitopatógenos serán desarrollados en microplacas de 96 pocillos. Para ello se mezclarán 20  $\mu$ L de inóculo conteniendo *P. syringae* ( $1 \times 10^5$  cél/ml), 180  $\mu$ L medio TSB 50%, como blanco se



usará 200 µl de TSB 50%, serán incubados en agitación (120 rpm) por 6 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se separará la fase planctónica y las células adheridas (biopelículas) y esta última se lavará con PBS (tres veces). Sobre este se agregarán 100 µl de extractos de algas con actividad inhibitoria más 100 µl de medio TSB al 50%. El control negativo será 100 µl de sobrenadante del cultivo de crecimiento de los modelos más 100 µl de medio TSB al 50%. Las placas serán incubadas por 24 h en agitación constante a 15°C. Sobre 100 µl de las células de la fase planctónica se aplicarán 100 µl de sobrenadante.

**1.6.2.-Evaluación cristal violeta:** La fase pláctónica de los cultivos anteriores se traspasará a una nueva microplaca y se medirá la absorbancia a 540 nm. Los pocillos conteniendo las biopelículas de *Pseudomonas syringae* se lavarán con PBS y se fijarán con 100 µl de metanol por 15 min., teñirán con 100 µL de cristal violeta 1%, por 20 min, seguido por 100 µL de etanol 70%. Por absorbancia a 595 nm se evaluará la biopelícula resultante (Peeters et al., 2008)

Se cuantificará las biopelículas formadas a través de la fórmula del SBF (formación específica de biopelículas).  $SBF = (AB - CW) / G$ , en donde AB: densidad óptica de biopelícula, CW: Densidad óptica de control, G: Densidad óptica de fase planctónica (Paiva de Almeida and Leal, 2012).

**1.6.3.- Análisis estadísticos:** Se compararán los resultados del SBF obtenidas en los diferentes tratamientos mediante análisis de varianza de una vía (ANOVA) (Lee and Ahn, 2003) seguido de un test de comparación múltiple Dunnett's donde los valores de  $p < 0,05$  serán considerados estadísticamente significativos. Aquellos extractos que generen halos de inhibición  $> 10\text{mm}$ , o crecimientos de fitopatógenos  $\leq$  a los observados por fungicidas comerciales (controles), serán sometidos a ensayos de citotoxicidad para determinar rangos de inocuidad.

**Método objetivo 2:** Generar extractos algales activos cuyas dosis sean efectivas contra los patógenos e inocuas para el ser humano y el medio ambiente.

Las concentraciones efectivas de extractos se someterán a evaluación la su citotoxicidad (actividad 2.1 y 2.2) y se seleccionarán aquellas concentraciones inocuas validando la efectividad realizando nuevamente la actividad 1.6. Una vez seleccionado el extracto con el cual se formulará el desinfectante ambiental, el extracto será sometido a pruebas que de acuerdo a Reglamento Sanitario de los Alimentos DTO. N°977/96, Resolución ex. N° 33/10 la cual "Fija tolerancias máximas de residuos de plaguicidas en alimentos" y Resolución ex. N° 1557/2014 que "Establece exigencias para la autorización de plaguicidas, en la que se deberá utilizar las directrices de la OCDE u OCSP de la EPA, o protocolos que cumplan con lo establecido en el inciso tercero del numeral 4.3. están señaladas y se indican más adelante.

**Actividad 2.1.-** Determinación de rangos de inocuidad para la selección de extractos con actividad antimicrobiana usando líneas celulares.

**2.1.1- Cultivo y mantención de línea celular:** Los cultivos celulares serán mantenidos en una incubadora a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular serán realizados en un gabinete de seguridad biológica nivel II y las células serán almacenadas por congelamiento con DMSO 5% v/v en nitrógeno líquido. Se utilizará la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro 2a (ATCC CCL-131), la cual será cultivada en RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con un 10% de SBF (Gibco), amphotericina B (0,25UG/mL) (Gibco), Penicilina/estreptomicina (100U/mL/100ug/mL) (Gibco), Piruvato de sodio (1mM) (Gibco), glutamina (2mM) (Gibco). La línea celular será cultivada hasta un 80% de confluencia, con cambios de medio cada 2-3 días y subcultivadas a una razón de 1:3 o 1:4 mediante el uso de tripsina 0,25% (p/v) y EDTA 0,2% (p/v).

**2.1.2.- Análisis de Citotoxicidad:** La determinación de citotoxicidad del extracto de algas se realizará



mediante un ensayo de viabilidad celular (MTT). Las células serán sembradas a la densidad celular 250.000 células/ml en un volumen final de 200  $\mu$ L sobre placas de 96 pocillos y luego de una incubación de 24 h a 37°C, se adicionará una concentración definida del extracto de algas, a partir de una solución stock del extracto y se prepararán 6 diluciones seriadas. Se analizará el efecto de las diluciones en función del tiempo de efecto, y para esto se propone incubar el cultivo celular con el extracto 24 y 48 h, finalizado el tiempo de incubación el medio será retirado y finalmente se cuantificará la viabilidad usando MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro, Invitrogen) según las indicaciones del fabricante. Esta respuesta colorimétrica, es relacionada directamente con la viabilidad celular (Ying et al., 2001) Las curvas dosis-respuesta obtenidas serán analizadas mediante el programa estadístico Prism 4 (GraphPad, San Diego, California, USA) y se obtendrá el valor estimado de IC50.

## Actividad 2.2.- Estudios de Ecotoxicidad aguda y crónica en organismos.

**2.2.1.- Metodología para Bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia*:** Este método permite medir el efecto de una sustancia pura o efluente sobre neonatos (<24 horas) de *Daphnia*, los cuales son expuestos bajo condiciones de laboratorio controladas a una serie de diluciones de una sustancia o efluente por un tiempo de 24 o 48 horas, al final de las cuales se estima el LC<sub>50</sub>, que corresponde a la concentración de la sustancia o efluente que en 24 o 48 horas provoca la muerte del 50% de los organismos.

### Procedimiento general:

**2.2.1.1 Prueba preliminar:** se da una valor aproximado de 24h-LC<sub>50</sub> (ó 48h-LC<sub>50</sub>) y se determina los rangos de concentraciones que deben ser probadas en la prueba de toxicidad definitiva.

**2.2.1.2 Prueba definitiva:** consiste en determinar el valor del 24h-LC<sub>50</sub> ó 48h-LC<sub>50</sub> en el rango de concentraciones determinadas en la prueba preliminar, que corresponde a la más alta concentración a la cual se registra un 0% de mortalidad y la más baja concentración donde se registra el 100% de mortalidad. En la prueba definitiva se deben considerar al menos cinco concentraciones más un control, y por cada concentración 20 individuos divididos en cuatro réplicas.

**2.2.1.3 Procedimiento:** en una serie de envases, se colocan volúmenes crecientes de la solución de prueba o efluente y se agrega agua de dilución de tal forma de obtener las concentraciones deseadas para la prueba. Después, se ponen los dáfidos en los envases de tal forma que el número de ellos no exceda los 20 por concentración y su densidad no exceda los 5 ejemplares por 10 ml de solución por réplica. Durante el test se deben mantener los envases a una temperatura de 20 °C  $\pm$  2°C. Al finalizar el periodo de los test de 24 ó 48 horas se registran los individuos muertos en cada envase.

**2.2.1.4 Análisis de resultados:** Al final de la prueba de 24 ó 48 horas, se debe calcular el porcentaje de mortalidad para cada concentración en relación al total de *Daphnia* utilizadas. Determinar el 24h-LC<sub>50</sub> ó 48h-LC<sub>50</sub> con método estadístico Probit analysis.

**2.2.1.5 Resumen de las condiciones de prueba de toxicidad aguda con *Daphnia*:**

Tipo de test	Estático
Duración del test	24 o 48 h
Temperatura	20°C $\pm$ 2°C
Calidad de luz	Iluminación ambiente
Fotoperiodo	16 h luz 8 h oscuridad
Tamaño de las cámaras	25 ml
Volumen de solución	10 ml
Edad organismos	Neonatos < 24h
Nº réplicas por concentración	4
Nº organismos por concentración	20
Régimen de alimentación	Alimento hasta 1 h antes del bioensayo
Aireación	80% saturación oxígeno



Agua de dilución	Agua reconstituida
Respuesta medida	Inmovilidad
Criterio aceptabilidad	Máximo 10% mortalidad en control

**2.2.2.- Metodología para Bioensayo crónico con *Daphnia*:** Los ensayos de toxicidad crónica permiten la exposición de los organismos durante todo o parte de su ciclo de vida a los contaminantes ambientales y tienen como objetivo estimar la mayor concentración no efectiva o segura de los agentes tóxicos ensayados. Estos niveles son utilizados para establecer los límites de tolerancia para la presencia de tóxicos en agua, suelo, aire, ambiente laboral, alimentos, etc. Para evaluar los efectos subletales de agentes contaminantes en cuerpos de agua dulce, se utilizan varias especies de dafnidos, en los cuales se determinan el efecto que ejercen los tóxicos sobre la tasa de reproducción durante la primera parte (21 días) de su ciclo de vida.

Procedimiento del test:

**2.2.2.1** Colocar en una serie de envases o cámaras de prueba, volúmenes crecientes de la solución de prueba o efluente y se agrega agua de dilución hasta obtener las concentraciones o diluciones deseadas para la prueba. Se utilizan 10 cámaras, de 100 ml de volumen, por concentración, más un set de control y un control de solvente, cuando sea necesario. Introducir a lo menos 50 ml de solución a ensayar en cada cámara, la que debe tener a lo menos 30 mm de profundidad. Las cámaras deben taparse para evitar la evaporación de las soluciones y la entrada de partículas extrañas al interior de éstas.

**2.2.2.2** Colectar y seleccionar neonatos de *Daphnia sp.* de menos de 24 horas de nacidos, tal como se hace para los test agudos. Introducir en cada unidad experimental 1 neonato. Hacer recambios de medio cada 2 días. Para ello se prepara otro set igual de cámaras con medio fresco, a las cuales se les agrega la cantidad de alimento necesario por frasco (0,075 ml de suspensión alimenticia para 50 ml de solución de prueba). Luego se traspasan suavemente los neonatos a las cámaras nuevas con una pipeta Pasteur con perita de goma. A medida que los animales crecen y se reproducen (10 días aproximadamente), deben retirarse y contarse las crías recién nacidas. Deberá anotarse el momento en que se produzca la primera generación, así como las posteriores. Cualquier dato deberá anotarse; fundamentalmente aquellos referentes a mortalidad de los individuos parentales, si ésta existiera.

**2.2.2.3** Al final del período de observación (21 días) se deben analizar los resultados obtenidos para ver las diferencias significativas entre el número de neonatos producidos en las diferentes concentraciones. Si el número de juveniles producidos en la concentración más baja difiere significativamente del control se debe repetir el test reduciendo aún más las concentraciones de tóxico hasta que, al menos en la concentración menor, no haya diferencias significativas con respecto al control.

**2.2.2.4** Resumen de las condiciones del test crónico con *Daphnia*.

Tipo de test	Estático, con recambio cada 2 días
Duración del test	21 días
Temperatura	20 °C ± 1 °C
Calidad de la luz	Iluminación ambiental del laboratorio
Fotoperíodo	16 h luz / 8 h oscuridad
Volumen de las cámaras	100 ml
Volumen de la solución de prueba	50 ml
Edad de los organismos	Neonatos < 24 h
Nº de réplicas por concentración	10
Recambio de medio	Cada 48 horas
Nº de organismos por cámara	1



Régimen de alimentación	0,075 ml de suspensión alimenticia por cámara, en cada recambio de medio
Aireación	Ninguna
Tipo de agua control y dilución	Agua reconstituida
Respuesta	Tasa de reproducción por dafnia parental
Criterio de aceptabilidad	< 10% de mortalidad de las dafnias parentales mínimo 3 camadas en el control
Expresión de los resultados	LOEC y NOEC

### 2.2.3. Interpretación y validación de los resultados

2.2.3.1. Estimación de LOEC y NOEC: Al final del ensayo se contabilizan el número total de crías, nacidas durante 21 días, por individuo. Con estos datos y usando el paquete estadístico TOXSTAT se pueden determinar los siguientes parámetros de toxicidad: LOEC y NOEC. Estos parámetros se obtienen por medio de métodos estadísticos, como son el análisis de la varianza (ANOVA) combinado con test de Dunnet (para datos paramétricos), o algún otro test adecuado para contrastes o comparación de medias como el test de Tukey (o de mínima diferencia significativa), el de Williams o el Spearman – Karber (para datos no paramétricos). El valor LOEC entregado por el programa estadístico (señalizado con un asterisco), representa la concentración más baja en la cual se observan diferencias significativas en la tasa de reproducción comparado con el control, por lo tanto, la concentración anterior a ésta será el NOEC o mayor concentración en la cual no se observan efectos significativos en la tasa de reproducción comparado con el control.

2.2.3.2 Validación de los resultados: Los resultados se consideran válidos si se dan las siguientes condiciones:

- la concentración de oxígeno al final del bioensayo debe ser mayor o igual a 2 mg/l.
- la mortalidad en los individuos parentales no debe ser mayor al 10%
- los individuos parentales de los controles deben tener a lo menos 3 camadas
- no debe haber diferencia significativa entre la concentración más baja y el control

2.2.3.3. Expresión de los resultados: Los resultados se expresan como LOEC y NOEC. Las unidades de medida para estos parámetros son las concentraciones en el caso de sustancias químicas conocidas (ej: LOEC = 10 mg/l, NOEC = 5 mg/l) o como porcentaje de dilución en el caso de efluentes o muestras de agua complejas (ej: LOEC = 10 % de dilución, NOEC = 5 % de dilución).

### Método objetivo 3: Desarrollar una formulación del desinfectante ambiental en base a extractos naturales activos

**Formulación y evaluación de actividad desinfectante ambiental de extractos de algas en bioensayos in vivo en cámara:** Durante esta etapa, el/los extractos activos contra fitopatógenos serán caracterizados químicamente, se evaluará su efecto sobre los frutos y se escalará la producción necesario para formulación y aplicación del desinfectante.

#### Actividad 3.1.- Caracterización bioquímica de compuesto activo:

Para estudiar la existencia de compuestos de naturaleza proteica, lipídica o glucídica, se realizará un tratamiento previo de los extractos en su concentración mínima inhibitoria con proteinasa K (US Biological) (1 mg/ml), lipasa tipo I de germen de trigo (Sigma) (1 mg/ml) y  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Sigma) (1 mg/ml). La enzima y el sobrenadante serán mezclados en una relación 1:9 e incubados a temperatura ambiente por 2 h, la reacción se detendrá incubando 5 min a 100°C (Ström-Bestor and Wiklund, 2011) y luego se ensayará la actividad del sobrenadante tratado sobre el



crecimiento de *P. syringae/B. cinerea* en microplaca. Los sobrenadantes que pierdan su actividad inhibitoria con el tratamiento serán considerados con la actividad correspondiente. La estabilidad a la temperatura se determinará realizando un tratamiento del sobrenadante a 100°C por 30 min. Mediante HPLC se realizará una aproximación a la estructura química del extracto.

### Actividad 3.2.- Determinación química de sus compuestos bioactivos

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM): La composición de cada extracto será determinada en un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masa (Agilent 7890) equipado con un inyector automático Agilent y usando una columna capilar HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno, con una película de 0,25 µm de espesor). El programa de temperatura comienza con 100 °C por 5 min y luego con un incremento de 5 °C/min hasta llegar a 275 °C, temperatura mantenida por 25 min. La temperatura del bloque de inyección será de 250 °C. Se inyectará 1 µl de la muestra. Los porcentajes relativos de los componentes del extracto serán obtenidos desde el área bajo el peak. Para detectar la presencia de los compuestos en los extractos obtenidos en la etapa de extracción se empleará cromatofolios de silicagel 60 F254 para cromatografía en capa fina (TLC), los extractos serán eluidos en soluciones de distinta polaridad empleando como fase móvil mezclas de solventes acorde con la naturaleza del extracto (polar o apolar) y usando como revelador lámpara UV y/o reactivos reveladores para los distintos componentes de acuerdo a su naturaleza (terpenos, polifenólicos, alcaloides). Los perfiles de composición química para cada extracto seleccionado serán comparados con las listas disponibles de plaguicidas prohibidos y restringidos en uso agrícola a nivel nacional (SAG) e internacional.

Los criterios de selección de los extractos de algas a utilizar en la siguiente etapa son aquellos que tengan las mayores actividades antimicrobianas para los patógenos estudiados (%IM>50%, %IG > 50% y porcentaje de control mayor de 50%), que estén dentro del rango de inocuidad según la reglamentación vigente (LC50> 0.4mg/L) y que en su caracterización química de los compuestos bioactivos, no contengan ningún compuesto prohibido por la reglamentación vigente.

### Actividad 3.3.- Evaluación del efecto de los extractos activos en frutos y bioensayos *in vivo* en cámara.

3.3.1.- Inoculación y preincubación en cámaras de crecimiento: unidades experimentales consistirán de 50 frutas ubicadas en placas petri o pocillos plásticos previamente esterilizados, conteniendo papel Whatman No. 1 humedecido con agua desionizada estéril. Sobre cada grupo de aplicará la mezcla de solvente + compuesto activo, sumado a este procedimiento de aplicarán como control fungicidas aplicados habitualmente en postcosecha a nivel nacional. 48h después los frutos serán inoculados con 20 µL de la suspensión de  $1 \times 10^8$  cfu/ml de *P. syringae* y  $1 \times 10^5$  conidia/ml de *B. cinerea*, *Aspergillus sp.*, y *Penicillium sp.* (cepas de trabajo y aisladas desde frutas infectadas) (Delen et al., 1984). Como control se usarán frutos inoculados con agua estéril. Las frutas inoculadas serán preincubadas a 23–25 °C y luego se mantendrán por 10 días y serán inspeccionados diariamente.

3.3.2.-Viabilidad microbiana: Para esta evaluación se empleará la metodología descrita por (Ercolini et al., 2006) con modificaciones, la que usa el kit de viabilidad bacteriana BacLight LIVE / DEAD (Molecular Probes Inc., Eugene, OR, EE.UU.). Luego de obtener el sedimento resuspendido en 1 ml, este se traspasará a un Eppendorf, el cual se centrifugará a 8000 rpm por 10 minutos, y el sedimento será resuspendido en 50 µl. Las muestras serán incubadas con SYTO 9 y yoduro de propidio (1:1:1), e incubarán en oscuridad por 15 min para la enumeración de células vivas y muertas. Estas muestras serán observadas en Eclipse E400 microscopio Nikon de epifluorescencia equipado con una lámpara de UV y un objetivo de aumento de 100X. La enumeración de las células se realizará contando al azar 5 campos microscópicos.



**3.3.3.-Recuento total de bacterias/fungi:** Luego de resuspender en 1 ml el pellet obtenido por la fitopatógenos adheridos al fruto-hortaliza, se utilizarán dos replicas por muestra para realizar la técnica de la microgota, que consiste en realizar diluciones seriadas con PBS, que serán sembradas (10 µL) en TSA 50% por triplicado (diluciones directa, 1:10, 1:100, 1:1000), e incubadas a 37°C por 24 horas (Desai, 2012). Desde estas se realizará el conteo de colonias por gota sembrada/cm<sup>2</sup> y promediarán los triplicados, y analizados mediante programa GraphPad Prism 5. Los resultados serán expresados en % remoción respecto al control (log UFC/cm<sup>2</sup>) de biopelículas, es decir la fracción de biopelícula que es resuspendida desde la soporte.

**3.3.4.-Análisis estadístico:** La severidad de la infección será evaluada visualmente en una escala de 0-4 (0 = no infección, 1 = 5%, 2 = 25%, 3 = 50%, y 4 = área infectada entre 75%-100%). El índice del daño será calculado basado en la fórmula:  $\Sigma (\text{escala} \times \text{n}^\circ \text{ de piezas dañadas}) \times 100 / (\text{n}^\circ \text{ total piezas} \times \text{escala más alta})$ . Las observaciones pueden ser analizadas mediante ANOVA, seguido de test de Duncan ( $P \leq 0.01$ ) (Yildiz, 2000).

**Actividad 3.4. Formulación del desinfectante ambiental con extractos de algas activos.**

La formulación del desinfectante se basará en el solvente desde el cual fue extraído, y se seleccionarán aquellos extractos con menor ecotoxicidad, composición química no restringida y que presenten mayor %IG, %IM, etc. Se considerará usar combinaciones de los extractos en solventes (tensoactivos) que permitan solubilizarlos en agua que permitan la formación de pequeñas partículas (gotas) en el nebulizador X3.

**Actividad 3.5. Análisis de duración mínima del producto:**

Se evaluará la duración del desinfectante ambiental en condiciones de almacenamiento, tomando muestra del producto formulado cada una semana durante el primer mes y cada 2 semanas por los siguientes 2 meses al menos. A estas muestras se evaluará su actividad inhibitoria sobre patógenos: *B. cinerea*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., y *P. syringae*, como se indica en actividad 1.5, y se compararan con un control de desinfectante fresco, los análisis serán realizados en triplicado, al final del análisis se realizará el análisis de caracterización química, según la actividad 3.2, para determinación si hay variación en la composición química original. Considerando el tiempo al cual ocurre una significativa disminución de la actividad antifúngica, se determinará la durabilidad mínima esperada, para la posterior estimación de fecha de caducidad.

**Método objetivo 4:** Reducir significativamente la pudrición postcosecha en frutales, causada por la carga ambiental de agentes fitopatógenos, mediante el uso de la formulación seleccionada.

Durante esta etapa se implementarán cámaras húmedas y espacios físicos (containers/equipamiento Asociado ECOMBIO Ltda.) para evaluar aplicación, reaplicación y disminución de la carga ambiental de fitopatógenos y estimar la extensión de tiempo en los que no se observe deterioro de frutos-hortalizas durante el almacenamiento.

Con los resultados contenidos en la etapa de cámaras húmedas, se realizara una última etapa en la cual se confirmaran la efectividad del producto obtenido de la etapa anterior.

La metodología de ambas etapas se describe a continuación

**Actividad 4.1.- Preparación de nebulizador con la formulación de desinfectante ambiental.**

Evaluación de la base con compuesto activo contra fitopatógenos en cámaras con control de humedad:

**Actividad 4.2.- Ensayos de disminución de la carga ambiental (Desarrollado en ECOMBIO Ltda.):**



4.2.1.- Muestras ambientales: Para realizar el monitoreo ambiental de fitopatógenos se usará el aerobiocoleктор AirTest Omega, realizando muestreos de hongos y bacterias antes y después de la aplicación del producto desarrollado. Este equipo está diseñado y fabricado de acuerdo con los requerimientos de la norma BS EN ISO 14698. Puede trabajar con 5 volúmenes de muestreo regulables de 10, 50, 100, 250 y 500 l de aire. Este sistema tiene como principio de funcionamiento el impacto directo de los microorganismos, a través de una criba, sobre un medio de cultivo. El caudal y la velocidad del aire están controlados, pudiéndose utilizar volúmenes de muestra desde 10 a 1000 litros y permitiendo la recogida de microorganismos desde 0,3  $\mu\text{m}$ . El AirTest Omega es polivalente, y se puede utilizar en todo tipo de ambientes, desde niveles de contaminación microbiológica muy elevados, hasta en salas limpias. Puede ser utilizado con placas Rodac de 65 mm de diámetro y con placas Petri de 90 mm de diámetro, así como con diferentes medios de cultivo para el análisis de distintos microorganismos. Generalmente, en el análisis de ambientes se determinan Gérmenes totales y Mohos, aunque variando el medio de cultivo puede utilizarse para otros microorganismos.

4.2.2.- Incubación de las placas: Las placas utilizadas en el análisis, convenientemente identificadas, deben colocarse en la estufa de cultivo. En la siguiente tabla se detallan las condiciones incubación para recuentos de gérmenes totales y, mohos y levaduras.

Parámetros	Gérmenes totales	Mohos y levaduras
<b>Temperatura</b>	37 °C	30 °C
<b>Tiempo</b>	48 horas	72 horas, repetir lectura a los 5 días.

4.2.3.- Lectura e interpretación de resultados: A partir de los recuentos realizados (expresados como ufc), se calcula el resultado para expresarlo como NMP (número más probable) por  $\text{m}^3$ . El valor NMP se calcula a partir del dato de las ufc obtenidas en la placa, mediante la aplicación de la ley de Feller. Las colonias que se han desarrollado en una placa de cultivo tienen su origen en un germen o grupo de gérmenes que pasan a través de la criba, y es imposible distinguir si la formación de una colonia se ha debido a un solo germen o a varios gérmenes que han pasado a través del mismo orificio. Por tanto, no puede establecerse una relación directa entre las UFC desarrolladas en una placa de cultivo y el número de microorganismos por  $\text{m}^3$ . La ley de Feller efectúa una corrección estadística que permite cuantificar para cada orificio de la criba el número de gérmenes que lo han atravesado. De este modo a partir de las ufc desarrolladas en la placa de cultivo se obtiene el Número Más Probable (NMP) de gérmenes que han impactado sobre el medio de cultivo, y conociendo el volumen de aire filtrado se obtiene el NMP de gérmenes por metro cúbico.

4.2.3.- Desinfección de superficie y ambiental: Para la aplicación del producto desarrollado, se utilizará el equipo nebulizador X3 para la desinfección ambiental y el equipo móvil MO NEXT 0122 para desinfección de superficies

4.2.4.- Caracterización de la comunidad microbiana asociada: Las comunidades microbianas asociadas a sitios de aplicación del nebulizador serán evaluadas por medio de DGGE (Electroforesis en Gel con Gradiente Denaturante), la amplificación se llevará a cabo como se indicó antes (1.4.2.)

#### 4.3.- Nebulización y evaluación del desarrollo de la enfermedad en frutos

4.3.1.- Inoculación y preincubación: Se desarrollará similar al diseño presentado en actividad 3.3.

4.3.2.- Análisis sensorial de frutas nebulizadas con base producto natural: Algunos de estos análisis han sido descritos en Smith (2010). Entre ellos, se evaluará dulzor, acidez, amargor, astringencia, sabor arándano como, firmeza, frescura, color y jugosidad. Otros análisis están descritos en Mehra et al incluye antioxidantes (arándanos)



**Método objetivo 5:** Obtener un producto competitivo, de aplicación comercial y lograr la transferencia al sector de los resultados, un modelo de negocios y una estrategia de comercialización.

Durante esta etapa se organizará un Taller de difusión orientada a empresarios del área de agroalimentaria y asociados como área de formulación de fungicidas, los resultados de este estudio se someterán a protección de propiedad intelectual y evaluará su aplicación comercial y estrategias de comercialización.

**Actividad 5.1.- Difusión resultados y Organización Taller.**

Se realizará la difusión de resultados a través de participación en congresos nacionales y el segundo año del proyecto en un congreso internacional, para el intercambio de información con expertos en el área.

Además se realizará un Taller sobre "Transferencia de ecotecnologías naturales aplicadas al control de fitopatógenos poscosecha". Orientada a Empresarios del área de agroalimentaria y asociados como área de formulación de fungicidas. Será oficiada por Asociado 1 ECOMBIO Ltda. Durante este taller se espera la participación de al menos 10 representantes de empresas, y de la participación de investigadores y estudiantes de postgrado de diferentes instituciones. Se desarrollarán áreas teóricas y prácticas demostrativas (salidas a terreno) de la aplicación del nebulizador y determinación de eficiencias.

**Actividad 5.2.- Protección de propiedad intelectual**

Se realizará el ingreso de solicitud de patente del producto "Desinfectante ambiental a base de extractos naturales para el control de fitopatógenos poscosecha en frutos y cámaras de almacenamiento" en el Instituto Nacional de Propiedad Industrial de Chile – INAPI, realizado a través de la Unidad de Propiedad Intelectual (UPI) de la Universidad de Concepción.

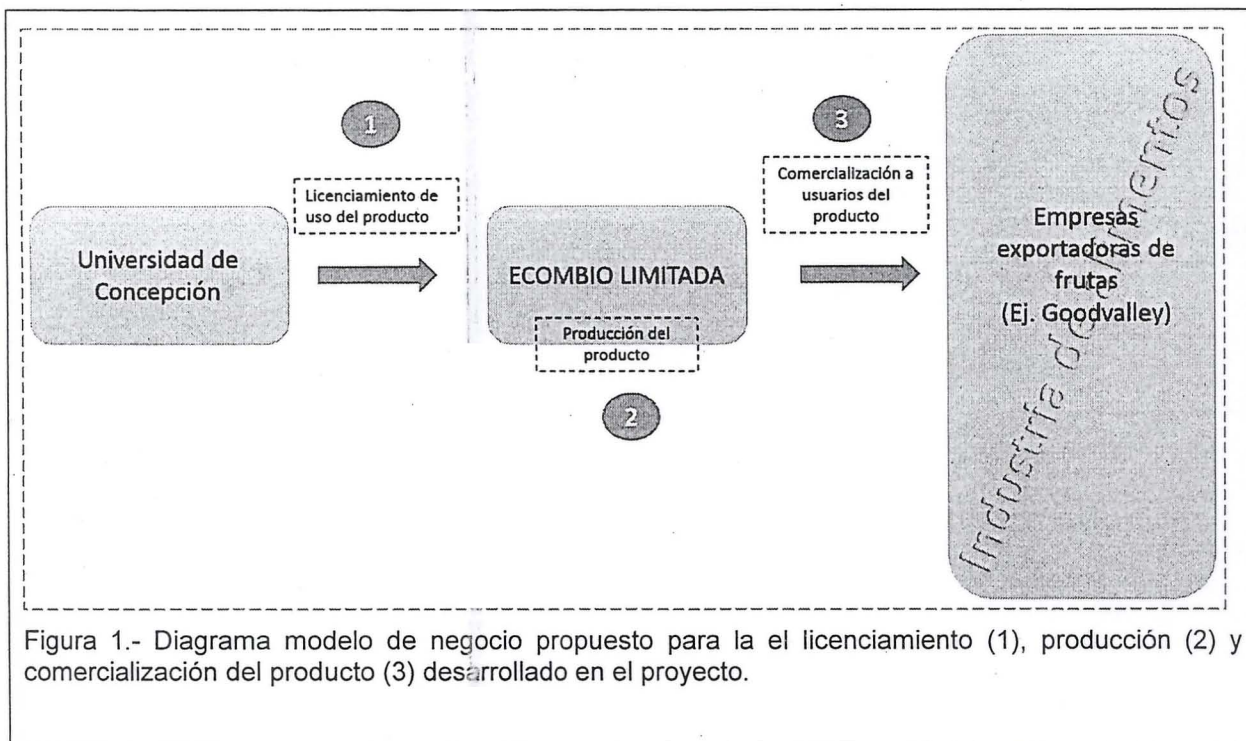
**Actividad 5.3.- Evaluación costo/beneficio de la aplicación comercial, modelo de negocio y estrategia de comercialización.** Durante la ejecución del proyecto, se realizará una evaluación comercial de costo/beneficio del producto desarrollado.

Para poder realizar esta evaluación, se debe considerar los siguientes aspectos:

- a) costos de los compuestos a extraer (materia prima),
- b) costos de formulación del producto (valores de tensoactivos y solventes)
- c) efectividad del producto y
- d) costos de operación.

Por otra parte, se contrarrestará estos valores con la oportunidad de mercado y se obtendrá el valor comercial al que puede ser comercializado el nuevo producto desarrollado.

El modelo de negocio y la estrategia comercial constará principalmente de un licenciamiento de esta tecnología a la empresa asociada al proyecto ECOMBIO LIMITADA. La cual será la encargada de producir y comercializar el producto a los usuarios finales que son las empresas exportadoras de frutas (Figura 1)





1.5. Actividades: Indicar las actividades a llevar a cabo en el proyecto, asociándolas a los objetivos específicos y resultados esperados.

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Actividades
1	1	Colección de extractos de algas con actividad bacteriostática/bactericida y/o fungistática/fungicida sobre fitopatógenos de postcosecha de la industria agroalimentaria.	<p>1.1.- Recolección de macroorganismos marinos</p> <p>1.2.- Colección de frutos (arándanos y cerezos) infectados con fitopatógenos desde postcosecha: detección y aislamiento de hongos y bacterias</p> <p>1.3.- Identificación bioquímica y molecular de cepas/serovar de fitopatógenos</p> <p>1.4.- Obtención de extractos y fracciones desde macroalgas con actividad inhibitoria</p> <p>1.5.- Ensayos de inhibición de extractos de algas contra fitopatógenos</p> <p>1.6.- Evaluación de actividad de los extractos sobre la formación de biopelículas fitopatógenos</p>
2	2	Extractos con actividad antimicrobiana ecotoxicológicamente permitidos y caracterizados	<p>2.1.- Determinación de rangos de inocuidad para la selección de extractos con actividad antimicrobiana usando líneas celulares</p> <p>2.2.- Estudios de ecotoxicidad aguda y crónica en organismos acuáticos</p>
3	3	Formulación de desinfectante con base extractos naturales y solubles en solvente con actividad sobre fitopatógenos	<p>3.1.- Caracterización bioquímica de compuesto activo:</p> <p>3.2.- Determinación química de sus compuestos bioactivos</p> <p>3.3.- Evaluación del efecto de los extractos activos en frutos.</p> <p>3.4.- Escalamiento en la producción de extractos de macroalgas.</p> <p>3.5.- Análisis de duración mínima del producto.</p>
4	4	Desinfectante ambiental a base de productos naturales con capacidad de disminuir la carga ambiental de fitopatógenos del sector agrícola postcosecha que reduzca la pudrición en frutos.	<p>4.1.- Formulación de desinfectante ambiental en nebulizador</p> <p>4.2.- Ensayos de disminución de la carga ambiental</p> <p>4.3.- Nebulización y evaluación del desarrollo de la enfermedad</p>
5	5	Taller sobre Transferencia de ecotecnologías naturales aplicadas al control de fitopatógenos postcosecha.	<p>5.1. Organización Taller para al menos 10 representantes de empresas, y de la participación de investigadores y estudiantes de postgrado de diferentes instituciones, participación en congresos nacionales (año 1 y 2) e internacionales (año 2), para el intercambio de información con expertos en el área</p>

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Actividades
5	6	Solicitud de propiedad intelectual "Desinfectante ambiental a base de extractos naturales para el control de fitopatógenos postcosecha"	<b>5.2.</b> Protección de propiedad intelectual
5	7	Modelo de negocios y comercialización de desinfectante ambiental	<b>5.3.-</b> Evaluación costo/beneficio de la aplicación comercial, modelo de negocio y estrategia de comercialización.



1.6. Carta Gantt: Indicar la secuencia cronológica para el desarrollo de las actividades señaladas anteriormente de acuerdo a la siguiente tabla:

Nº OE	Nº RE	Actividades	Año 2015								Año 2016								Año 2017							
			Trimestres				Trimestres				Trimestres				Trimestres				Trimestres				Trimestres			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1-5	0.1.- Contratación de personal:					x	x	x																	
1	1-5	0.2.- Adquisición de equipos					x	x	x																	
1	1	1.1.- Recolección de macroorganismos marinos (Se requiere para mantener stock de extracto para desinfectante)						x	x	x	x		x			x			x							
1	1	1.2.- Colección de frutos de arándanos ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.) y cerezos ( <i>Prunus avium</i> L.) con síntomas de patógenos desde postcosecha: detección y aislamiento de hongos y bacterias.						x	x	x	x	x														
1	1	1.3.- Identificación bioquímica y molecular de cepas/serovar de fitopatógenos							x	x	x	x	x													
1	1	1.4.- Obtención de extractos y fracciones desde macroalgas con actividad inhibitoria (Se requiere para mantener stock de extracto para desinfectante)						x	x	x	x		x			x			x				x			
1	1	1.5.- Ensayos de inhibición de extractos de algas contra patógenos: <i>B. cinerea</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., y <i>P. syringae</i> (se requiere hasta fines del proyecto para evaluar actividad extracto en la							x	x	x	x	x				x			x			X			

Nº OE	Nº RE	Actividades	Año 2015								Año 2016								Año 2017																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
			Trimestres								Trimestres								Trimestres																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
		formulación)																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														



Nº OE	Nº RE	Actividades	Año 2015								Año 2016								Año 2017																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			Trimestres								Trimestres								Trimestres																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
			1		2		3		4		1		2		3		4		1		2		3																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
5	5	5.1. Organización Taller																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				

1.7. Actividades de difusión programadas:

Fecha	Lugar	Tipo de Actividad	Nº participantes	Perfil de los participantes	Medio de Invitación
Octubre-Diciembre 2016	Santiago-Chile	Congreso Nacional	300	Investigadores y profesionales área Agrícola	Contacto directo, correo electrónico
Julio-Agosto 2017	Estados Unidos	Congreso o Taller Internacional sobre fitopatología y control en agricultura	500	Profesionales área científico y técnica, que permitirán contactar asesores y discutir resultados y experiencia.	Contacto directo, correo electrónico
Abril-Junio 2017	Concepción, Chile	Taller de Transferencia de ecotecnologías naturales aplicadas al control de fitopatógenos postcosecha	25	Empresarios del área de agroalimentaria, investigadores y asociados	Contacto directo, y visitas personalizadas, correos electrónicos, página de la universidad de Concepción



## 2. Costos totales consolidados

### 2.1. Estructura de financiamiento.

		Monto (\$)	%
FIA	Ejecutor		
	Asociado(s)		
	Total FIA		
	Pecuniario		
	No Pecuniario		
	Total Contraparte		
Total			

### 2.2. Costos totales consolidados.

### 3. Anexos

#### Anexo 1. Ficha identificación del postulante ejecutor

Nombre completo o razón social	Universidad de Concepción	
Giro / Actividad	Educación Superior	
RUT		
Tipo de organización	Empresas	
	Personas naturales	
	Universidades	X
	Otras (especificar)	
Banco y número de cuenta corriente del postulante ejecutor para depósito de aportes FIA		
Ventas en el mercado nacional, último año tributario (UF)		
Exportaciones, último año tributario (US\$)		
Número total de trabajadores		
Usuario INDAP (sí / no)		
Dirección postal (calle, comuna, ciudad, provincia, región)		
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Dirección Web	www.udec.cl	
Nombre completo representante legal	Sergio Alfonso Lavanchy Merino	
RUT del representante legal		
Profesión del representante legal	Ingeniero Civil Mecánico	
Cargo o actividad que desarrolla el representante legal en la organización postulante	Rector	
Firma representante legal		



**Anexo 2.** Ficha identificación de los asociados. Esta ficha debe ser llenada para cada uno de los asociados al proyecto.

Nombre completo o razón social	Vidal y Urrutia Ltda.	
Giro / Actividad	Ingeniería, análisis y venta de productos químicos	
RUT		
Tipo de organización	Empresas	<input checked="" type="checkbox"/>
	Personas naturales	<input type="checkbox"/>
	Universidades	<input type="checkbox"/>
	Otras (especificar)	<input type="checkbox"/>
Ventas en el mercado nacional, último año tributario (UF)		
Exportaciones, último año tributario (US\$)		
Número total de trabajadores		
Usuario INDAP (sí / no)		
Dirección (calle, comuna, ciudad, provincia, región)		
Teléfono fijo		
Fax		
Teléfono celular		
Email		
Dirección Web	<a href="http://www.ecombio.cl">www.ecombio.cl</a>	
Nombre completo representante legal	José Miguel Vidal Araya	
RUT del representante legal		
Cargo o actividad que desarrolla el representante legal en la organización postulante	Gerente General	
Firma representante legal		

**Anexo 3.** Ficha identificación coordinador y equipo técnico. Esta ficha debe ser llenada por el coordinador y por cada uno de los profesionales del equipo técnico.

Nombre completo	Katherine Elizabeth Sossa Fernández
RUT	
Profesión	Biólogo, Magister en Ciencias c/m Microbiología, Doctor en Ciencias Biológicas c/m Biología Celular y Molecular
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Profesor Asociado
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	



Nombre completo	Homero Enrique Urrutia Briones
RUT	
Profesión	Biólogo, Magister en Ciencias c/m Microbiología, Doctor en Ciencias Ambientales
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Depto. Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Profesor Titular
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Nombre completo	Eugenio Alfredo Sanfuentes Von Stowasser
RUT	
Profesión	Ingeniero Forestal, Doctor Fitopatología
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Concepción
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Profesor asociado
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	



Nombre completo	Claudia Isabel Pérez Manríquez
RUT	
Profesión	Químico, Doctor en Química
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Profesor
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Nombre completo	Allisson Patsy Astuya Villalón
RUT	
Profesión	Bioquímico, Doctor en Ciencias Biológicas c/m Biología Celular y Molecular
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Fac. Ciencias Naturales y Oceanográficas. Universidad de Concepción
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Profesor
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	



Nombre completo	Nathaly Marian Ruiz-Tagle Moena
RUT	
Profesión	Biólogo Marino, Doctor en Ciencias Biológicas área Biología Celular y Molecular
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Universidad de Concepción
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Investigador
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	

Nombre completo	José Violido Becerra Añende
RUT	
Profesión	Químico Farmacéutico, Magister en Ciencias Biológicas c/m Botánica, Doctor en Ciencias Ambientales
Nombre de la empresa/organización donde trabaja	Departamento de. Botánica, Facultad de. Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.
RUT de la empresa/organización donde trabaja	
Cargo que ocupa en la empresa/organización donde trabaja	Profesor asociado
Dirección postal de la empresa/organización donde trabaja (calle, comuna, ciudad, provincia, región)	
Teléfono fijo	
Fax	
Teléfono celular	
Email	
Firma	



## II. Detalle administrativo (Completado por FIA)

- Los Costos Totales de la Iniciativa serán (\$):

<b>Costo total de la Iniciativa</b>		
<b>Aporte FIA</b>		
<b>Aporte Contraparte</b>	<b>Pecuniario</b>	
	<b>No Pecuniario</b>	
	<b>Total Contraparte</b>	

- Período de ejecución.

<b>Período ejecución</b>	
<b>Fecha inicio:</b>	01.06.2015
<b>Fecha término:</b>	30.09.2017
<b>Duración (meses)</b>	28

- Calendario de Desembolsos

Nº	Fecha	Requisito	Observación	Monto (\$)
1		Firma Contrato		
2	05.01.2016	Aprobación informes de avance técnico y financiero N°1		
3	08.06.2016	Aprobación informes de avance técnico y financiero N°2		
4	04.10.2016	Aprobación informes de avance técnico y financiero N°3		
5	04.04.2017	Aprobación informes de avance técnico y financiero N°4		
6	16.01.2018	Aprobación informes de avance técnico y financiero N°5 y finales	hasta	
	Total			

(\*) El informe financiero final debe justificar el gasto de este aporte

- Calendario de entrega de informes

Informes Técnicos	
Informe Técnico de Avance 1:	05.11.2015
Informe Técnico de Avance 2:	06.04.2016
Informe Técnico de Avance 3:	04.08.2016
Informe Técnico de Avance 4:	07.02.2017
Informe Técnico de Avance 5:	06.06.2017

Informes Financieros	
Informe Financiero de Avance 1:	05.11.2015
Informe Financiero de Avance 2:	06.04.2016
Informe Financiero de Avance 3:	04.08.2016
Informe Financiero de Avance 4:	07.02.2017
Informe Financiero de Avance 5:	06.06.2017

<b>Informe Técnico Final:</b>	15.11.2017
<b>Informe Financiero Final:</b>	15.11.2017

- Además, se deberá declarar en el Sistema de Declaración de Gastos en Línea los gastos correspondientes a cada mes, a más tardar al tercer día hábil del mes siguiente.