

OFICINA DE PARTES 1 FIA	
RECEPCIONADO	
Fecha	26 ENE 2018
Hora	10:25
Nº Ingreso	46552

INFORME TECNICO Y DE GESTIÓN FINAL

EJECUTOR:

Nombre	Universidad de Concepción
Giro	Educación Superior
Rut	
Representante	Sergio Alfonso Lavanchy Merino

NOMBRE DEL PROYECTO: Desarrollo de un desinfectante ambiental basado en compuestos de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha de la industria agroalimentaria

CODIGO: PYT-2015-0127

Nº INFORME: INFORME FINAL Nº 6

PERIODO: desde 01.06.2015 hasta 31.12.2017

NOMBRE Y FIRMA COORDINADOR PROYECTO

Nombre	Katherine Elizabeth Sossa Fernández
Rut	
Firma	

I. RESUMEN EJECUTIVO

Chile se ha consolidado como el principal abastecedor de fruta fresca del Hemisferio Sur, abasteciendo a Estados Unidos, Asia y Europa, esto implica que los productos exportados deben ser almacenados y transportados por largos periodos de tiempo, lo que conlleva un importante riesgo de infección por hongos y bacterias fitopatógenos en postcosecha, generando importantes pérdidas económicas. Una de las medidas de control es mantener los ambientes desinfectados, para lo cual se dispone de variados desinfectantes ambientales químicos, pero la mayoría son tóxicos, corrosivos, irritantes y peligrosos para el medio ambiente, de esta forma la búsqueda de compuestos de origen natural, inocuos y amigables con el ambiente resulta interesante. Por esto es que el objetivo de esta propuesta es 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.

En una primera etapa, se obtuvo una colección de 21 extractos algales con actividad antifúngica y antibacteriana sobre fitopatógenos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y *Pseudomonas syringae* aislados e identificados. Posteriormente en una segunda etapa, se determinó las concentraciones efectivas EC50 y EC90 e inocuas de los extractos con actividad mediante ensayos de toxicidad sobre cultivos celulares y microcrustaceos, seleccionándose los extractos de *Mazzaella sp* y *Ulva sp*, a concentraciones efectivas e inocuas de 2,6 mg/ml y 0,6 mg/ml, respectivamente. En la tercera etapa, a los extractos activos seleccionados se evaluó la inhibición de enfermedad por fitopatógenos *B. cinerea*, *Aspergillus sp.* y *Penicilliumsp* en cereza, arándano y uva a 4°C y 25°C, encontrándose que a 4 °C el extracto de *Mazzaella sp* y la mezcla de extracto *Mazzaella sp* y *Ulva sp.* redujeron significativamente la pudrición de los frutos. Con esto la formulación del desinfectante natural desarrollado consta finalmente de 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella laminaroides*, 0,6 mg/ml de extracto de *Ulva sp*, 0,04 % v/v solución Metanol/ Acetona (1/1) y agua. En una cuarta etapa se aplicó el desinfectante natural formulado por nebulización en cámaras y salas de packing en operación en presencia de fruta, evaluando la reducción de la carga microbiana y las características organolépticas de arándano, cereza y uva. Se encontró que el desinfectante natural reduce la carga microbiana en un 84%, aún cuando las cargas microbianas originales es alta y no altera las características organolépticas del fruto, por lo tanto la calidad del fruto se mantiene. En la quinta etapa se realizó la difusión en congresos nacionales e internacionales y en un Taller de Difusión Final realizado en Chillán con la participación de empresarios, investigadores y estudiantes del área agroindustrial. Además con la formulación del desinfectante ambiental validado se ingresó la solicitud de patente n° 03472-2017. En la evaluación económica del producto se obtiene un VAN igual a \$85.059.522 y TIR igual a 43,88%, que al ser contrastados con una tasa de rendimiento del 12%, se puede concluir que el proyecto debiera aceptarse, además es una alternativa interesante para la pequeña y mediana empresa y los cultivos orgánicos, porque es natural, inocuo y se puede aplicar en presencia de fruta. Además se está gestionando un Acuerdo de Transferencia de Material y un Acuerdo de Opción de Licencia una opción de licencia a la Empresa asociada ECOMBIO SA.

En conclusión el Desinfectante ambiental natural formulado en base a Extractos algales reduce la carga microbiana de ambientes, la pudrición postcosecha de frutos de arándanos, cerezas y uvas, y

es inocuo, por lo que se puede aplicar en presencia de fruta, siendo una alternativa atractiva de los desinfectantes químicos, con una potencial aplicación en la agricultura orgánica.

TEXTO PRINCIPAL

1. Breve resumen de la propuesta, con énfasis en objetivos, justificación del proyecto, metodología y resultados e impactos esperados.

La exportación agropecuaria es la segunda en importancia en Chile y siendo la más relevante el subsector agrícola, de esta forma Chile se ha consolidado como el principal abastecedor de fruta fresca del Hemisferio Sur, abasteciendo a Estados Unidos, Asia y Europa, esto implica que los productos exportados deben ser almacenados y transportados por largos periodos de tiempo, lo que conlleva un importante riesgo de infección por hongos y bacterias fitopatógenos en postcosecha, generando importantes pérdidas económicas debido a disminución de la calidad y pudrición de los vegetales, afectando la apariencia del producto, salud de los consumidores y la imagen de la empresa.

Por lo que se dispone de desinfectantes ambientales químicos para eliminar microorganismos patógenos que se encuentran en el ambiente (adheridos a las superficies y en partículas en el aire formando biopelículas), pero pueden ser tóxicos, corrosivos, irritantes, cancerígenos y peligrosos para el medio ambiente y que además seleccionan microorganismos resistentes, por lo que su uso es restringido. De esta forma la búsqueda de compuestos de origen natural, inocuos y amigables con el ambiente resulta interesante.

Es ampliamente documentado que organismos terrestres poseen propiedades antimicrobianas, sin embargo también, se han observado importantes propiedades antimicrobianas en organismos marinos, como las algas, los cuales a pesar de vivir en ambientes fuertemente impactados por organismos formadores de fouling carecen de ellos, y poseen cualidades nutritivas que les permite su uso como suplemento alimentario, por este motivo, el objetivo de este proyecto es obtener un modelo de desinfectante ambiental basado en compuestos de origen natural marinos (macroalgas) para el control de fitopatógenos (hongos y bacterias) de postcosecha para aplicar en la industria agroalimentaria, por lo tanto de rápida biodegradación, amigables con el ambiente, que provenga de un recurso renovable, que no sea tóxico para el humano y por lo tanto no implique un riesgo si está en contacto con el producto.

En una primera etapa, se obtendrá una colección de extractos algales con actividad antifúngica y antibacteriana sobre fitopatógenos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y *Pseudomonas syringae*. Posteriormente en una segunda etapa, se determinará los rangos de las dosis efectivas e inocuas de los extractos con actividad mediante ensayos de toxicidad sobre cultivos celulares y microcrustáceos (según Reglamentación vigente). En la tercera etapa, los extractos activos seleccionados serán usados para la formulación del desinfectante y se testeará y evaluará la factibilidad del desinfectante ambiental en frutos (arándanos y cerezos) infectados con modelos patógenos ambientales a escala de laboratorio. En una cuarta etapa se evaluará el nebulizador (dispersor) en cámaras controladas, controlando la carga ambiental de fitopatógenos en el ambiente y sobre los frutos, ensayo que será realizado por la empresa asociada ECOMBIO Ltda. Finalmente se espera obtener un desinfectante ambiental basado en compuestos de origen natural para el control de fitopatógenos de postcosecha, el cual cumplirá con los requisitos asociados a la reglamentación chilena para su uso en la industria agroalimentaria.

Además se realizará una solicitud de patente del desinfectante ambiental para su posterior licenciamiento y un taller de difusión para investigadores y empresas del rubro agrícola y agroquímico.

2. Cumplimiento de los objetivos del proyecto:

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

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

Nº OE	Descripción del Objetivo Específico	% de avance
1	Obtener extractos algales con efecto inhibitor o supresor de fitopatógenos como <i>Pseudomonassyringae</i> , <i>Botrytiscinerea</i> , <i>Aspergillus sp.</i> , y <i>Penicilliumsp.</i>	90,2%
2	Generar extractos algales activos cuyas dosis sean efectivas contra los patógenos e inocuas para el ser humano y el medio ambiente.	100%
3	Desarrollar una formulación del desinfectante ambiental en base a extractos naturales activos.	97,7%
4	Reducir significativamente la pudrición postcosecha en frutales, causada por la carga ambiental de agentes fitopatógenos, mediante el uso de la formulación seleccionada.	100%
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.	93.3%

Se ha cumplido con los 5 objetivos planteados originalmente, a continuación se incluye la tabla de Cuantificación del avance de los Resultados esperados a la fecha

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador (valor a la fecha)	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
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)= $100 - \frac{(r_e^2 - r_c^2)}{(r_c^2 - r_i^2)} \times 100$, r_c =radio del área de patógeno en el control, r_i = radio inicial y r_e =radio del área de patógeno en presencia del extracto	%IM= 82,5% (<i>B. cinerea</i>) %IM= 57,4 % (<i>Penicillium</i> sp); %IM= 81,3% (<i>Aspergillus</i> sp)	%IM>61% (<i>B. cinerea</i>); %IM>87% (<i>Penicillium</i> sp); %IM~91% (<i>Aspergillus</i> sp)	31/03/2016 31/03/2016 31/03/2016	100% (<i>Botrytis cinerea</i>); 66% (<i>Penicillium</i> sp); 89,4% (<i>Aspergillus</i> sp)
			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= 100% (<i>B. cinerea</i>); %IG= 100% (<i>Penicillium</i> sp); %IG=84,96,08% (<i>Aspergillus</i> sp)	%IG>77 (<i>B. cinerea</i>); %IG>97% (<i>Penicillium</i> sp); %IG~99% (<i>Aspergillus</i> sp)	31/07/2016 31/03/2016 31/03/2016	%IG= 100 % (<i>B. cinerea</i>); %IG=100 % (<i>Penicillium</i> sp); %IG=85,82% (<i>Aspergillus</i> sp)
			Área de Inhibición de fitopatógenos bajo la acción de extractos de algas	Área de Inhibición= πr_e^2 con r_e =radio de la zona de inhibición en presencia del extracto	8,6 cm ² (<i>B. cinerea</i>) 6,8 cm ² (<i>Penicillium</i> sp.) 13,8 cm ² (<i>Aspergillus</i> sp.) 1,78 cm ² (<i>P. syringae</i>)	>0,7 cm ² (<i>B. cinerea</i> y <i>Penicillium</i> sp.) >0,78cm ² (<i>Aspergillus</i> sp.) >2.9 cm ² (<i>Pseudomonas</i> sp.)	31/03/2016 31/03/2016 31/03/2016 31/03/2016	100% (<i>B. cinerea</i>) 100% (<i>Penicillium</i> sp.) 100% (<i>Aspergillus</i> sp.) 61% (<i>P. syringae</i> .)

Extractos totales a concentraciones entre 2,5 a 5,0 mg de las algas *Ulva* sp, *Pyropia* sp, *Lessonia* sp. *Mazzaella laminarioides* y *Grateloupia* sp mostraron efecto inhibitorio en la germinación de conidias, crecimiento micelial de hongos (*Botrytis cinerea*, *Aspergillus* ssp, *Penicillium* sp) y formación de biopelículas de *Pseudomonas syringae* (tabla 4):

No se alcanzó la meta del indicador en la inhibición de crecimiento micelial y germinación de esporas del *Aspergillus* sp, ya que este hongo se caracteriza por su resistencia a stress, siendo un hongo ambiental muy resistente, aún así los valores de inhibición son superiores al 85%, lo que es superior al 80% de inhibición que se acepta para control de Hongos patógenos.

Para la inhibición de *Pseudomonas syringae* se obtiene el 61% de inhibición según el método de difusión en disco planteado originalmente, pero para bacterias un mejor indicador de inhibición es la medición de inhibición del crecimiento células suspendidas y adheridas (biopelículas) a través, por ejemplo, de densidad óptica (Tabla 7) observándose que extractos de *ulva* sp., *Lessonia* sp y *Pyropia* sp. reducen sobre un 90% el crecimiento de biopelículas y células suspendidas de *Pseudomonas syringae*.

Posteriormente para determinar las concentraciones efectivas de los extractos de algas que inhiben a hongos se determinó las concentraciones efectivas 50 (CE50) y 90 (CE90) que inhiben el crecimiento micelial (Tabla 6) y germinación de conidias (Tabla 5) de *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* ssp, *Penicillium* sp

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador (valor a la fecha)	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
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.	<i>Durvillaea antarctica</i> IC50%: 75mg/L	IC50>0,07 mg/L	31/07/2016	100%
					<i>Macrocystis pyrifer</i> IC50%: 160 mg/L		31/07/2016	100%
					<i>Ahnfeltiopsis</i> sp. IC50%: 84 mg/L		31/07/2016	100%
					<i>Pyropia</i> sp., <i>Chondracanthus chamissoi</i> y <i>Grateloupia</i> sp. No presentan citotoxicidad en las concentraciones evaluadas, con IC50% > 360 mg/L			
					<i>Ulva</i> sp IC50%: 128 mg/L			
			<i>Mazzaella laminarioides</i> IC50% 89 mg/L	31/12/2016	100%			
			Toxicidad aguda en organismos acuáticos determinada como Concentración letal media (LC50) (según Res. 1557/2014))	$\text{LogLC50} = Xk - d(\sum p - 0,5)$ Con Xk: log de la concentración con 100% mortalidad; d: intervalo logarítmico; $\sum p$: suma de mortalidades en todos los ensayos	<i>Pyropia</i> sp. LD50: 0,97 mg/L	LC50> 0,1 mg/L	15/01/2017	100%
					<i>Lessonia</i> sp. LD50: 0,24 mg/L		15/01/2017	100%
					<i>Mazzaella</i> sp LD50: 14,4 mg/mL		31/05/2017	100%
					<i>Ulva</i> sp LD50: 3,14 mg/mL		31/05/2017	100%
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.	Desinfectante mezcla 2,6 mg/ml <i>Mazzaella</i> sp + 0,6 mg/ml <i>Ulva</i> sp LOEC 0,312-0,625 mg/L NOEC 0,312 mg/L	NOEC > 0,056 mg/l LOEC > 0, 1 mg/L	Noviembre de 2017	100%			

Los valores de IC50 para los extractos son mayores que el IC50% respecto al competidor (control) Cloruro de Benzalconio por tanto menos tóxicos, por lo cual se logra la meta (indicador) propuesta. Lo que es esperado dado que el extracto es compuesto natural, provenientes de algas que incluso con comestibles. Se determinó la Concentración inhibitoria máxima media para todos los extractos seleccionados en el objetivo 1, Posteriormente se determinó Concentración letal media (LC50) para los extractos con mayor actividad y posteriormente se determinó la Toxicidad crónica en organismos acuáticos a la mezcla utilizada en el desinfectante formulado.

N° OE	N° RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador (valor a la fecha)	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
3	3	Formulación de desinfectante con base extractos naturales y solubles en solvente con actividad sobre fitopatógenos	Desinfectante ambiental contra fitopatógenos formulado	F= (X g extracto activo/ Y volumen solvente)	<i>Mazzaella</i> sp 60 g extracto activo/100L (0.06 %)	50 g extracto activo / 100 L (<2%)	Diciembre 2017	100%
					<i>Ulva</i> sp 260 g extracto activo/100L (0,26 %)	50 g extracto activo / 100 L (<2%)	Diciembre 2017	100%
				Tamaño partícula dispersada(µm)	Tamaño partícula dispersada 1µm	Tamaño partícula dispersada <1µm;	Diciembre 2017	100%
				Consumo de desinfectante (ml/m³)	Consumo de desinfectante 10ml/m³	Consumo de desinfectante <10ml/m³	Diciembre 2017	100%
				Recuentos postaplicación inferior al inicial(UFC/m³)	Recuentos postaplicación 16 % inicial (UFC/m³)	Recuentos postaplicación < 2% inicial (UFC/m²)	Diciembre 2017	86%
	Degradabilidad / durabilidad del producto	Degradabilidad >6 meses	Degradabilidad >28 días	Diciembre 2017	100%			
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/m³) : contaminación fúngica usando desinfectante ambiental a base de productos naturales	D = recuento microbiano (UFC) /factor de superficie muestreada (m³)	D 55 UFC/m³	D < 200 UFC/m³	Diciembre 2017	100%

La formulación del desinfectante desarrollado consta finalmente de 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella laminaroides*, 0,6 mg/ml de extracto de *Ulva* sp, 0,04 % v/v solución Metanol/ Acetona (1/1) y agua, por lo que se requiere para tener 100L de desinfectante 60 g de extracto de *Mazzaella* sp correspondiendo al 0.06 %p/v y 260 g de extracto de *Ulva* sp, que corresponde a 0,26 %p/v del desinfectante, pese a que la cantidad de extracto es mayor a los 50g planteados originalmente, si se cumple con la meta, porque la concentración final es menor al 2% p/v que se requiere como aceptable para un desinfectante ambiental.

La nebulización se realizó con el nebulizador HURRICANE ULTRA de DYNA-FOG (Westerfield, Indiana. USA) que produce un tamaño de partícula de 1µm de diámetro, para producir un rocío adecuado.

El consumo de desinfectante es de 10mL/m³, ya que se requiere 1 litro para 100m³

Considerando los recuentos pre y postaplicación del desinfectante por nebulización se observa una disminución del 84% del recuento de microorganismos (Figura 12), quedando el 16% de microorganismos, este valor no cumple la meta de eliminar el 98% de los microorganismos, pero la disminución es significativa e importante considerando que se partió con cargas microbianas iniciales altas, además que está diseñando para ser un desinfectante ambientalmente amigable que puede ser aplicado en presencia de fruta.

La estabilidad del producto es superior 6 meses y se mantuvo durante todo el tiempo que se desarrollaron los ensayos (Figura 11), permitiendo un adecuado tiempo de mantención del desinfectante hasta su uso, en recipiente ambar.

El factor D, indicador de la contaminación fúngica alcanzado fue inferior a la meta de <200 UFC/m³ en las salas y bodegas con una carga microbiana normal alcanzando valores de 55 UFC/m³, pero en salas con una alta carga microbiana no se alcanzó este recuento, debido a que el factor D depende de la carga microbiana de partida (Figura 12)

Nº OE	Nº RE	Resultado Esperado (RE)	Indicador de Resultados (IR)					% de avance a la fecha
			Nombre del indicador	Fórmula de cálculo	Estado actual del indicador (valor a la fecha)	Meta del indicador (situación final)	Fecha real alcance meta (una vez logrado)	
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	19	>10	Diciembre 2017	100%
5	6	Solicitud de propiedad intelectual	Fecha de solicitud de protección de propiedad intelectual en el INAPI	Mes y año de ingreso de 1 solicitud de protección/proyecto al INAPI	29 diciembre de 2017 Solicitud n° 03472-2017	solicitud de patente ingresada en Mayo de 2017 a INAPI	Diciembre de 2017	100%
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)	1,051	>1	Diciembre 2017	100%
			Plan de negocios elaborado, que incluye estrategia de comercialización y plan de negocios	Documento con Plan de Negocio y estrategia de comercialización	1	1	Diciembre 2017	100%
			Prospección de potenciales licenciatarios	Reporte con el resultado de la prospección de potenciales licenciatarios	1	1	Diciembre 2017	100%
			Convenio de licenciamiento	N° de convenios de licenciamiento obtenidos	1 Acuerdo de Transferencia de Material y 1 Acuerdo de Opción de Licencia. En trámite	1	Mayo de 2018	0%

Se desarrolló el Taller de difusión físi: " Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing" en la ciudad de Chillán el día 15 de diciembre, en el cual participaron 20 personas, incluyendo profesionales del rubro silvoagrícola, empresarios, estudiantes e investigadores.

Se presentó la solicitud de patente n° 03472-2017 el día 29 diciembre de 2017 en el Instituto nacional de Propiedad intelectual de Chile (INAPI), titulada "Una formulación desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos de postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria".

En el objetivo n° 5 en la evaluación económica se obtiene un índice Costo/beneficio de 1,051, y en la evaluación económica se concluye que Para el proyecto, considerando una tasa de descuento del 12%, se obtiene un VAN igual a \$85.059.522. A partir de estos resultados se puede concluir que el proyecto debiera aceptarse. Para el proyecto, se obtiene una TIR igual a 43,88%. Al ser contrastados con una tasa de rendimiento del 12%, se puede concluir que el proyecto debiera aceptarse.

Se generó un plan de negocios que concluye que el proyecto debiera aceptarse.

Se generó un reporte de prospección de potenciales licenciatarios del desinfectante formulado, incluyendo las posibles empresas interesadas, teniendo la preferencia la empresa asociada al proyecto ECOMBIO SA.

La Empresa ECOMBIO manifestó su interés en Licenciar el producto para lo que se está tramitando un Acuerdo de Transferencia de Material y un Acuerdo de Opción de Licencia, el que se está evaluando en los departamentos jurídicos respectivos y se espera tener firmado en Marzo de 2018.

Impactos Obtenidos

Se obtuvo al menos 6 Extractos de algas abundantes en el litoral Chileno, que inhiben el crecimiento y germinación de hongos y bacterias patógenos de postcosecha de Cereza y arandano, de estos al menos 3 Extractos de algas mantuvieron su efecto controlador de pudrición de cerezas y arandanosin vivo, demostrando que las algas pueden ser una fuente natural de metabolitos con actividades biológicas interesantes para generar nuevos productos biotecnológicos.

Los resultados permitieron desarrollar un desinfectante ambiental de baja toxicidad que puede ser aplicable en presencia de fruta y que es comercialmente factible de producir, esto representa un importante avance ya que es un desinfectante que puede ser usado en los cultivos orgánicos y además facilita la desinfección de ambientes de Packing ya que los periodos de cosecha de estas frutas estacionales son cortos y en general trabajan en forma continua, por lo que no cuentan con la posibilidad de vaciar las salas y bodegas para desinfectar los ambientes. Por lo que este producto permitiría desinfectar en forma continua sin alterar el funcionamiento normal del packing, ya que el proceso completo de desinfección demora aproximadamente 30 minutos.

Además se desarrolló un taller de difusión denominado “Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing”, el día 15 de Diciembre de 2017, en la ciudad de Chillán al cual asistieron 20 personas entre ellos empresarios del área productores de fruta y packing, investigadores y estudiantes de pregrado y postgrado.

Además como impacto se realizó el ingreso de solicitud n° 03472-2017 de patente del producto “Una formulación de Desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria” 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 el día 29 de Diciembre de 2017

3.- Aspectos metodológicos del proyecto:

Actividad 1.1.- Recolección de macroorganismos marinos.

Se recolectó ejemplares de diferentes algas (*Durvillaea antarctica*, *Porphyra sp*, *Ulva sp*, *Chondrachantus chamissoi*, *Mastocarpus latissimus*, *Mazzaella sp.*, *Desmarestia ligulata*, mediante buzo y selección manual en la zona intermareal baja, intermareal medio y alto, de las localidades de Cocholgue, Merquiche, Mela, Dichato y Taucú (VIII Región). Las muestras de algas son inmediatamente depositadas en bolsas grandes y mantenidas a 4°C hasta su manipulación en laboratorio. La recolección de algas se realiza en forma periódica dependiendo de las necesidades de extractos, condiciones climáticas y altura de la marea (mareas bajas zona de Talcahuano). Las algas en laboratorio son lavadas para eliminar excesos de sales y secadas a 40°C para obtención de extractos.

RECOLECCIÓN DE FRUTOS INFECTADOS Y AISLAMIENTO DE FITOPATÓGENOS

Durante esta etapa se realizó la colección de frutos desde líneas de almacenamiento de frutos de packing y cultivos. Se aislaron y caracterizaron fitopatógenos y se realizó 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 fueron 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 fueron 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 realizó desde fragmentos de frutos con zonas necróticas, los cuales fueron sonicados en PBS. La suspensión resultante fue sembrada en estría en medio sólido King B, se seleccionaron las colonias fluorescentes a radiación UV.

Los cultivos monospóricos de los aislados de hongos son mantenidos en criotubos a 4°C. Al menos 2-4 de ellos se mantienen activos en agar papa-dextrosa para pruebas de rutina. Cepas de *Pseudomonas syringae* se mantiene en criotubos King B 30% glicerol a -80°C, estas se mantienen activas en agar King B o Medio nutritivo

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

1.3.1.-Caracterización morfológica y bioquímica: Se examinaron las características morfológicas como forma y dimensiones de conidióforos conidias, color y apariencia de la colonia (Lorenzini and Zapparoli, 2014). Bacterias fitopatógenas se caracterizaron con tinción gram, morfología de sus colonias, tamaño de halo de inhibición.

El cultivo monoespórico se incubó a 25°C hasta alcanzar 2/3 del radio de la placa Petri. Se selecciona los cultivos en los que no se observa crecimiento fuera del micelio central y tiene morfología similar a la muestra original. Se considera este cultivo para la identificación taxonómica, extracción de ADN y generación de cepario. Aquellas muestras que pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Botrytis* y *Penicillium* se mantienen en medio sólido.

1.3.2.-Caracterización molecular: Para la obtención de ADN genómico, desde el micelio obtenido en cultivos monoespórico se recuperaron las conidias en agua, se concentraron por centrifugación a 5000 rpm por 5 min. Las conidias luego fueron sometidas a shock de calor/frío y agitación con esferas de

vidrio para la ruptura celular (-80°C por 1 h y descongelamiento a temperatura ambiente). El ADN se precipitó con isopropanol y etanol 70%. Se usó como base el kit de extracción PowerSoil DNA isolationkit (MoBioLaboratories, Inc.) para la purificación del ADN genómico.

El ADN fue amplificado por medio de la PCR usando los partidores Fung-GC, ITS4 y NS1 y de acuerdo a (Lorenzini and Zapparoli, 2014), en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf). Las condiciones de la PCR y temperaturas se llevaron a cabo de acuerdo a (Jopia et al., 2011) El producto de PCR fue separado en geles con gradiente de denaturación (DGGE), muestras seleccionadas mediante este método serán secuenciados en Macrogen, Inc. Corea (<http://www.macrogen.com>). Finalmente las secuencias de ADN fueron analizadas usando Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn>) y comparadas con secuencias obtenidas desde GenBank. Mediante electroforesis con gradiente de denaturación (DGGE) se evaluó la diferencia de las secuencias del ADN de los diferentes hongos usando las distancias de avance. Con esto se puede comparar y establecer relaciones en la migración del gen amplificado y la morfología. Mediante esta comparación es posible agrupar los aislados y establecer si corresponden a la misma especie.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS Y EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD INHIBITORIA

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

Actividad 1.4.- Obtención de extractos y fracciones desde macroalgas con actividad inhibitoria (Lab. Fitoquímica). 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 algas secas fueron maceradas en una solución metanol: acetona (30%-70%) por una semana, posteriormente fue removido el solvente hasta sequedad, obteniendo un extracto total, el que posteriormente fue liofilizado en un equipo marca: BioBase, modelo: BK-FD 10T. (Temp. condensador de hielo(°C): 0.625, Grados Vacío (Pa): <10, Área de liofilización (m²): 0.075, Capacidad de captura de agua (Kg/24H): 750, Capacidad de carga de material/ estante (ml): 250). Posteriormente, la muestra liofilizada fue resuspendida en diclorometano como solvente y analizada en CG-MS.

CONDICIONES CROMATOGRAFICAS

La composición cualitativa de los extractos fue determinada en un cromatógrafo de gases con espectrómetro de masa (Agilent 7890) System VLMSD, 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) acoplado a un espectrómetro de masas con detector HP Modelo 5975. Como gas de arrastre se empleara helio con un flujo de 1ml/min. Las temperaturas del detector e inyector fueron 250 °C y 300 °C, respectivamente. El programa de temperatura fue de 100 °C 2 min, isotérmica de 100-280 °C, a 8 °C/min, 280 °C, con una duración de 40min. Rango de barrido de masas 100- 500 AMU. Se inyectó 1 µl de la muestra disuelto en diclorometano. Los porcentajes relativos de los componentes del extracto fueron obtenidos desde el área bajo el peak. La identificación de los compuestos, fue confirmada por comparación de los espectros de masa con aquellos compuestos desde la base de datos de NIST 95 (a Hewlett Packard MassSpectral Library, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA

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 cultivaron *P. syringae* y luego fueron transferidos a agar nutritivo. Sobre ellas se disponen discos circulares estériles (7 mm diámetro) de papel filtro, impregnados con extractos de algas. Discos con antibióticos conocidos fueron utilizados como controles positivos de inhibición de crecimiento. Las placas de agar fueron incubadas (temperatura 10-15°C) hasta que las bacterias desarrollen en tapiz. Se midió 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 y Lab. Fitopatología Forestal)

A) Obtención de conidias de *B. cinerea*, *Aspergillus* spp., y *Penicillium* spp.: Los hongos fueron cultivados en agar-papa-dextrosa (PDA, Difco) a 25°C, por 7-10 días. Luego se colectaron las conidias agregando agua destilada estéril y agitando suavemente la superficie de la colonia usando pipetas Pasteur (Sanfuentes and Ferreira, 1997). Las suspensiones de micelio fueron pasadas por capas de gasa estéril para separar el micelio de la suspensión. La concentración de conidias se ajustó a 1×10^5 conidias/ml.

B) Obtención de micelio: Los hongos fueron cultivados como se describe anteriormente (A). Después de una incubación por 4-7 días, se colectaron discos de agar (5 mm diámetro) desde las zonas de crecimiento activo del micelio (borde de las colonias).

1.5.3.- Efecto de los extractos de algas en el crecimiento micelial de *B. cinerea* *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.: La toxicidad de los extractos naturales y fungicidas comerciales fueron evaluados usando el test de crecimiento radial en agar papa dextrosa (APD 50%). Extractos totales, fraccionados y fungicidas comerciales serán disueltos en metanol a concentraciones de 0,44, 0,22, 0,18, 0,09, 0,01 mg/cm², equivalente a las concentraciones en mg/ml utilizadas en los ensayos de inhibición de germinación de conidias. 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. El experimento siguió un diseño completamente al azar (Soylu et al, 2010), con tres repeticiones por especie fúngica.

Se midió el diámetro longitudinal del crecimiento de la colonia y se calcularon los valores EC50, EC90 y EC100 para cada extracto. Se empleó ajuste PROBIT (Silva 2016, Rustom et al. 1989)

1.5.4.- Efecto de los extractos de algas en la germinación de conidias de *Aspergillus* spp., *B. cinerea* y *Penicillium* spp.

En tubos Eppendorf que contenían 100 ul de cada extracto de algas, solvente, agua o cloruro de benzalconio 1%, se agregó el mismo volumen de la suspensión de conidias (1×10^5 conidias /ml), el ensayo se incubó por 24h a 25°C. Las concentraciones de extracto probadas fueron 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 y 0 mg/ml. La evaluación consistió en determinar las conidias germinadas mediante el auxilio de microscopio óptico (x40) (Rego et al. 2006). Se consideró como una conidia germinada cuando la longitud del tubo germinativo fue igual o mayor que el diámetro de la conidia. El ensayo siguió un diseño completamente al azar, con cuatro repeticiones, evaluándose 100 conidias por cada una. La inhibición fue determinada mediante la relación porcentual de germinación del tratamiento agua. Se

calcularon los valores EC50, EC90 y EC100 que corresponden a la concentración efectiva en que el 50, 90 y 100% del microorganismo en prueba agente es inhibido en su crecimiento y/o proliferación por la adición o contacto con un agente antimicrobiano, en este caso el extracto algal (Rustiom et al. 1989, Silva 2016). Para el cálculo de las concentraciones efectivas se utilizó la tasa de mortalidad corregida con respecto a la dosis 0 (agua), con el cual se obtuvo un valor PROBIT de tabla, con estos datos se realizó la regresión lineal con el PROBIT de mortalidad y el logaritmo de la dosis para la determinación de EC50, EC90 y EC100 (Rustiom et al. 1989, Silva 2016).

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 fueron evaluados en microplacas de 96 pocillos. Para ello se mezclan en cada pocillo 20 μ l de inóculo conteniendo *P. syringae*(1×10^6 cél/ml), cepas DC3000 o CC94 resuspendidas en King B, 160 μ l medio King B, 20 μ l de extracto. Como blanco se usa 180 μ l de medio más 20 μ l del solvente usado en la preparación de los extractos. Los ensayos serán incubados en agitación continua (90 rpm) por 96 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se separaran 150 μ l de la fase planctónica y las células adheridas (biopelículas) se utilizan para tinción cristal

1.6.2.-Evaluación cristal violeta: La fase planctónica de los cultivos anteriores se traspasó a una nueva microplaca y se midió la absorbancia a 540 nm ($D.O_{540}$). Los pocillos conteniendo el resto del material adherido (biopelículas) de *P. syringae* se lavaron con agua estéril y se fijaron con 250 μ l de metanol por 15 min., luego fueron teñidas con 250 μ L de cristal violeta 1%, por 20 min, seguido por lavados con agua estéril y posterior recuperación del cristal violeta en 200 μ L de etanol 70%. Por absorbancia a 595 nm ($D.O_{595}$) se evalúa la biopelícula resultante (Peeters et al., 2008).

De esta forma se determinará la crecimiento bacteriano por observancia DO_{540} para células planctónicas y DO_{595} para células adheridas que forman la biopelícula, se determinará el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control con medio de cultivo sin extracto.

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 sometieron a evaluación su citotoxicidad (actividad 2.1 y 2.2) y se seleccionaron aquellas concentraciones inocuas validando la efectividad realizando nuevamente la actividad 1.6.

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 fueron mantenidos en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Los procedimientos de obtención y expansión celular fueron realizados en un gabinete de seguridad biológica nivel II y las células fueron almacenadas por congelamiento con DMSO 5% v/v en nitrógeno líquido. Se utilizó la línea celular de neuroblastoma de ratón Neuro 2a (ATCC CCL-131), la cual fue cultivada en RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con un 10% de SBF (Gibco), amphotericina B (0,25UG/mL) (Gibco), Penicilina/estreptomocina (100U/mL/100ug/mL) (Gibco), Piruvato de sodio (1mM) (Gibco), glutamina (2mM) (Gibco). La línea celular fue 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 realizó mediante un ensayo de viabilidad celular (MTT). Para la evaluación de la actividad citotóxica, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 125.000 células/mL, en un volumen de 200 μ L. Luego de 24 horas de incubación las células fueron expuestas a 100 μ L de una solución con los extractos de la serie MRQ-15 al MRQ-24, por 24 horas. El extracto a evaluar fue disuelto inicialmente en diferentes solventes tales como DMSO, Acetona, Cloroformo, dicloro metano, metanol, etanol y metanol acetona, sólo este último en una mezcla 7:3, nos permitió disolver la mezcla en el medio de cultivo de las células (no siendo totalmente homogénea) siendo la dilución del solvente menor al 1,5%. El rango evaluado de concentración de los extracto fueron de 360 mg/L a 45 mg/L. Una vez terminado el período de incubación con el extracto, este fue eliminado y se agregaron 60 μ L de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-Yl)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro, Invitrogen) a una concentración de 0,83 mg/mL. Luego de 30 minutos a 37°C fue retirado y las sales de formazán fueron disueltas con 100 μ L de DMSO. Se midió la densidad óptica en un lector de microplacas (Synergy H1, Biotek, Vermont, USA) a 570 nm. Se calcularon los respectivos porcentajes de viabilidad celular respecto a su control y Las curvas dosis-respuesta obtenidas fueron analizadas mediante el programa estadístico Prism 4 (GraphPad, San Diego, California, USA), del que se obtuvo 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 LC50, 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-LC50 (ó 48h-LC50) 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-LC50 ó 48h-LC50 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-LC50 ó 48h-LC50 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 dáfidos, 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 \square 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 \square 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:

- a) la concentración de oxígeno al final del bioensayo debe ser mayor o igual a 2 mg/l.
- b) la mortalidad en los individuos parentales no debe ser mayor al 10%
- c) los individuos parentales de los controles deben tener a lo menos 3 camadas
- d) 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 3.2.- 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 μ m 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 antimicrobinas 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).

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

3.3.1. Selección de hongos obtenidos desde arándanos y cerezas mediante ensayos de agresividad

Obtención y preparación de frutos para ensayos: frutos de arándano y cereza fueron seleccionados según homogeneidad de tamaño, turgencia y color, aquellos frutos que presentaron lesiones o contaminación por patógenos fueron descartados. La desinfección de los frutos consistió en exponerlos por dos minutos en solución hipoclorito de sodio al 2%, y un lavado en agua destilada estéril, luego los frutos fueron secados a temperatura ambiente por 30 minutos aproximadamente (Qin et al. 2006, Xu et al. 2008, Wang et al. 2015).

Una vez secos los frutos se les realizó una herida de 1-2 mm de profundidad (Smilanick et al. 2006), y luego fueron sumergidos por 2 minutos en suspensión de conidias en una concentración de $1,5 \times 10^5$ conidias/ml de los aislados seleccionados (Tabla 1); dejándose secar por 2 minutos en campana de flujo laminar (Romanazzi et al. 2008). Una vez secos fueron depositados en cámara húmeda de manera equidistante, la cámara se mantuvo a 27°C. El ensayo se realizó por triplicado y con cinco frutos por replica. Diariamente, se contabilizó el número de frutos con síntomas de enfermedad y la proporción del fruto infectado (%).

3.3.2.-Ensayos de inhibición de enfermedad por fitopatógenos *B. cinerea*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp en frutos:

Inoculación y pre-incubación en cámaras de crecimiento: unidades experimentales consistieron de 50 frutas ubicadas en placas de Petri o pocillos plásticos previamente esterilizados, conteniendo papel Whatman No. 1 humedecido con agua desionizada estéril. Sobre cada grupo se aplicó la mezcla de solvente + compuesto activo, sumado a este procedimiento se aplicaron como control el fungicida cloruro de benzalconio. 48h después los frutos fueron inoculados con 20 µL de la suspensión de 1×10^8 cfu/ml de *P. syringae* y 1×10^5 conidia/ml de *B. cinerea*, *Aspergillus* sp., y *Penicillium* sp. (cepas aisladas desde frutas infectadas) (Delen et al., 1984). Como control se usaron frutos tratados con agua estéril. Las frutas inoculadas fueron pre-incubadas a 23–25 °C y luego mantenidas por 10 días, periodo durante el cual fueron evaluadas diariamente.

3.3.3Diseño experimental en bloque

Frutos de arándano, cereza y/o uvas fueron seleccionados según homogeneidad de tamaño, turgencia y color, frutos con lesiones evidentes o contaminación por patógenos fueron descartados. La desinfección de los frutos consistió en 2 min. de exposición en hipoclorito de sodio al 2%, y un lavado en agua destilada estéril, los frutos fueron secados a temperatura ambiente por 30 min. (Qin et al. 2006, Xu et al. 2008, Wang et al. 2015). Las aplicaciones se realizaron por fruto de forma independiente, para cada ensayo el diseño experimental correspondió a un diseño factorial (2X4X5X4) en bloques generalizado completamente al azar, donde:

- A. Bloque: Se realizó un bloque por temperatura,
 - Temperatura Bloque 1: 4°C.
 - Temperatura Bloque 2: 25°C
 -
- B. Factor A: Correspondió a los fitopatógenos a utilizar, y consta de tres niveles
 - *Botrytis cinerea* aislado BC + RCO2
 - *Penicillium* aislado CAFRO5 + RC01
 - *Aspergillus* aislados CAFRO4 + CAFH02
 - *P. syringae*(DC3000 + CC94)
 -
- C. Factor B: Correspondió al extracto algal, consta de cinco niveles:
 - *Ulvasp.* (MRQ23) concentración 0,6 mg/ml
 - *Mazzaellasp.* (MRQ24) concentración 2,6 mg/ml
 - MRQ23 + MRQ24 (0,6 mg/ml + 2,6 mg/ml)
 - Agua (Control)
 - Cloruro de benzalconio (Control positivo)

Cada bloque constó de 4 repeticiones con 10 unidades de observación por replica (U.O= 1600).

Se realizaron heridas a los frutos de cerezas, arándanos y uva, de 1-2 mm de profundidad (Smilanick et al. 2006) y fueron sumergidos por 2 min. en suspensión de conidias de acuerdo a lo que se indica en Factor A ($1,5 \times 10^5$ UFC/ml en hongos y 1×10^6 UFC/ml en bacterias) y se secaron por 24 h (Romanazzi et al. 2008, Smilanick et al. 2006) a las temperaturas 4 y 25°C. Pasadas las 24h fueron sumergidos por 3 min. en los tratamientos (Factor B) y dispuestos en forma equidistante en placas Petri (Sholberg et al. 2004).

3.3.4.-Análisis estadístico: La severidad de la infección fue 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: $\Sigma (\text{escala} \times \text{n}^\circ \text{ de piezas dañadas}) \times 100 / (\text{n}^\circ \text{ total piezas} \times \text{escala más alta})$. La incidencia se calcula como el número de frutos enfermos/total de frutos *100. Las observaciones pueden ser analizadas mediante ANOVA, seguido de test de Duncan ($P \leq 0.01$) (Yildiz, 2000).

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 un mes por 6 meses. Se evaluó la incidencia de enfermedad producida por *B. cinerea* en arándano tratados con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., como se indica en actividad 3.3.2, y se compararan con un control de desinfectante al inicio, 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.

Para demostrar biodegradabilidad bacteriana, se evaluó la presencia de bacterias en cada uno de las preparaciones, considerando que estas pueden ser partícipes de la degradación biológica de los extractos. Para esto último, los extractos preparados en agua fueron asperjados en placas con medio nutritivo sólido (TSA 25%) y se cuantificó bacterias viables mediante recuento de colonias.

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.

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 aerobiocolector 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 µm. 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.

4.2.2.- Incubación de las placas: Las placas de PDA 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
Temperatura	37 °C	30 °C
Tiempo	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 m³. 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 m³. 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: Se aplicó el desinfectante formulado con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., con el equipo nebulizador para la desinfección ambiental y el equipo móvil Hurricane Ultra de DYNA – fog para desinfección de superficies, se dejó un tiempo de acción de 30 minutos y al momento de dispersarse de niebla se repiten las mediciones de carga microbiana ambiental con el equipo AirTest Omega y de las

superficies de las cámaras evaluadas. Las salas evaluadas corresponden a un Packing de la Octava región de arándanos y cerezas y fueron las salas: Cámaras de descarte a 4°C, pasillo y 2 cámaras de producto final a 4°C.

4.3 Análisis de las características organolépticas de los frutos.

Se realizó Análisis de las características organolépticas de arandano, cereza y uva expuesta la nebulización con el desinfectante natural formulado con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., para comprobar si produce cambios en las características organolépticas de los frutos. Las características analizadas fueron:

Pérdida de peso en el fruto: Se pesará diariamente una submuestra de 4 frutos por replica una vez concluido el día 20 se realizará el cálculo de la pérdida de peso total (Schotsmans et al. 2007).

Análisis sensorial: Se realizó una prueba sensorial afectiva para determinar la aceptabilidad de consumo de un producto (Peigen 2017), se realizó una prueba de escalar de control debido a que mide la diferencia entre una muestra control y una muestra problema, no se deben presentar más de 6 muestras y se requiere un mínimo de 10 panelistas los cuales no deben estar ligados al estudio y de preferencia no ser fumadores o no haber fumado una hora antes de la encuesta (Hernandez 2005).

Un total de 50 frutos fueron expuestos al tratamiento con desinfectante, al transcurso de 7 días se realiza el análisis sensorial (Cantin et al. 2012). A cada panelista se le entregaran una encuesta para todas las frutas donde se dispondrán dos tratamientos a analizar por fruto y deben realizar una valoración sensorial otorgándole un puntaje a la percepción del sabor (de menos a más agradable, con puntajes de 1 a 7) .

Antocianinas totales: La determinación de antocianinas en los frutos frescos de arándanos se realizará a partir 1g del triturado de frutos al cual se le efectuará una extracción con metanol acidificado con ácido clorhídrico al 1% en tres etapas, manteniendo una relación en peso de muestra-solvente 1:10. Los sobrenadantes metanólicos obtenidos en cada una de las tres etapas se mezclarán y se centrifugan a 4000 rpm durante 20 minutos. A continuación, se mezclará una alícuota del sobrenadante con tampón a pH 1.0 y otra alícuota con tampón a pH 4.5 y se medirá la absorbancia a 510 y 700 nm. La concentración se expresa como mg de cianidina-3-glucósido/100 g de arándano, cereza, o uva (Zapata et al. 2014)

pH:La determinación del pH se realizará mediante un pHmetro.

Sólidos solubles: El contenido de sólidos solubles se determinará mediante el método refractométrico (AOAC, 1990), utilizando un refractómetro termocompensable (Atago, modelo DTM-1, Japón). Los resultados se expresaron en °Brix.

Análisis estadísticos: A todos los datos, menos a los ensayos que serán evaluados mediante el cálculo de los valores EC50 y EC90, se comprobaran los requisitos de análisis de varianza, es decir, homogeneidad de varianza (Test de Levene), normalidad de los residuos (Prueba de Anderson Darling), posterior a esto se realizará un análisis de varianza según el diseño experimental (Diseño en bloques completamente aleatorios generalizados o Diseño completamente aleatorio según corresponda) y un posterior Test de Tukey con 95% de confianza de corresponder.

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.

superficies de las cámaras evaluadas. Las salas evaluadas corresponden a un Packing de la Octava región de arándanos y cerezas y fueron las salas: Cámaras de descarte a 4°C, pasillo y 2 cámaras de producto final a 4°C.

4.3 Análisis de las características organolépticas de los frutos.

Se realizó Análisis de las características organolépticas de arandano, cereza y uva expuesta la nebulización con el desinfectante natural formulado con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., para comprobar si produce cambios en las características organolépticas de los frutos. Las características analizadas fueron:

Pérdida de peso en el fruto: Se pesará diariamente una submuestra de 4 frutos por replica una vez concluido el día 20 se realizará el cálculo de la pérdida de peso total (Schotsmans et al. 2007).

Análisis sensorial: Se realizó una prueba sensorial afectiva para determinar la aceptabilidad de consumo de un producto (Peigen 2017), se realizó una prueba de escalar de control debido a que mide la diferencia entre una muestra control y una muestra problema, no se deben presentar más de 6 muestras y se requiere un mínimo de 10 panelistas los cuales no deben estar ligados al estudio y de preferencia no ser fumadores o no haber fumado una hora antes de la encuesta (Hernandez 2005).

Un total de 50 frutos fueron expuestos al tratamiento con desinfectante, al transcurso de 7 días se realiza el análisis sensorial (Cantin et al. 2012). A cada panelista se le entregaran una encuesta para todas las frutas donde se dispondrán dos tratamientos a analizar por fruto y deben realizar una valoración sensorial otorgándole un puntaje a la percepción del sabor (de menos a más agradable, con puntajes de 1 a 7) .

Antocianinas totales: La determinación de antocianinas en los frutos frescos de arándanos se realizará a partir 1g del triturado de frutos al cual se le efectuará una extracción con metanol acidificado con ácido clorhídrico al 1% en tres etapas, manteniendo una relación en peso de muestra-solvente 1:10. Los sobrenadantes metanólicos obtenidos en cada una de las tres etapas se mezclarán y se centrifugan a 4000 rpm durante 20 minutos. A continuación, se mezclará una alícuota del sobrenadante con tampón a pH 1.0 y otra alícuota con tampón a pH 4.5 y se medirá la absorbancia a 510 y 700 nm. La concentración se expresa como mg de cianidina-3-glucósido/100 g de arándano, cereza, o uva (Zapata et al. 2014)

pH:La determinación del pH se realizará mediante un pHmetro.

Sólidos solubles: El contenido de sólidos solubles se determinará mediante el método refractométrico (AOAC, 1990), utilizando un refractómetro termocompensable (Atago, modelo DTM-1, Japón). Los resultados se expresaron en °Brix.

Análisis estadísticos: A todos los datos, menos a los ensayos que serán evaluados mediante el cálculo de los valores EC50 y EC90, se comprobarán los requisitos de análisis de varianza, es decir, homogeneidad de varianza (Test de Levene), normalidad de los residuos (Prueba de Anderson Darling), posterior a esto se realizará un análisis de varianza según el diseño experimental (Diseño en bloques completamente aleatorios generalizados o Diseño completamente aleatorio según corresponda) y un posterior Test de Tukey con 95% de confianza de corresponder.

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 organizó un Taller de difusión orientada a profesionales y empresarios del área de agroalimentaria, investigadores y estudiantes. Además con los resultados de este estudio se ingresó una solicitud de patente a INAPI y se evaluó la aplicación comercial y estrategias de comercialización del desinfectante diseñado.

Actividad 5.1.- Difusión resultados y Organización Taller.

Se realizó 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 realizó la programación del Taller “Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing Transferencia de ecotecnologías naturales aplicadas al control de fitopatógenos poscosecha”, en la Ciudad de Chillán el día 15 de diciembre de 10:00 a 13:00 y en la ciudad de Los Angeles el día 18 de Diciembre de 10:00 a 13:00 . Orientada a profesionales y Empresarios del área de agroalimentaria, investigadores y estudiantes de pre y postgrado. La organización de este taller se realizó con la estrecha participación de la empresa asociada ECOMBIO Ltda. Durante este taller se esperaba la participación de al menos 10 participantes, incluyendo representantes de empresas, y de la participación de investigadores y estudiantes de postgrado de diferentes instituciones.

Actividad 5.2.- Protección de propiedad intelectual

Se realizó el ingreso de solicitud de patente del producto “Una formulación de Desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria” 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.

Se realizará una prospección de posibles licenciarios, con la prioridad de traspasar la tecnología a la empresa asociada ECOMBIO SA, por lo que se gestionará la realización de un acuerdo de transferencia de material, a cargo de la Unidad de Propiedad intelectual UPI de la Universidad y un acuerdo de opción de licenciamiento, a cargo de la Oficina de transferencia y Licenciamiento OTL de la Universidad de Concepción.

Modificaciones de la metodología planteada originalmente:

1.- Se agregó el ensayo de DGGE en la actividad 1.3.2.-Caracterización molecular de los aislados: Para facilitar la identificación por secuenciación del ADN de los aislados que estaban puros y permite ordenar adecuadamente los aislados, para seleccionar adecuadamente los aislados a secuenciar..

2.- Originalmente la actividad 1.6.2.-Evaluación cristal violeta: consideraba determinar formación específica de biopelículas (SBF), la que se cuantifica como $SBF = (D.O_{595}) / (D.O_{540})$. En ambos casos se debió restar la $D.O_{595}$ o $D.O_{540}$ de los blancos respectivos (Paiva de Almeida and Leal, 2012). Se calculó estos valores, pero los datos fueron erráticos, no reflejando el efecto observado con los datos obtenidos por lo que se determinó finalmente porcentaje de inhibición del crecimiento de células planctónicas y biopelícula con respecto al control con medio de cultivo sin extracto.

3.- La Actividad 3.1.- Caracterización bioquímica de compuesto activo se eliminó debido a que a la naturaleza de los extractos es posible caracterizarlos en forma química, la caracterización bioquímica es aplicable cuando el compuesto activo es una proteína, pero debido a la metodología aplicada los extractos no contienen proteínas, así que esta actividad se eliminó ya que no aportaba nueva información.

4.- La actividad Actividad 3.3.- Evaluación del efecto de los extractos activos en frutos y bioensayos in vivo en cámara. Fue modificada, ya que se agregó la evaluación de agresividad de los hongos aislados, para seleccionar los hongos más agresivos de *B. cinerea*, *Penicillium sp.*, y *Aspergillus sp.*, para determinar el efecto de los extractos de algas con mayor actividad antifúngica.

Además se realizó el diseño experimental final del ensayo 3.3.2 según los resultados obtenidos. Además se incluyó en los ensayos como fruta la uva, ya que es una fruta muy sensible a los patógenos estudiados, es un nicho importante de aplicación del desinfectante y además por la estacionalidad de la fruta, uva está disponible un periodo más largo, facilitando realizar las evaluaciones con uva de mesa

5.- La actividad 4.3 Nebulización y evaluación del desarrollo de la enfermedad, se modificó por la actividad 4.3 Análisis de las características organolépticas de los frutos, ya que la original evaluaba lo mismo que la actividad 4.2.- Ensayos de disminución de la carga ambiental, así que se cambió para que indicara lo que se evaluó a las frutas expuestas a la nebulización con desinfectante natural.

4.- Descripción de las actividades PROGRAMADAS y tareas EJECUTADAS para la consecución de los objetivos, comparación con las programadas, y razones que explican las discrepancias. (ANÁLISIS DE BRECHA).

Nº OE	Nº RE	Actividades	% de ejecución
1	1	1.1.- Recolección de macroorganismos marinos	100%
		1.2.- Colección de frutos (arándanos y cerezos) infectados con fitopatógenos desde postcosecha: detección y aislamiento de hongos y bacterias	100%
		1.3.- Identificación bioquímica y molecular de cepas/serovar de fitopatógenos	100%
		1.4.- Obtención de extractos y fracciones desde macroalgas con actividad inhibitoria	100%
		1.5.- .- Ensayos de inhibición de extractos de algas contra fitopatógenos: <i>B. cinerea</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., y <i>P. syringae</i>	100%
		1.6.- Evaluación de actividad de los extractos sobre la formación de biopelículas fitopatógenos	100%
2	2	2.1.- Determinación de rangos de inocuidad para la selección de extractos con actividad antimicrobiana usando líneas celulares	100%
		2.2.- Estudios de ecotoxicidad aguda y crónica en organismos acuáticos	100%
3	3	3.1.- Caracterización bioquímica de compuesto activo:	0%
		3.2.- Determinación química de sus compuestos bioactivos	100%
		3.3.- Evaluación del efecto de los extractos activos en frutos frutos y bioensayos <i>in vivo</i> en cámara..	100%
		3.4.- Formulación del desinfectante ambiental con extractos de algas activos	100%
		3.5.- Análisis de duración mínima del producto.	100%
4	4	4.1.- Formulación de desinfectante ambiental en nebulizador	100%
		4.2.- Ensayos de disminución de la carga ambiental	100%
		4.3.- Nebulización y evaluación del desarrollo de la enfermedad	100%
5	5	5.1. .- Difusión resultados y Organización Taller.	100%
5	6	5.2. Protección de propiedad intelectual	100%
5	7	5.3.- Evaluación costo/beneficio de la aplicación comercial, modelo de negocio y estrategia de comercialización.	93.3%

Dentro de las actividades programadas la actividad que se eliminó y por lo tanto no se cumplió fue la actividad 3.1.- Caracterización bioquímica de compuesto activo se eliminó debido a las razones explicadas anteriormente.

Dentro del objetivo 5, falta el acuerdo de licencia, la empresa asociada ECOMBIO está interesada en licencia, para lo cual se está tramitando el acuerdo de transferencia de material y el acuerdo de opción de licenciamiento, dado que los últimos ensayos se realizaron en diciembre de 2017, debido a la estacionalidad de la fruta recién estuvieron disponibles a finales de noviembre, por lo que no se pudo gestionar la licencia antes del 31 de diciembre de 2017 y se espera que los documentos nombrados estén firmados en mayo de 2018.

5.- Resultados del proyecto:

5.1 Resultados parciales obtenidos

Actividad 1.1.- Recolección de macroorganismos marinos.

Se colectaron 21 especies de algas distintas de las costas de la región del Biobío, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Listado de algas con sus respectivos códigos de identificación y sectores de colecta

Cód.	Nombre común	Especie	División	Colecta	Ubicación
B-01	Lechuga de mar	<i>Ulva sp.</i>	Chlorophyta	Intermareal rocoso	Cocholgue
B-02	Luche	<i>Pyropia sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Cocholgue
B-03	--			Intermareal rocoso	Cocholgue
B-04	Chascón	<i>Lessonia sp.</i>	Phaeophyta	Intermareal rocoso	Cocholgue
B-05	Luga cuchara o corta	<i>Mazzaella laminarioides</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Cocholgue
MRQ-01; MRQ-23	Lechuga de mar	<i>Ulva rigida</i>	Chlorophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-02	--	<i>Ahnfeltiopsis sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-03	--	<i>Ceramium sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-04; MRQ-09	--	<i>Grateloupia sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-05; MRQ-24	Luga cuchara o corta	<i>Mazzaella laminarioides</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-07; MRQ-19	Chicoria	<i>Chondracanthus chamissoi</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-08	--	<i>Mastocarpus papillatus</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-10; MRQ-18	Huiro	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Phaeophyta	Deriva	Merquiche
MRQ-11	--	<i>Ectocarpus confervoides</i>	Phaeophyta	Intermareal superior	Merquiche
MRQ-12	--	<i>Ahnfeltiopsis sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-13	--	<i>Rhodymenia sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-14	--	<i>Plocamium sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-15	Cochayuyo, ulte	<i>Durvillaea antarctica</i>	Phaeophyta	Deriva	Merquiche
MRQ-16	Luche	<i>Pyropia sp.</i>	Rhodophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
MRQ-17	Chascón	<i>Lessonia sp.</i>	Phaeophyta	Intermareal rocoso	Cocholgue

MRQ-22	--	<i>Codium dimorphum</i>	Chlorophyta	Intermareal rocoso	Merquiche
--------	----	-------------------------	-------------	--------------------	-----------

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.

Se tomaron muestras de ambiente y frutas con signos y síntomas desde los packing de Copefrut de Linares, Packing JM de la VI y VII región, cítricos JM de la VIII región y cultivos de Caf el Alamo de la VIII región, desde los cuales se obtuvieron 70 aislados de distintos géneros de hongos, los que se detallan en la tabla 2.

Tabla 2.- Registro de la colección de hongos aislados desde distintas áreas de packing y huertos de la VII-VIII región, con su respectiva identificación

N°	Código	Empresa	Localidad	Fruto	línea	Submuestreo	Identificación molecular
1	AS-A02	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Airtest Selección	
2	AS-A03	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Airtest Selección	
3	CAF-A01	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Frutos	<i>Aspergillus ustus</i>
4	CAF-A02	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Frutos	<i>Aspergillus clavatus</i>
5	CAF-A03	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Frutos	<i>Fusarium</i> sp.
6	CAF-A04	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Frutos	<i>Alternaria alternata</i>
7	CAF-H01	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Hojas	<i>Aspergillus clavatus</i>
8	CAF-H02	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Hojas	<i>Aspergillus fumigatus</i>
9	CAF-H03	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Hojas	<i>Fusarium oxysporum</i>
10	CAF-H04	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Hojas	<i>Fusarium verticillioides</i>
11	CAF-H05	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Hojas	<i>Alternaria alternata</i>
12	CAF-R01	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Residuos	
13	CAF-R03	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Residuos	
14	CAF-R04	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Residuos	<i>Aspergillus niger</i>
15	CAF-R05	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Residuos	<i>Penicillium</i> sp.
16	CAF-R06	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Residuos	<i>Aspergillus niger</i>
17	CAF-R07	Caf El Alamo	VIII	Arándano		Residuos	
18	CF1-C02	Copefrut	Linares	Cerezas	L1	Cinta fumigación	
19	CP1-C01	Copefrut	Linares	Cerezas	L1	Corte pedicelo	
20	CP1-C02	Copefrut	Linares	Cerezas	L1	Corte pedicelo	
21	CP2-C01	Copefrut	Linares	Cerezas	L2	Corte pedicelo	
22	CP2-C02	Copefrut	Linares	Cerezas	L2	Corte pedicelo	
23	CP2-C03	Copefrut	Linares	Cerezas	L2	Corte pedicelo	
24	CP2-C04	Copefrut	Linares	Cerezas	L2	Corte pedicelo	
25	CT0-01	Cítricos JM	VIII	Limonas	T0	airtest	
26	CT0-02	Cítricos JM	VIII	Limonas	T0	airtest	Candidato <i>Aspergillus</i>
27	CT2-01	Cítricos JM	VIII	Limonas	T2	airtest	<i>Trichoderma</i> sp.
28	CT2-02	Cítricos JM	VIII	Limonas	T2	airtest	<i>Trichoderma</i> sp.
29	CT2-03	Cítricos JM	VIII	Limonas	T2	airtest	<i>Trichoderma</i> sp.
30	E1-C01	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Empaque	Candidato <i>Penicillium</i>

31	E1-C02	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Empaque	
32	E1-C03	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Empaque	<i>Cladosporium</i> sp
33	E1-C05	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Empaque	<i>Penicillium griseofulvum</i>
34	E1-C06	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Empaque	<i>Cladosporium</i> sp
35	E-A01	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Empaque	
36	E-A02	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Empaque	
37	E-C02	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Empaque	<i>Penicillium</i> sp.
38	FD1-C01	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Frutos desechos	Candidato <i>Botrytis</i>
39	FD2-C01	Copefrut	Linares	Cereza	L2	Frutos desechos	<i>Botrytis cinerea</i>
40	IE-A03	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Impresión Empaque	
41	JMC-00	Packing JM	VI-VII	Cereza	-	Sala mantención	
42	JMC-04	Packing JM	VI-VII	Cereza	-	Sala mantención	
43	JMC-09	Packing JM	VI-VII	Cereza	-	Sala mantención	
44	JMC-11	Packing JM	VI-VII	Cereza	-	Sala mantención	
45	JMC-03	Packing JM	VI-VII	Cereza	-	Sala mantención	<i>Penicillium</i> sp.
46	JMC-08	Packing JM	VI-VII	Cereza	-	Sala mantención	<i>Penicillium</i> sp.
47	JMC-10	Packing JM	VI-VII	Cereza	-	Sala mantención	<i>Penicillium</i> sp.
48	R-C01	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Residuos	<i>Penicillium</i> sp.
49	R-C02	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Residuos	Candidato <i>Botrytis</i>
50	R-C03	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Residuos	<i>Mucor circinelloides</i>
51	R-C04	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Residuos	Candidato <i>Penicillium</i>
52	R-C06	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Residuos	Candidato <i>Botrytis</i>
53	R-C08	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Residuos	Candidato <i>Botrytis</i>
54	R-C09	Copefrut	Linares	Cereza	L1	Residuos	
55	S-A01-1	Copefrut	Linares	Arándano		Selección	
56	S-A01-3	Copefrut	Linares	Arándano		Selección	
57	SC-A01	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Cinta selección	Candidato <i>Alternaria</i>
58	SC-A04	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Cinta selección	<i>Trichoderma</i> sp.
59	SC-A06	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Cinta selección	<i>Penicillium</i> sp.
60	SF-01	Copefrut	Linares			Sala fumigación	
61	SF-02	Copefrut	Linares			Sala fumigación	
62	SF-03	Copefrut	Linares			Sala fumigación	
63	SM-A01	Copefrut	Linares	Arándano	-	Sala mantención	<i>Lecanicillium</i> sp.
64	SM-A03	Copefrut	Linares	Arándano	-	Sala mantención	
65	SM-C01	Copefrut	Linares	Cereza	-	Sala mantención	
66	SM-C03	Copefrut	Linares	Cereza	-	Sala mantención	
67	ZC2-C01	Copefrut	Linares	Cerezas	L2	Zona Confección	
68	ZC2-C02	Copefrut	Linares	Cerezas	L2	Zona Confección	
69	ZC2-C03	Copefrut	Linares	Cerezas	L2	Zona Confección	
70	ZS-A01	Copefrut	Linares	Arándano	L1	Zona Sucia (fruta cosecha)	<i>Trichoderma</i> sp.

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

Se caracterizó la morfología macroscópica (figura 1) y microscópica de los distintos aislados, se seleccionaron los aislados con características presuntivas de pertenecer a los géneros *Botrytis* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. para realizar la caracterización molecular, de la que inicialmente se realizó electroforesis con gradiente de denaturación (DGGE) para evaluar la diferencia de las secuencias del ADNr de los diferentes hongos usando las distancias de avance. Con esto se puede comparar y establecer relaciones en la migración del gen amplificado y la morfología. Mediante esta comparación fue posible agrupar los aislados y establecer si corresponden a la misma especie. Según estos resultados, se agrupan los aislados CT2-01, CT2-02, CT2-03, los aislados CAF-A03, CAF-H03, CAF-H04, los aislados CAF-A04, CAF-H05 y se relacionan morfológicamente.

Luego de esto se seleccionó estos grupos de aislados para realizar la secuenciación del ADNr para la identificación de los aislados como se muestra en la Tabla 2.

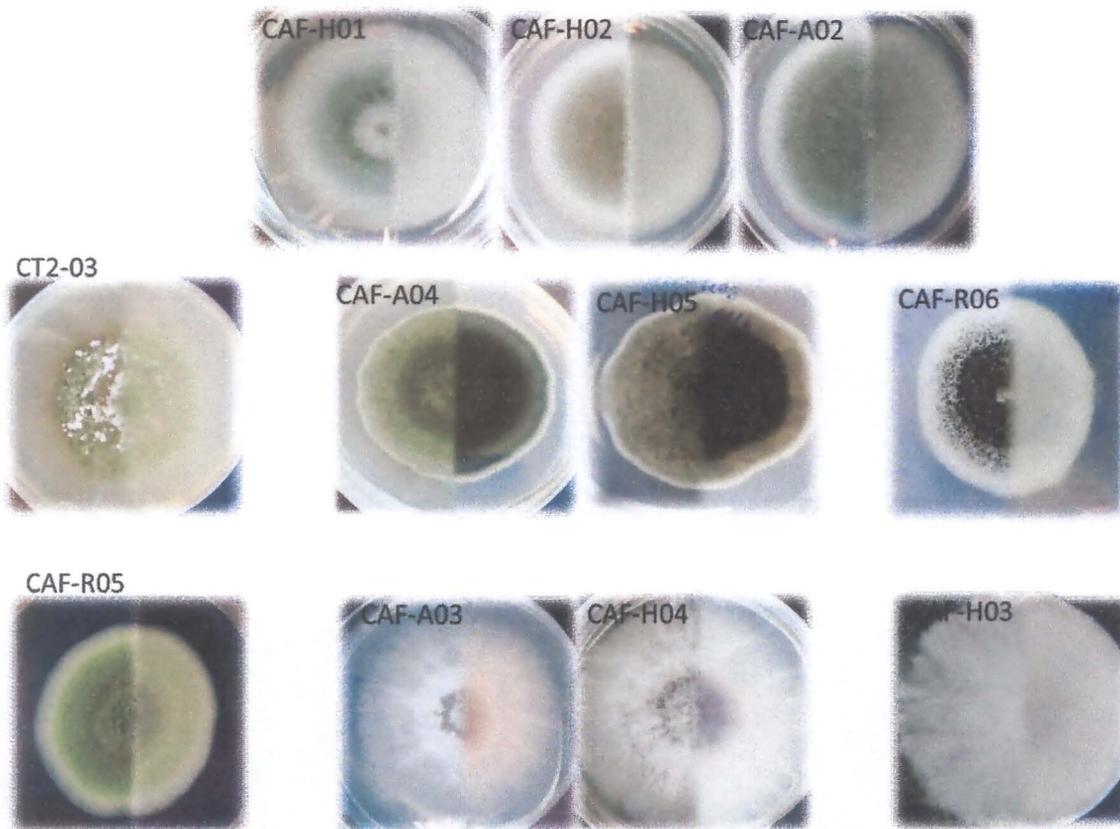


Figura 1 Diferentes morfologías de hongos aislados desde muestras de aire y frutos contaminados provenientes de packing y huertos de la zona. Cada imagen muestra la mitad del micelio visto desde arriba y la otra desde la parte inferior de la placa

De los 70 aislados originales se identificó hasta nivel de género 31 aislados, de los cuales 7 pertenecen al género *Aspergillus*, 8 pertenecen al género *Penicillium* y 6 pertenecen al género *Botrytis*. En la Tabla 2 se muestra la identificación molecular de los aislados.

Actividad 1.4.- Obtención de extractos y fracciones desde macroalgas con actividad inhibitoria

Se realizó extractos totales de todos las algas colectadas, entre los extractos obtenidos, el mayor rendimiento que observamos fue para *M. laminarioides*, seguido por *Ulva* sp, y *Lessonia* sp. Las masas de los extractos de algunas algas y los rendimientos respecto al peso fresco del alga se entregan en Tabla 3.

Tabla 3. Rendimiento de extractos algales en metanol:acetona desde muestras de algas colectadas en el intermareal VIII Región.

Código	Alga	Peso del alga (Kg)	Extracto total (g)	Rendimiento (%)
CCh-01	<i>Ulva</i> sp	3,45	44,6453	1.294
CCh-02	<i>Pyropia</i> sp	1,87	15,5454	0.831
CCh-03	<i>Mazzaella laminarioides</i>	3,66	67,7154	1.850
CCh-04	<i>Lessonia</i> sp	5,00	53,5786	1.072
CCh-05	<i>Grateloupia</i> sp	8,75		

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

Se realizó evaluación de la difusión de extractos algales con potencial antimicrobiano en discos de papel filtro sobre tapices del *P. syringae*, *B. cinerea*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., cuyos resultados se muestran en la tabla 4:

Tabla 4. Inhibición de extractos algales totales sobre fitopatógenos, usando tres rangos de concentración o potencia (5, 2,5 o <2,5 mg) en discos de nitrocelulosa. B: *Botrytis cinerea*; P: *Penicillium* sp; A: *Aspergillus* sp; DC3000 y CC94: *Pseudomonas syringae* .La exposición de los fitopatógenos al extracto de algas se evaluó a los 7 días (crecimiento micelial), 48 h (crecimiento bacteriano), 15 h (germinación de conidias), 36 h (formación de biopelículas). Densidad óptica ~ 0 indica bajo crecimiento. El control positivo corresponde a Cloruro de benzalconio a una potencia de 10mg, correspondiente a la concentración de uso recomendada por el fabricante de 0,5% p/v.

Código alga	Género/especie	Potencia (mg)	Efecto de extractos en:		
			Crecimiento micelial o bacteriano (área inhibición en cm ²)	Germinación (%IG)	Formación biopelículas (Densidad óptica)
B-01	<i>Ulva</i> sp.	5	B (1,8)	B (53,0) P (87,3) A (100,0)	
B-02	<i>Pyropia</i> sp.	5	DC3000 (0,08)	B (89,9) P (89,1) A (100,0)	DC3000 (0,58) CC94 (0,06)

B-03	No identificada	5	--	B (44,6) P (60,5) A (100,0)	--
MRQ-05	<i>Mazzaella laminarioides</i>	5	DC3000 (0,25) CC94 (0,15)	B (99,5) P (90,5) A (100,0)	DC3000 (0,00) CC94 (0,02)
MRQ-08	<i>Mastocarpus papillatus</i>	5	--	B (89,9) P (87,4) A (100,0)	--
MRQ-09	<i>Grateloupia sp.</i>	5	--	B (89,9) P (85,3) A (100,0)	--
MRQ-10	<i>Macrocystis pyrifera</i>	5	DC3000 (0,63)	B (–) P (96,0) A (88,9)	DC3000 (0,37) CC94 (0,44)
B-04	<i>Lessonia sp.</i>	2,5	DC3000 (0,33) CC94 (0,67)	B (49,4) P (38,1) A (100,0)	DC3000 (0,01) CC94 (0,01)
MRQ-01	<i>Ulva rigida</i>	2,5	B (8,6) P (6,8) A (13,8)	B (26,2) P (89,7) A (83,6)	--
MRQ-02	<i>Ahnfeltiopsis sp.</i>	2,5	--	--	--
MRQ-03	<i>Ceramium sp.</i>	2,5	--	B (27,2) P (75,5) A (69,1)	--
MRQ-04	<i>Grateloupia sp.</i>	2,5	DC3000 (0,49) CC94 (0,49)	B (53,6) P (76,9) A (71,6)	DC3000 (0,00) CC94 (0,00)
MRQ-07	<i>Chondracanthus chamissoi</i>	2,5	CC94 (0,15)	B (48,9) P (82,1) A (67,2)	DC3000 (0,00) CC94 (0,08)
B-05	No identificada	<2,5	CC94 (0,23)	B (26,9) P (76,9) A (63,9)	DC3000 (0,04) CC94 (0,03)
MRQ-11	<i>Ectocarpus confervoides</i>	<2,5	--	--	--
MRQ-12	<i>Ahnfeltiopsis sp.</i>	<2,5	--	--	--
MRQ-13	<i>Rhodymenia sp.</i>	<2,5	--	--	--
MRQ-14	<i>Plocamium sp.</i>	<2,5	--	--	--
Control +	Cloruro de benzalconio	10 mg	DC3000 (1,16) CC94 (1,14) B (1,37) P (1,07) A (1,63)	B (97,8) P (97,0) A (87,0)	DC3000 (0,01) CC94 (0,00)

De esta tabla se seleccionan las algas con mayor actividad para continuar los ensayos y determinar las concentraciones efectivas, a partir de estos resultados se seleccionó los extractos de las algas: *Pyropia* sp., *Lessonia* sp. , *Macrocystis* sp., *Chondrachantus* sp. , *Grateloupia* sp. *Ulva* sp. y *Mazzaella laminarioides*.

A los extractos de las algas seleccionadas se determinó las concentraciones efectivas EC50 y EC90 sobre la germinación de conidias (Tabla 5) y el crecimiento micelial (Tabla 6) de *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., y *Aspergillus* sp.

Tabla 5. bValores de EC50 y EC90 expresados en mg/ml de extractos algales sobre la germinación de conidias

Alga	<i>Botrytiscinerea</i>		<i>Aspergillus</i> spp.		<i>Penicillium</i> spp.	
	EC50	EC90	EC50	EC90	EC50	EC90
<i>Pyropia</i> sp.	1,517	66,119	0,011	2×10^{-11}	0,066	319,175
<i>Lessonia</i> sp.	1,259	368,957	12,16	15.758	41,601	$9,2 \times 10^{-9}$
<i>Macrocystis</i> sp.	1,402	23,810	4,623	58,91	0,0592	776,944
<i>Chondrachantus</i> sp.	8,735	911.877	2×10^{-7}	$1,310^{22}$	0,066	319,175
<i>Grateloupia</i> sp.	8,555	659,958	0,675	0,261	2,025	8,320
<i>Ulva</i> sp.	0,566	45,109	1,486	50,768	0,268	48,323
<i>Mazzaella</i> sp.	0,269	26,631	2,591	22,952	0,017	6.450.475

de los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.

Tabla 6. Valores de EC50 y EC90 expresados en mg/ml de extractos algales sobre el crecimiento micelial de los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. Sigla N.I representa la ausencia de inhibición.

Alga	<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Aspergillus</i> spp.		<i>Penicillium</i> spp.	
	EC50	EC90	EC50	EC90	EC50	EC90
<i>Pyropia</i> sp.	7,594	27,225	4,431	15,109	9,677	52,374
<i>Lessonia</i> sp.	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I
<i>Macrocystis</i> sp.	5,088	20,076	6,030	910,16	04,885	19,156
<i>Chondrachantus</i> sp.	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I
<i>Grateloupia</i> sp.	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I	N.I
<i>Ulva</i> sp.	5,348	23,555	3,695	15,750	5,615	16,207
<i>Mazzaella</i> sp.	8,758	84,199	5,650	54,8	6,840	21,8

De las Tablas 5 y 6 se desprende que las concentraciones efectivas para inhibir el crecimiento micelial son mucho mayores que para inhibir la germinación de conidias en todos los casos, debido a cuando el hongo ya se ha desarrollado es mucho más difícil erradicarlo, por lo tanto en general el uso de desinfectantes ambientales está enfocado en prevenir el crecimiento de los patógenos, por lo que es más importante inhibir la germinación de conidias.

Además se observa que las concentraciones EC 90 son altas concentraciones e imposibles de usar en la práctica, por lo que se recomienda usar como referencia las concentraciones EC50.

Tanto en la inhibición de crecimiento micelial, como en la germinación de conidias los extractos algales con concentraciones EC50 más bajas corresponden a los extractos de *Ulva* sp., *Mazzaella laminarioides* y *Pyropia* sp.

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

Al realizar la evaluación de la actividad de los extractos sobre la formación de biopelículas de *P. syringae* (Figura 2) se observa inhibición de bacterias suspendidas y en biopelículas de los extractos MRQ-04 de *Grateloupia* sp, MRQ-05 de *Mazzaella laminarioides*, MRQ-07 de *Chondracanthus chamissoi*, MRQ-10 *Macrocystis pyrifera*, B-02 de *Pyropia* sp. y B-04 de *Lessonia* sp. en las 2 cepas de *Pseudomonas syringae* evaluadas (fig. 2).

Los controles negativos con solvente y medio de cultivo no presentan actividad inhibitoria, descartando algún efecto del solvente, además el control positivo de Cloruro de benzalconio presentó una fuerte inhibición de la biopelícula y células plantónicas.

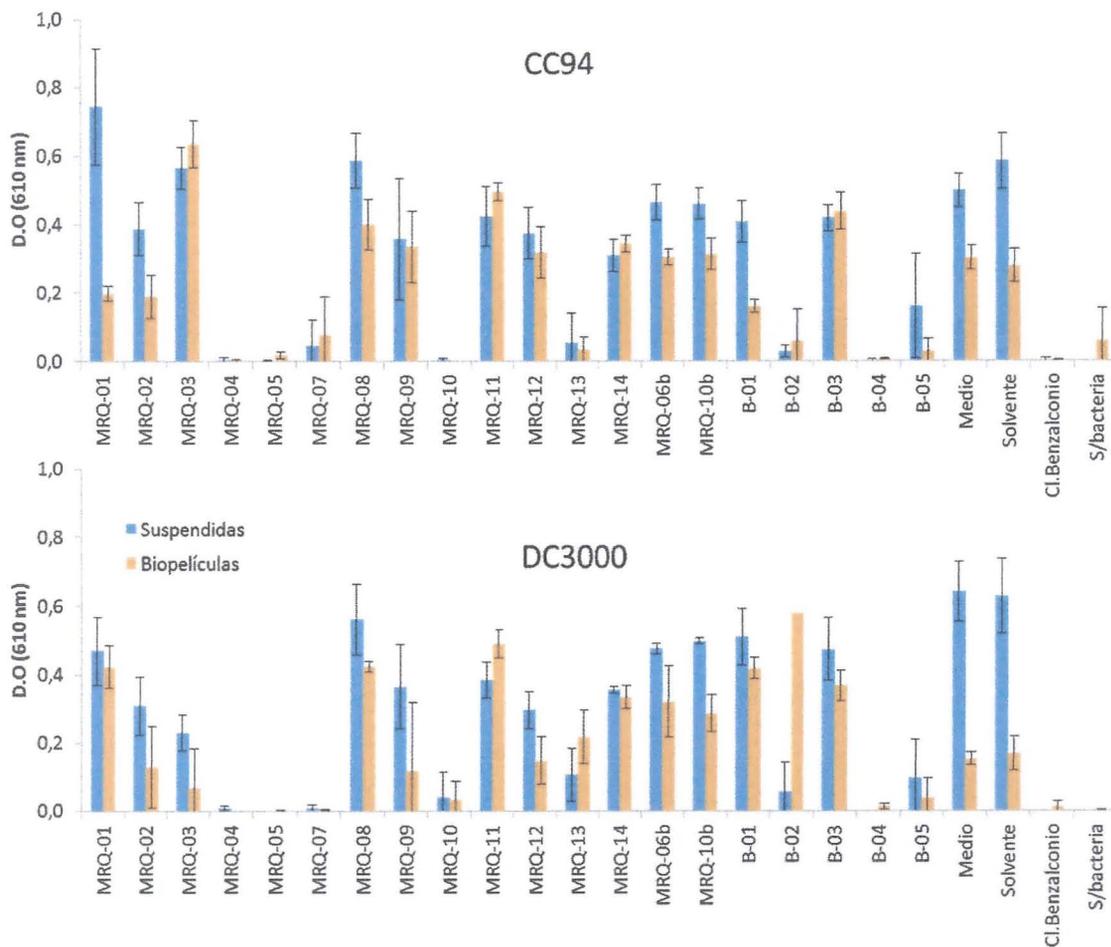


Fig. 2. Efecto de los extractos algales sobre la formación de biopelículas y crecimiento de bacterias en suspensión de las cepas CC94 y DC3000 de *Pseudomonas syringae*. Se midió la densidad del cultivo mediante espectrofotometría. Como Control positivo se usó 0.5% (p/v) de Cloruro de benzalconio CB, como controles negativos se usó el medio de cultivo (TSB) y el solvente del extracto, para descartar algún efecto del solvente. El control sin bacteria se usó como control interno indicativo de contaminación bacteriana. Las barras indican desviación estándar. Todos los ensayos se realizaron en cuadruplicado.

Al realizar el análisis del factor SBF a estos datos (Fig. 3) se observa que la mayoría de los extractos tienen un SFB < 1, no reflejando el efecto inhibitorio observado en la figura 2, por lo que se analiza el porcentaje de inhibición del crecimiento con respecto al control con medio de cultivo sin extracto de algunos de los extractos preseleccionados (Tabla 7). Del cual se desprende que los extractos de *Ulva* sp., *Lessonia* sp. y *Pyropia* sp. reducen sobre un 90% el crecimiento de biopelículas y células planctónicas de *Pseudomonas syringae*.

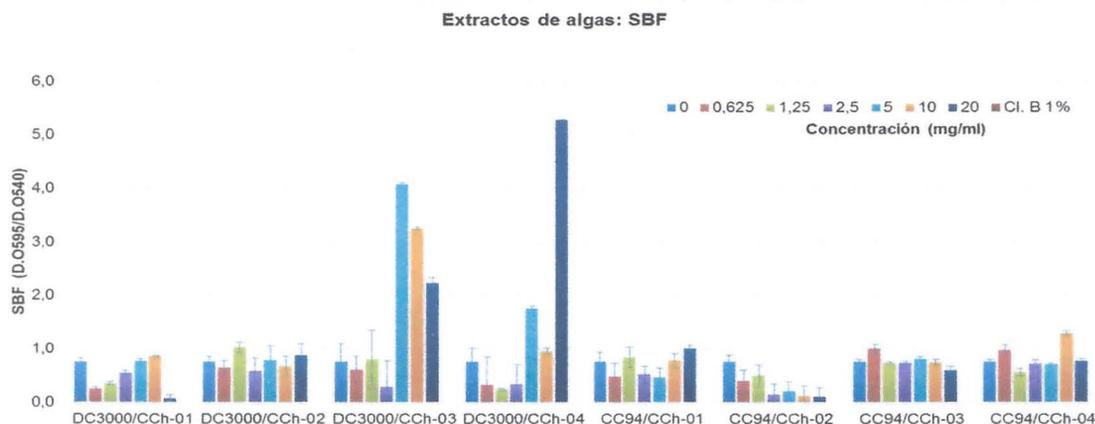


Figura 3.- Efecto de extractos de algas de *Ulva* sp. (CCh-01), *Pyropia* sp. (CCh-02), *Mazzaella laminariodes* (CCh-03) y *Lessonia* sp. (CCh-04) sobre el crecimiento de *Pseudomonas syringae* (DC3000 y CC94) sobre la formación específica de biopelículas (C)

Tabla 7. Disminución del crecimiento (%) de *Pseudomonas syringae* (cepas CC94 y DC3000) frente a extractos de algas. La disminución fue calculada usando Control de crecimiento sin extractos y exposición a 20 mg/ml de extracto algal

		BIOPELUCULAS	PLANCTONICAS
DC3000	CCh-01 <i>Ulva</i> sp	98,0	85,8
	CCh-02 <i>Pyropia</i> sp	47,7	54,8
	CCh-03 <i>Mazzaella laminariodes</i>	--	35,9
	CCh-04 <i>Lessonia</i> sp	63,9	94,9
CC94	CCh-01 <i>Ulva</i> sp	--	--
	CCh-02 <i>Pyropia</i> sp	90,2	24,0
	CCh-03 <i>Mazzaella laminariodes</i>	21,5	0,2
	CCh-04 <i>Lessonia</i> sp	34,5	35,6

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

Según los resultados del primer objetivo se seleccionó continuar con los análisis con los extractos de *Ulva* sp. y *Mazzaella laminariodes*

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

Se determinó los valores de IC50 de extractos de algas sobre neuroblastoma Neuro 2^a (Tabla 8). Observándose que las concentraciones más altas de IC 50 corresponden a los extractos de *ulva* sp., *Pyropia* sp., *Macrocystis pyrifera*, *Chondracanthus chamissoi* y *Grateloupia* sp, por lo tanto son

menos tóxicos, pese a esto las células de neuroblastoma de ratón sensibles a los extractos ensayados, ya que este cultivo celular se caracteriza por ser hipersensible a distintos stress.

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

Se determinó los valores de toxicidad aguda (LC50) con *Daphnia* de los extractos de *Ulva* sp. y *Mazzaella laminarioides* y se determinó toxicidad crónica (LOEC y NOEC) con *Daphnia* de la mezcla de 0,6 mg/ml de *Ulva* sp. y 2,6 mg/ml de *Mazzaella laminarioides* (Tabla 8), observándose que los valores de toxicidad aguda están sobre las concentraciones de usadas en el desinfectantes, por lo que no debiera tener efecto agudo. En cambio los valores de Ecotoxicidad Crónica, están por debajo de las concentraciones de desinfectante, pero dado el efecto crónico son concentraciones que se debieran alcanzar en el ambiente, dado la nebulización del desinfectante produce una dilución significativa de este y se espera que sea inactivado por la luz.

Tabla 8. Evaluación de Citotoxicidad y ecotoxicidad de extractos algales.

Alga	Citotoxicidad IC50 (g/L)	Ecotoxicidad Aguda LC50 (g/L)	Ecotoxicidad Crónica LOEC (g/L)	Ecotoxicidad Crónica NOEC (g/L)
<i>Ulva sp</i>	0,128	3,54	0,312-0,625	0,312
<i>Pyropia sp</i>	0,821			
<i>Mazzaella laminarioides</i>	0,089	14,4	0,312-0,625	0,312
<i>Macrocystis pyrifera</i>	0,16			
<i>Durvillaea antarctica</i>	0,075			
<i>Ahnfeltiopsis sp.</i>	0,084			
<i>Chondracanthus chamissoi</i>	> 0,36			
<i>Grateloupia sp</i>	> 0,36			

LC50: Concentración del extracto que produce un 50 % de mortalidad de los organismos

NOEC : Concentración mas alta del extracto que no causa un efecto significativo en el número de descendencia por hembra con respecto al grupo control.

LOEC : Concentración mas baja del extracto que causa un efecto significativo en el número de descendencia por hembra con respecto al grupo control.

Objetivo 3: Desarrollar una formulación del desinfectante ambiental en base a extractos naturales activos

Actividad 3.2.- Determinación química de sus compuestos bioactivos

El desinfectante contiene una mezcla de extracto total de *Ulva* sp. y de *Mazzaella laminarioides*, el cual fue analizado por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y se obtuvo la caracterización química incluida en el anexo 1.

Se investigó la actividad antifúngica y los componentes químicos de macroalgas seleccionadas recolectadas en la costa de la Octava Región, Chile. El análisis GC / MS de algas *Ulva* sp y *Mazaell*

asp, indicó la existencia de diferentes componentes biológicamente activos. Los componentes químicos se identificaron utilizando el software de la base de datos espectral NIST 95 instalado en el GC-MS. El extracto metanólico de *Ulvasp* contiene 7 componentes principales que incluyen; éster metílico del ácido hexadecanoico(31,10%), Phytol (12,01%), éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (10,82%), 6,10,14-trimetil- 2-pentadecanona (3,99%), éster metílico del ácido 7-hexadecenoico (9,02%), éster metílico del ácido 10-Octadecenoico, (8,37%), metil 4,7,10,13-hexadecatetraenoate(7,18%), entre otros.

En el extracto metanólico de *Mazaell asp* se encuentran altos porcentajes de éster metílico de ácido hexadecanoico, (34,52%), ácido eicosapentaenoico (31,76%), éster metílico del ácido 11-octadecenoico(9,51%), éster metílico del ácido 9,12-octadecadienoico (6,09%), entre otros. Se ha informado que los componentes poseen actividad antimicrobiana que podría ser responsable del potencial antifúngico informado en el presente estudio. Sin embargo, sólo el extracto de *Ulva spse* observa la presencia de alcanos de cadena larga; 2-Metiltetracosano (0,10%), octacosano(0.09%), 8-metil-undeceno(0.07%), 2-metil tridecano (0.17%), 2-metil- octadecano(0.15%), 8-heptadecano(0.22%), lo que podría explicar diferencias en su actividad. A esto se suma la presencia de compuesto minoritarios como la desoxispergualina (0.06%) análogo de un antibiótico con efecto antitumoral como la spergualina (Takeuchi et al., 1981) , el ácido protocatecuico (0.22%) es un tipo de ácido fenólico de origen natural ampliamente distribuido. Este ácido posee similitud estructural con el ácido gálico, el ácido cafeico, el ácido vainílico y el ácido sirínico, que son compuestos antioxidantes bien conocidos(SahilKakkar and SouravhBais, 2014).Otro constituyente es el 2,4 di-ter-butilfenoleste compuesto fenólico muestra un amplio espectro de funciones biológicas que incluyen propiedades antifúngicas, antioxidantes y antitumorales (Kontham et al., 2015). Además es posible observar, la presencia de terpenos como el isopinocampheol (0.09%) que ha sido evaluado en el control de hongos postcosecha en diferentes cultivares de manzanas (Lopez-Reyes, et al, 2010) (). En el caso de *Mazaellasp*. Los componentes minoritarios se distribuyen ente diferentes ésteres de ácidos grasos de cada larga saturados e insaturados; metil éster cis-9-del ácido hexadecanoico (3.07%),12 metil éster del ácido tetradecanoico(0.29%), metiltetradecanoate(2.36%), metil éster del ácido 9-ocatdecenoico (2.51%). Este tipo de compuestos indudablemente influye en el desarrollo de microorganismos alterando de cierta forma la membrana celular (G. Bergasson et al., 2011). Los ésteres de ácidos grasos presentes tanto en *Ulvasp*. Como en *Mazaella sp* tienen una amplia distribución en el medio terrestre como marino. En relación a estos se ha demostrado que los ácidos grasos con una longitud de cadena superior a 10 átomos de carbono inducen la lisis de protoplastos bacterianos (Soad et al., 2016) .

Muchas especies de macroalgas poseen componentes principales éster metílicos de ácido tetradecnoico, hexadecanoico y octadecanoico, con efecto antagonista frente a bacterias (Al-Saif et al., 2013; silva et al., 2013) (.En el caso de Phytolpresente en *Ulvasp* (12.01%) ha mostradoactividadantimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis* y *Staphylococcus aureus* (Rajab et al 1998; Saikia et al., 2010; Inoue et al. 2005).

También en *Ulva* el escualeno (0.64%) es un triterpeno intermediario en la biosíntesis del colesterol, su uso se ha orientado hacia uso cosmético y de cuidados médicos. Esto en razón de que dentro de un amplio espectrode funciones biológicas, está incluida la prevención del deterioro celular (Zhao et al., 2004; Xu et al, 2005) Probablemente, las clases de compuestos presentes con diferentes características estructurales, lipo e hidrosolubles y efectos biológicos diversosactúan con efecto sinérgico dentro de la formulación propuesta.

Se puede concluir que las algas marinas estudiadas (*Ulva sp* y *Mazaellasp*)son una rica fuente de metabolitos biológicamente activos. Tanto los metabolitos secundarios o primarios (ej. polisacáridos como el agar, ácido algínico, laminarina, fucoidina, galactanos, carragenanos, xilanos y mananos)producidos por estas macroalgas pueden ser compuestos de potencial interés en la industria farmacéutica y también de uso medicinal como queda demostrado por los numerosos artículos en los

que se hace referencia a estos constituyentes. La presente investigación presenta datos concordantes a los reportados sobre los componentes fitoquímicos y el potencial antibacteriano de los extractos de algas marinas para la obtención de formulaciones comerciales con poder antibiótico. Además, algunos de los compuestos bioactivos que se encuentran en las algas en estudio, poseen un efecto antioxidante que encuentra un campo de aplicación importante en la industria de los alimentos y productos farmacéuticos, dada su inocuidad (o baja toxicidad).

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

3.3.1. Selección de hongos obtenidos desde arándanos y cerezas mediante ensayos de agresividad

Para asegurar que el desinfectante formulado es eficaz contra patógenos agresivos, se evaluó la agresividad de los aislados obtenidos, determinando la incidencia de la pudrición y severidad en arándano y cerezas, para a partir de estos resultados seleccionar los aislados más agresivos para realizar el ensayo in vivo en cámara.

Se observa incidencia (figura 4) y severidad (figura 5) de la enfermedad causada en frutos de arándano por distintos aislados de hongos fitopatógenos.

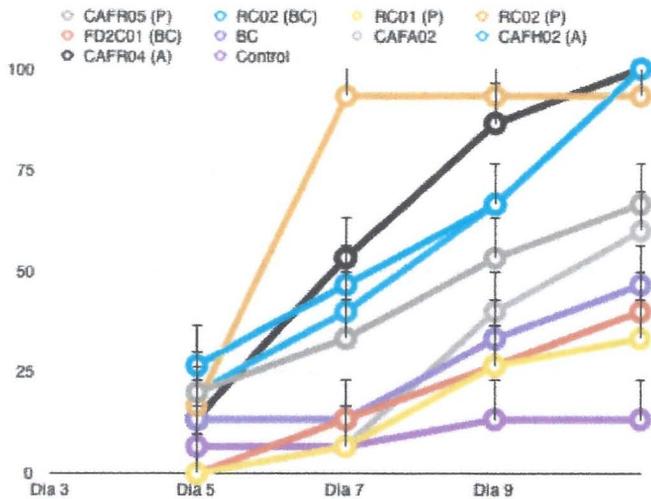


Figura 4: Incidencia de enfermedad causada en frutos de arándano por distintos aislados de hongos fitopatógenos: *Botrytis cinerea*(FD2-C01, BC, R-C02), *Aspergillus* spp.(CAF-A02, CAF-R04, CAF-H02), y *Penicillium* spp. (CAF-R05, E1-C01, R-C01) en cámara húmeda a 25°C. Resultados expresados en porcentaje (%).

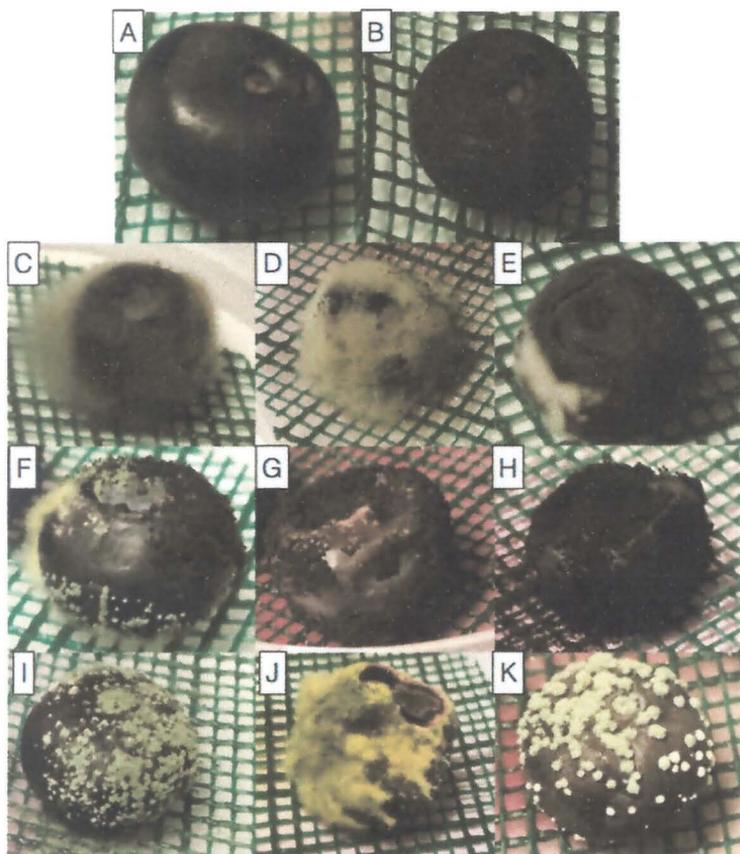


Figura 5 Severidad de pudrición y signos en frutos de arándanos a los 10 días de inoculación con fitopatógenos seleccionados. (A) Fruto al día 0, posterior a la inoculación, (B) Control con agua al cabo de 10 días, (C) *Botrytis cinerea* (FD2-CO1), (D) *B. cinerea* (BC), (E) *B. cinerea* (R-CO2), (F) *Aspergillus* sp. (CAF-A02) (G) *Aspergillus* sp. (CAF-R04) (H) *Aspergillus* sp. (CAF-H02) (I) *Penicillium* sp. (CAF-R05) (J) *Penicillium* sp. (E1-CO1) (K) *Penicillium* sp. (R-CO1)

Los hongos aislados desde diferentes ambientes de packing y/o restos frutales provocaron pudrición en los frutos utilizados en este estudio. En arándano, a los 7 días de aplicado el fitopatógeno se observa más del 90% de los frutos afectados (Figura 4). Los aislados de hongos que provocaron mayor pudrición fueron R-C02 (*B. cinerea*), CAF-A02 y CAF-H02 (*Aspergillus* sp.) y R-C01 (*Penicillium* sp.). A los diez días de ensayo, los frutos mostraban junto con la pudrición, los signos de los agentes inoculados (Figura 5).

Se observa incidencia (figura 6) y severidad (figura 7) de la enfermedad causada en frutos de cerezas por distintos aislados de hongos fitopatógenos.

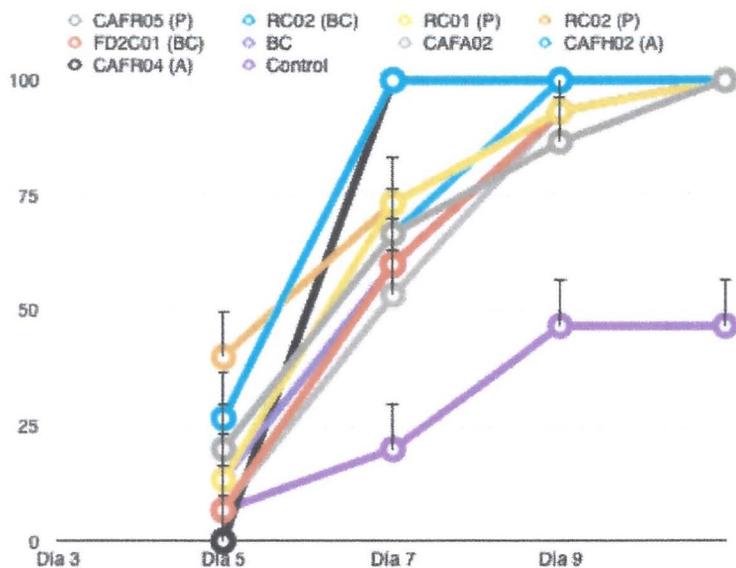


Figura 6: Incidencia de enfermedad causada en frutos de cereza por distintos aislados de hongos fitopatógenos: *Botrytis cinerea* (FD2-C01, BC, R-C02), *Aspergillus* spp. (CAF-A02, CAF-R04, CAF-H02), y *Penicillium* spp. (CAF-R05, E1-C01, R-C01) en cámara húmeda a 25°C. Resultados expresados en porcentaje (%).

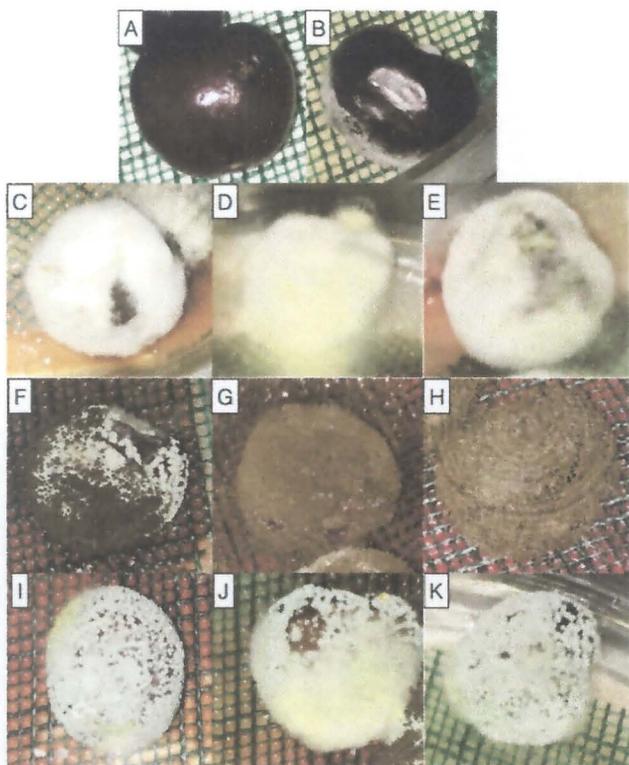


Figura 7. Síntomas de pudrición y signos en frutos de cereza a los 10 días de inoculación con fitopatógenos seleccionados. (A) Fruto al día 0, posterior a la inoculación, (B) Control con agua al cabo de 10 días, ((C)

Botrytis cinerea(FD2-CO1), (D) *B.cinerea*(BC), (E) *B.cinerea*(R-CO2), (F) *Aspergillus* sp. (CAF-A02) (G) *Aspergillus* sp. (CAF-R04) (H)

En cereza, se observó un avance de daño producido por los hongos de forma similar a lo que ocurre en arándanos, a los 7 días de inoculado el fitopatógeno se observa más del 90% de frutos dañados y a los 9 días un 100% (Figura 6). Todos los hongos probados en este estudio (FD2-C01, BC, R-C02, CAF-A02, CAF-R04, CAF-H02, CAF-R05, E1-C01 y R-C01) fueron efectivos en producir daño en el cerezo. La Figura 7 presenta imágenes de los frutos a 10 días de exposición a los hongos.

A partir de estos resultados se seleccionó los siguientes aislados de *B. cinerea*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp en mezcla para el siguiente ensayo:

- *Botrytis cinerea* aislado BC + RCO2
- *Penicillium* aislado CAFRO5 + RC01
- *Aspergillus* aislados CAFRO4 + CAFH02

3.3.2.-Ensayos de inhibición de enfermedad por fitopatógenos *B. cinerea*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp en frutos:

Se evaluó incidencia y severidad de la enfermedad causada por los patógenos *B. cinerea*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp a 4°C y 25° C en arándano, cereza y uva, tratados con extractos de *Ulva* sp., *Mazzaella* sp. y la mezcla de *ulva* sp + *Mazzaella* sp., usando como control negativo agua y como control positivo un desinfectante comercial que contiene Cloruro de benzalconio.

Se encontró que en general los resultados de severidad fueron similares a los de incidencia por lo que no se presentarán los resultados de severidad en este informe, ya que se encuentran in extenso en el informe 5.

Se observa que en general a 25°C los extractos pierden efectividad (figura 8), dado que a esta temperatura se favorece el crecimiento de los hongos, a 4°C los *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp son más sensibles a los extractos, que *B. cinerea*, en todos los casos a 4°C los extractos ya sea solos o en mezcla inhiben la pudrición de arándano (figura 8). Dado que El arándano en postcosecha se mantiene en cadena de frío los extractos de algas a esta temperatura controlan la pudrición del fruto.

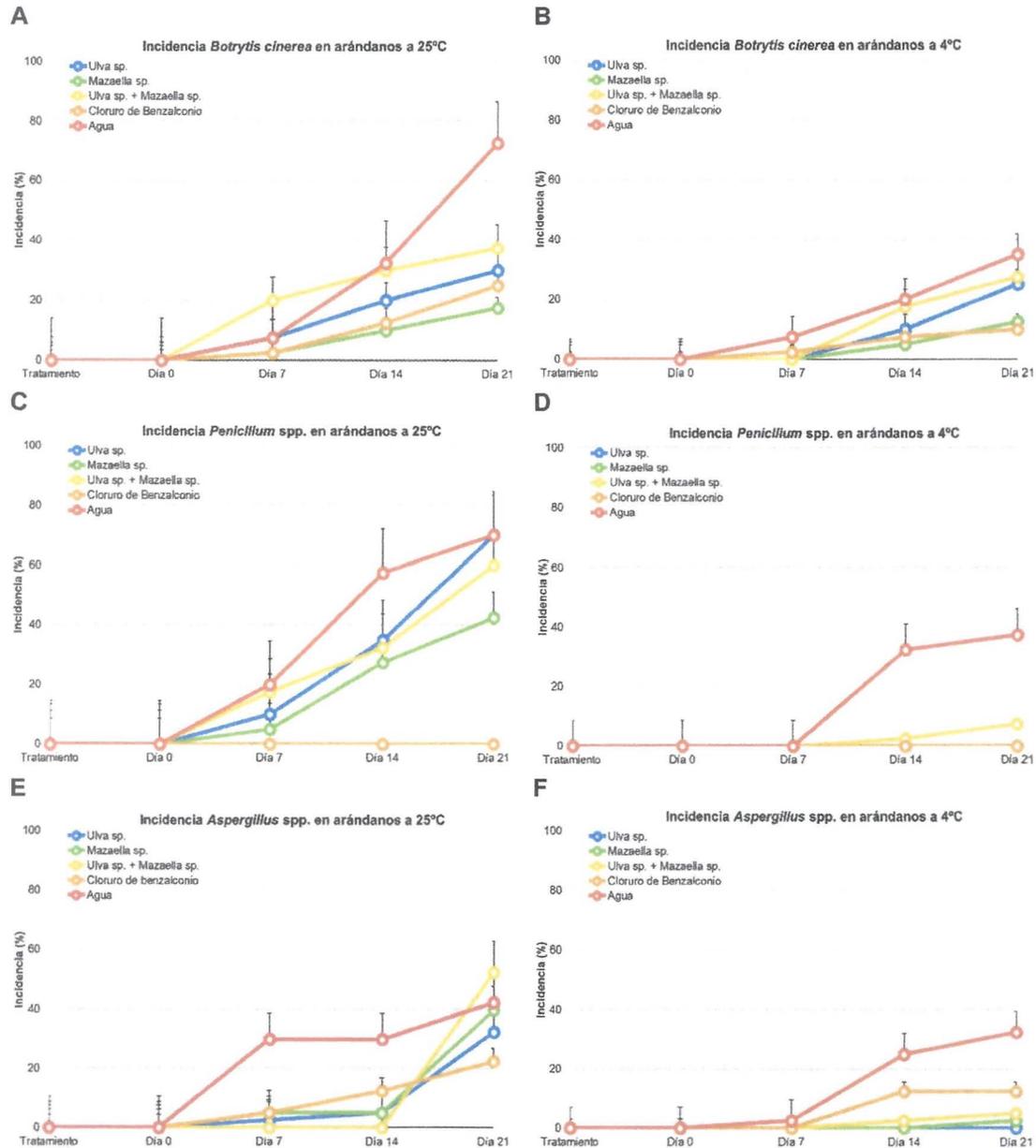


Figura 8. Incidencia de la enfermedad causada por *B. cinerea*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp en arándanos. Los frutos fueron asperjados con extractos de las algas *Ulvasp.* 0,6 mg/ml (azul), *Mazzaellasp.* 2,6 mg/ml (verde), y la combinación de *Ulvasp.* + *Mazzaellasp.* (amarillo), agua estéril (rojo) y cloruro de benzalconio 1% (naranja). Los frutos fueron incubados por 21 días a 25°C y 4°C.

En uvas se observan efectos de los extractos similares a los observados en arándanos referente al efecto de la temperatura en control de la pudrición. En el caso de frutos inoculados con *B. cinerea*, a 4°C, todos los extractos algales redujeron la incidencia de la pudrición (Figura 9), A 25°C, solo el desinfectante cloruro de benzalconio tuvo efecto de control sobre la pudrición causada por el patógeno.

Los extractos de las algas redujeron la incidencia de *Penicillium* sp. a ambas temperaturas. A los 25°C, todos los extractos redujeron la incidencia y fueron estadísticamente iguales al control positivo (Figura 9), mientras que a 4°C, todos los extractos logran controlar la incidencia, sin embargo, ninguno alcanza los niveles de control del cloruro de benzalconio.

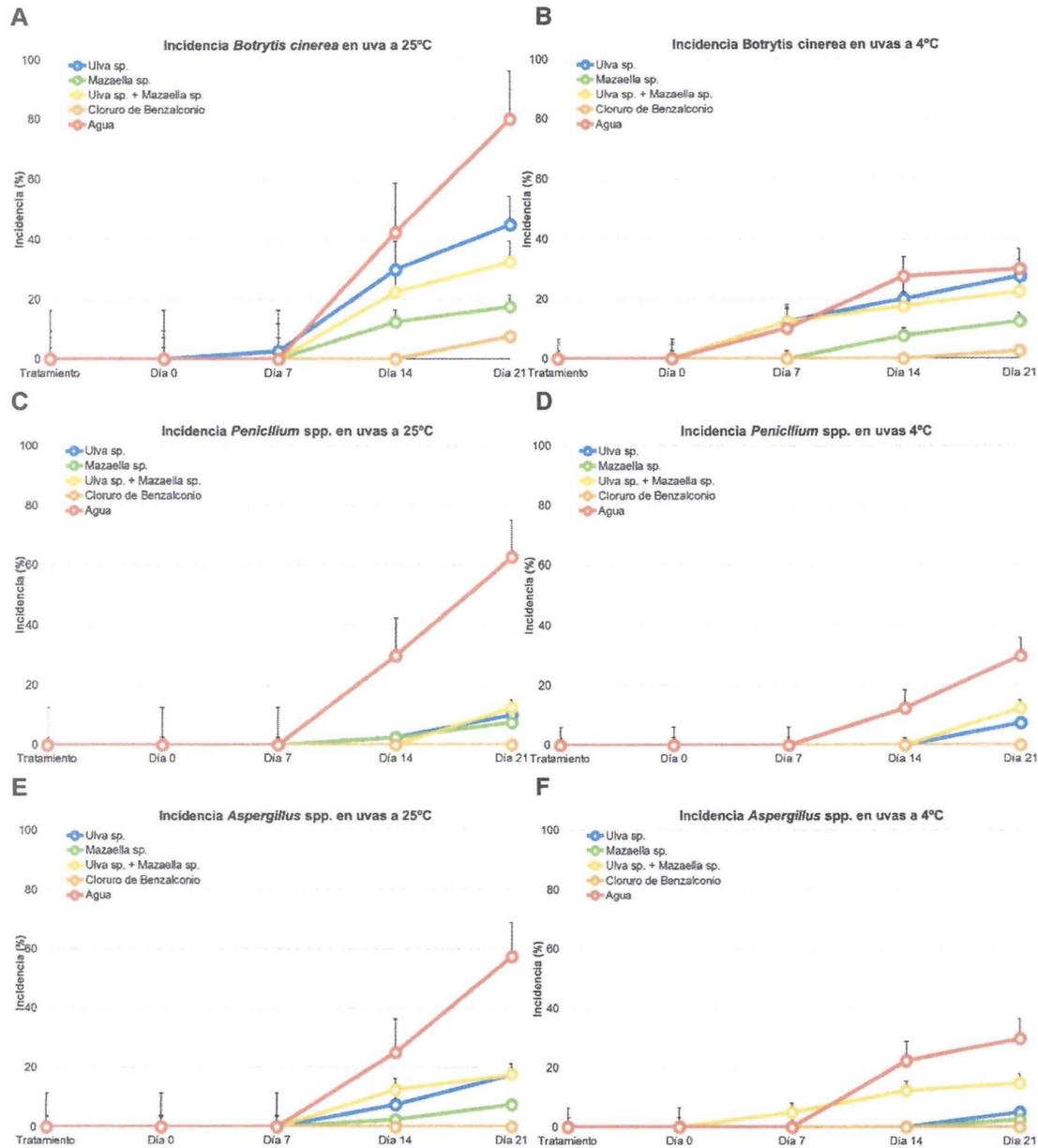


Figura 9. Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp, *Aspergillus* sp., enarándanos en uva. Los frutos fueron asperjados con extractos de las algas *Ulva* sp. 0,6 mg/ml (azul), *Mazzaella* sp. 2,6 mg/ml (verde), y la combinación de *Ulva* sp. + *Mazzaella* sp. (amarillo), agua estéril (rojo) y cloruro de benzalconio 1% (naranja). Los frutos fueron incubados por 21 días a 25°C y 4°C.

Para cereza se muestra la Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp, *Aspergillus* sp. a 4°C (Figura 10), donde se muestra que para los 3 patógenos la mezcla de *Ulva* sp. + *Mazzaella* sp y *Mazzaella* sp produjo una disminución de la incidencia de la pudrición significativa. Nuevamente *Botrytis cinerea* es el hongo más difícil de controlar.

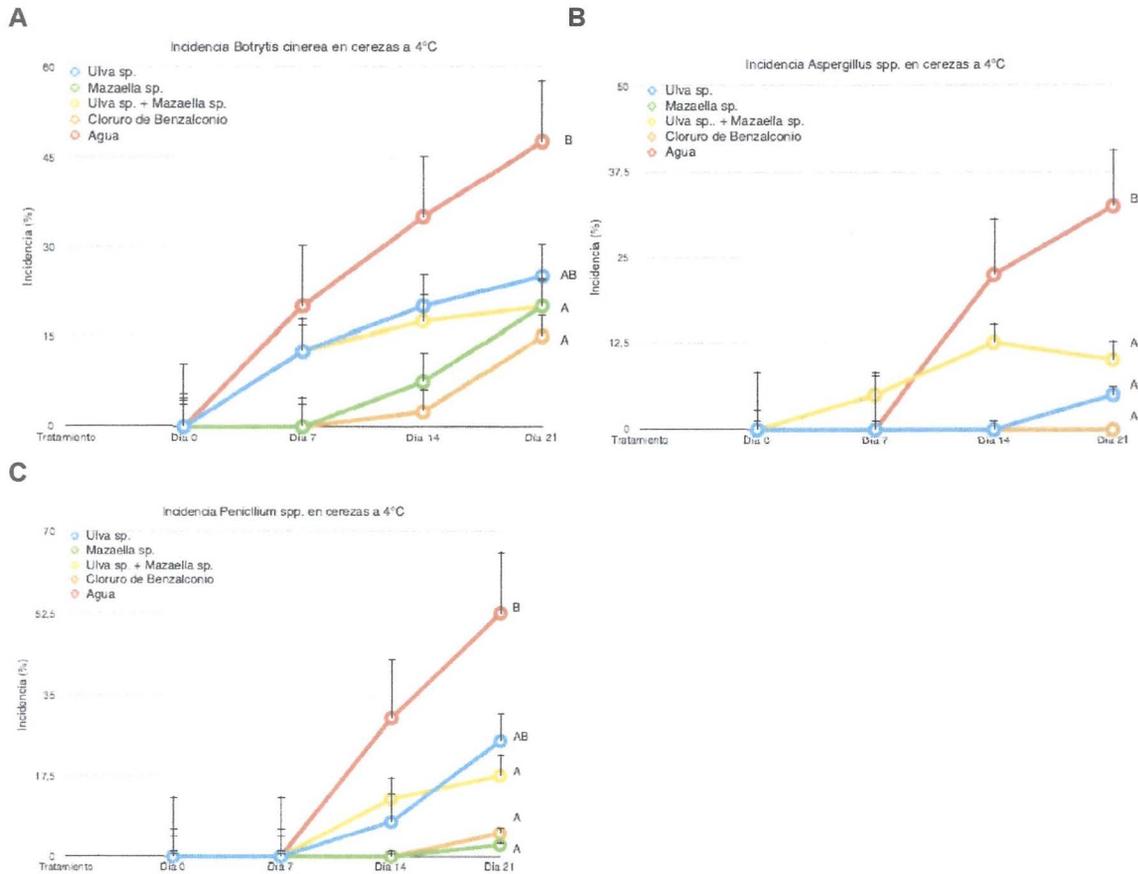


Figura 10. Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp., *Aspergillus* sp., en cerezas. Los frutos fueron asperjados con extractos de las algas *Ulva* sp. 0,6 mg/ml (azul), *Mazzaella* sp. 2,6 mg/ml (verde), y la combinación de *Ulva* sp. + *Mazzaella* sp. (amarillo), agua estéril (rojo) y cloruro de benzalconio 1% (naranja). Los frutos fueron incubados por 21 días a 4°C.

De estos resultados se concluye que los extractos de algas controlan la pudrición de arandano, cereza y uva a 4°C, siendo los más eficaces en general el extracto de *Mazzaella* sp y la mezcla de extractos de *Ulva* sp. + *Mazzaella* sp, considerando que el desinfectante natural sea innovador y tenga posibilidad de controlar a través de distintos mecanismos de acción se formula el desinfectante con mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp.

Actividad 3.5. Análisis de duración mínima del producto:

Se realizó la evaluación de la actividad del extracto de *Ulva* sp. + *Mazzaella* sp, en el tiempo, evaluando incidencia de pudrición por *Botrytis cinerea* en arandano a 4°C (figura 11) se obtuvo que la Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* se mantuvo en un rango de 20 a 31 %, no encontrándose diferencias significativas durante el tiempo evaluado, de esta forma el extracto de *Ulva* sp. + *Mazzaella* sp mantuvo su actividad controladora de la pudrición en fruta durante el periodo de evaluación (6 meses).

En paralelo se sembró extracto en medio de cultivo, para evaluar biodegradabilidad del extracto cuantificando el crecimiento de microorganismos en el extracto y no hubo crecimiento, manteniéndose el extracto sin crecimiento microbiano, por lo tanto no fue biodegradado durante el periodo de evaluación (6 meses).

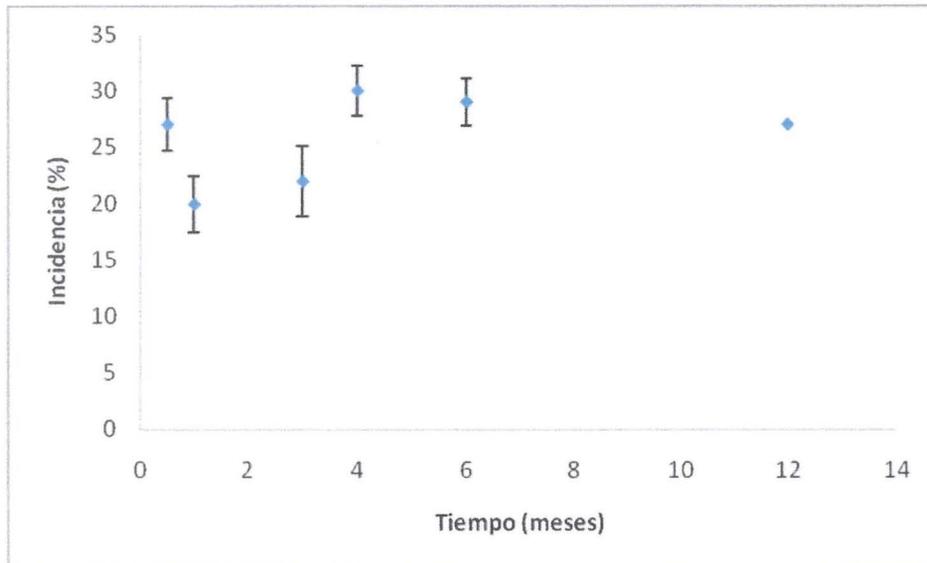


Figura 11. Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en arándano tratadas con la mezcla de extracto de *Ulva* sp. (0,6 mg/ml) y *Mazzaella* sp. (2,6 mg/ml) a 4°C.

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.):

Se midió la carga ambiental antes y después de aplicar el desinfectante formulado con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., con el equipo nebulizador móvil Hurricane Ultra de DYNA – fog en 4 salas de un Packing de la VIII región del Biobío, las salas : Cámaras de descarte a 4°C, pasillo y 2 cámaras de producto final a 4°C, en la figura 12 se muestra la carga ambiental antes y después de la aplicación del desinfectante ambiental por nebulización, donde se observa que la disminución de la carga microbiana alcanza un 84%, esta disminución de la carga bacteriana es acorde a la obtenida con desinfectantes comerciales. Además se observa que los recuentos microbianos después del desinfectante dependen de la carga microbiana original, es así que en la sala de descarte que una alta contaminación microbiana luego de la desinfección no se alcanzan recuentos menores a 200UFC/m³, a diferencia de las cámaras de producto final que se mantienen con cargas bajas de microorganismos. Se debe destacar que la nebulización que se realizó en la sala de descarte fue en presencia de fruta, permitiendo el funcionamiento normal del packig.

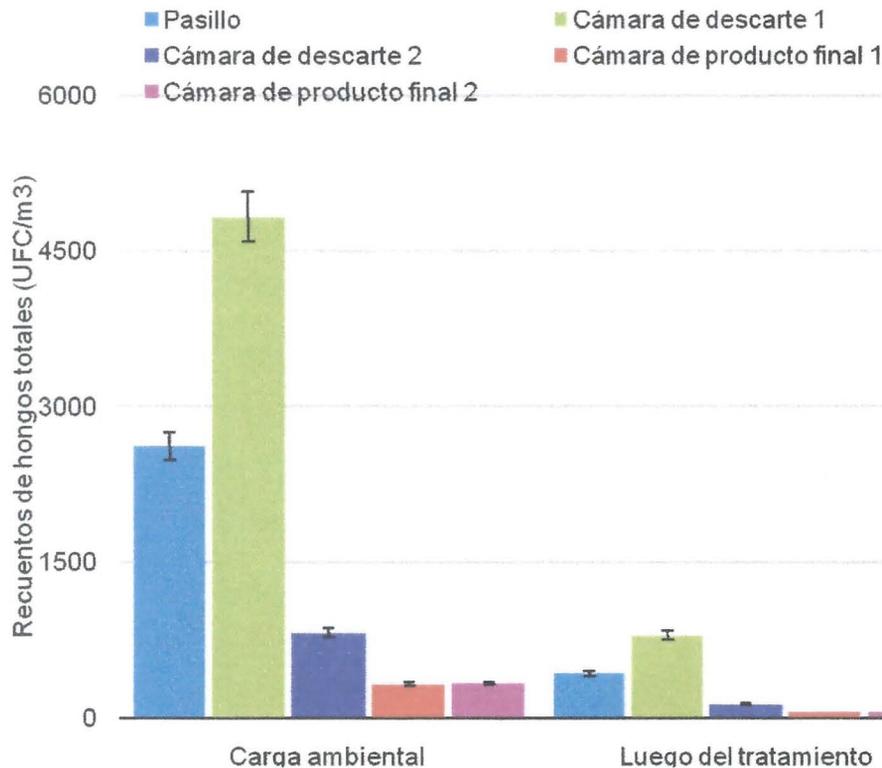
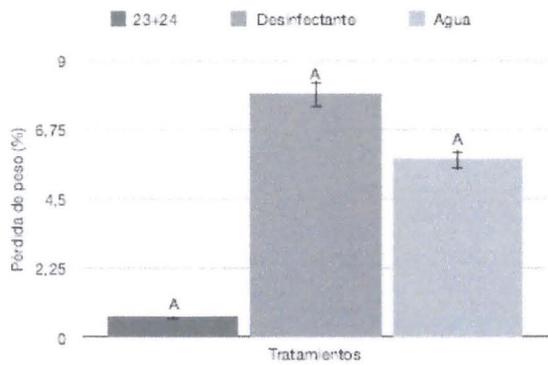


Figura 12. Recuento de hongos antes (carga ambiental) y después (luego de tratamiento) de la aplicación del desinfectante con la mezcla de extracto de *Ulva* sp. (0,6 mg/ml) y *Mazzaella* sp. (2,6 mg/ml) en distintas salas de packing..

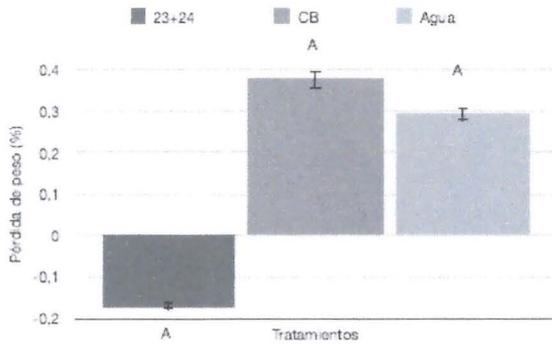
4.3 Análisis de las características organolépticas de los frutos.

El Análisis de las características organolépticas de arandano, cereza y uva expuesta al desinfectante desarrollado, muestra que cuando se evaluó la pérdida de peso (Figura 13) las 3 frutas expuestas a la nebulización con desinfectante en base a extractos de algas perdieron menos peso que el control agua, lo que se manifiesta con mayor énfasis en arándano y cereza que incluso ganan peso, aunque las diferencias no son significativas, indicando que no se altera la pérdida de peso de los frutos. Cuando se analiza la acidez titulable de las frutas expuestas a la nebulización con desinfectante en base a extractos de algas (Figura 14) no se observan diferencias significativas con el control agua, indicando que no se altera la acidez de los frutos.

A. Uva



B. Cereza



C. Arándano

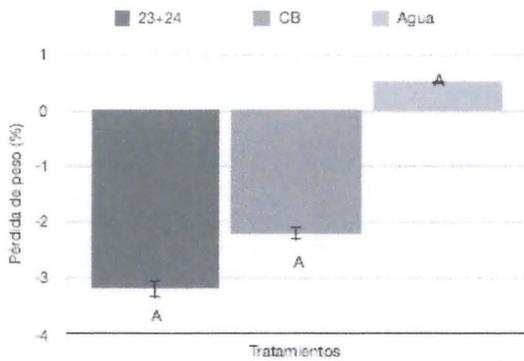
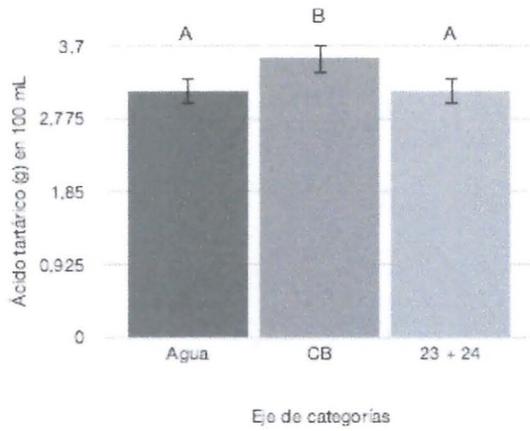
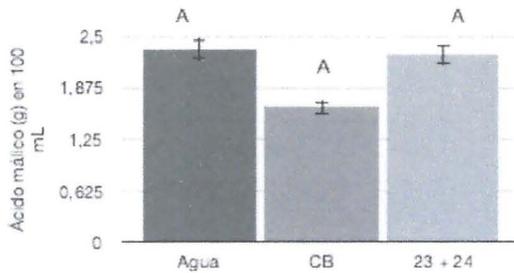


Figura 13. Pérdida de peso en uva en A, cereza en B y arandano C expuestas al Desinfectante ambiental con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., 23 + 24 corresponde a tratamiento con desinfectante ambiental, CB a tratamiento con desinfectante comercial en base a Cloruro de benzalconio y control con agua

A. Uva



B. Cereza



C. Arándano

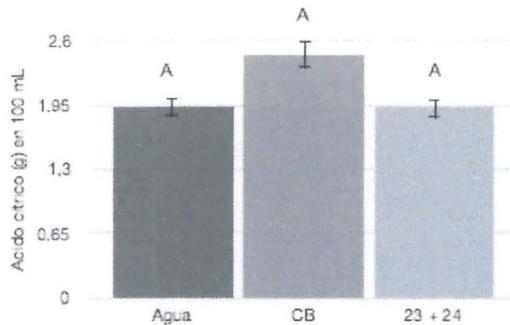
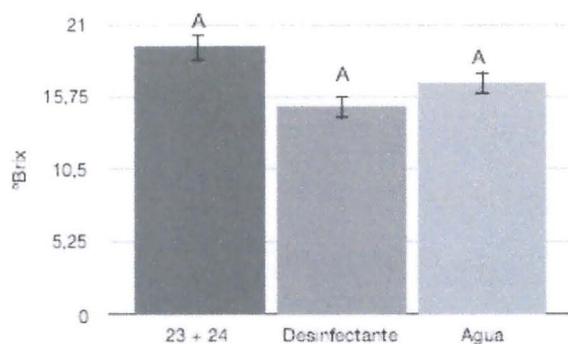


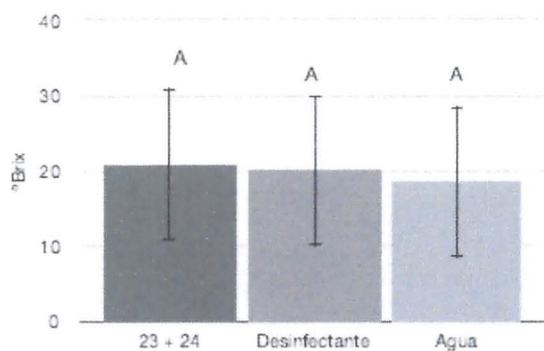
Figura 14. Acidez Titulable de uva en A, cereza en B y arandano C expuestas al Desinfectante ambiental con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., 23 + 24 corresponde a tratamiento con desinfectante ambiental, CB a tratamiento con desinfectante comercial en base a Cloruro de benzalconio y control con agua

Al analizar los ácidos solubles de las frutas expuestas a la nebulización con desinfectante en base a extractos de algas (Figura 15) no se observan diferencias significativas con el control agua, indicando que no se altera los ácidos solubles de los frutos

A. Uva



B. Cereza



C. Arándano

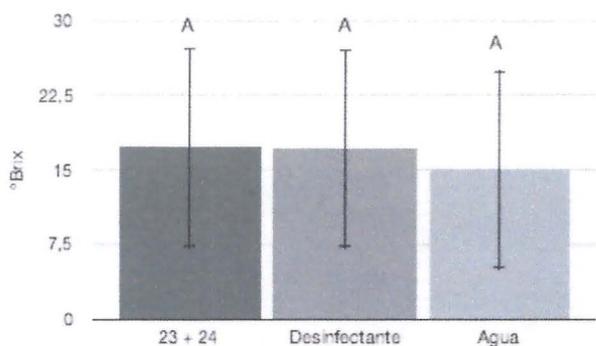
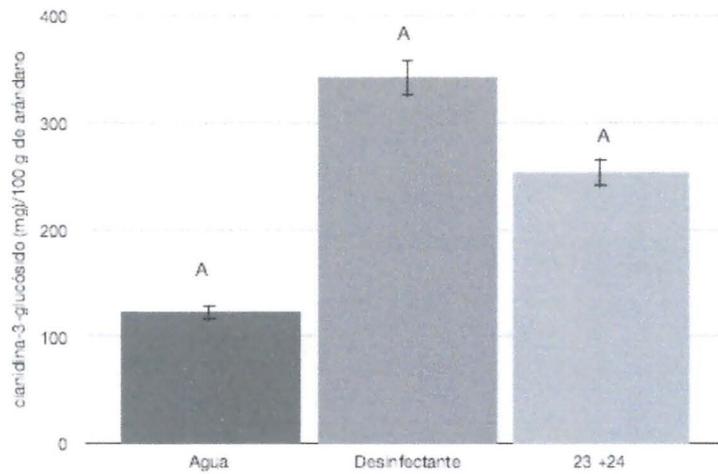


Figura 15. Sólidos solubles de uva en A, cereza en B y arándano C expuestas al Desinfectante ambiental con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., 23 + 24 corresponde a tratamiento con desinfectante ambiental, CB a tratamiento con desinfectante comercial en base a Cloruro de benzalconio y control con agua

Cuando se analiza las antocianinas de las frutas expuestas a la nebulización con desinfectante en base a extractos de algas (Figura 16) se observan aumenta la detección de antocianinas, pero las diferencias no son significativas con el control agua, indicando que no se altera las antocianinas de los frutos.

A. Cerezas



B. Arándanos

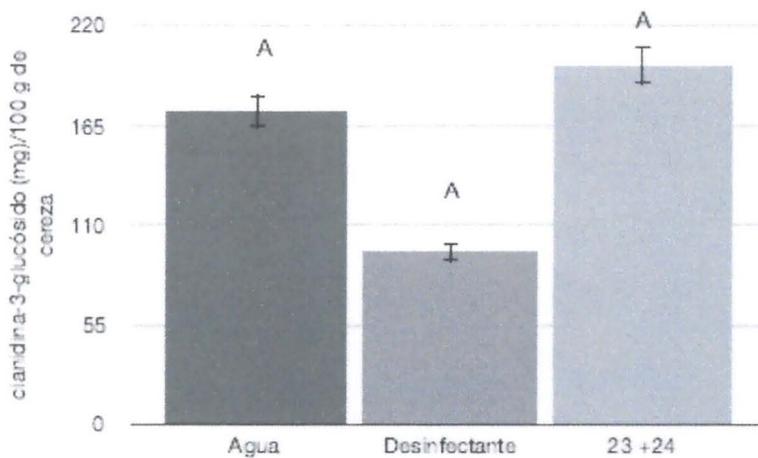
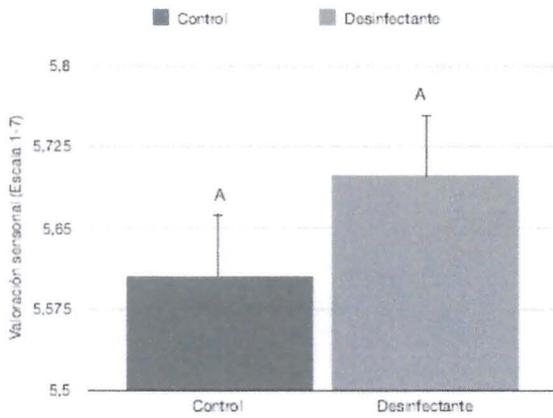


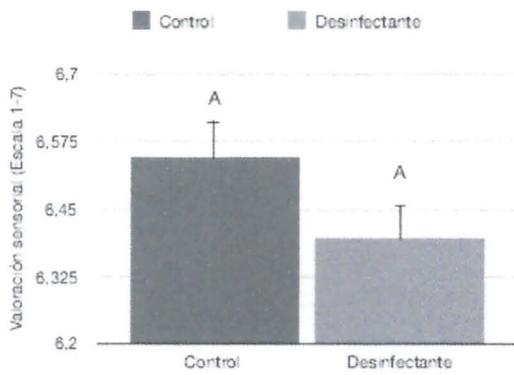
Figura 16. Antocianinas de cereza en A y arándano en B, expuestas al Desinfectante ambiental con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Ulva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., 23 + 24 corresponde a tratamiento con desinfectante ambiental, CB a tratamiento con desinfectante comercial en base a Cloruro de benzalconio y control con agua

Cuando se analiza el sabor de la fruta a través de una valoración sensorial otorgándole un puntaje a la percepción del sabor (de menos a más agradable) de las frutas expuestas a la nebulización con desinfectante en base a extractos de algas con respecto al control con agua (Figura 17) se observa que en arándano y uva la valoración sensorial de la fruta expuesta al desinfectante natural es mejor que el control agua, al contrario que en cereza, pero las diferencias no son significativas con el control agua, indicando que no se altera el sabor de los frutos.

A. Uva



B. Cereza



C. Arándano

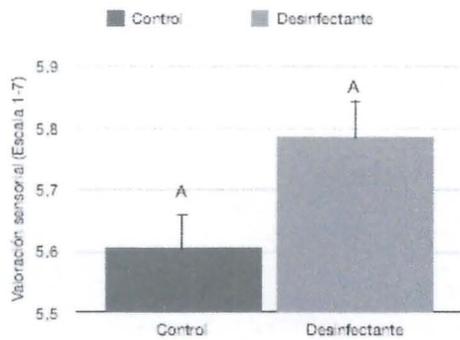


Figura 17. Valoración de sabor de uva en A, cereza en B y arándano C expuestas al Desinfectante ambiental con la mezcla de 0,6 mg/ml extracto de *Uva* sp. + 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp., Desinfectante: corresponde a tratamiento con desinfectante ambiental, y Control: control con agua. La valoración es una escala de 1 a 7, que va de más desagradable a más agradable.

Actividad 5.1.- Difusión resultados y Organización Taller.

Se realizó difusión de los resultados a investigadores del área presentando 2 trabajos en un congreso nacional el año 2016 y 2 trabajos en un congreso internacional el año 2017 (se adjuntan los resúmenes en anexo 2).

El año 2016 se presentaron los siguientes trabajos en el XXXVIII Congreso chileno de microbiología, realizado en Valdivia- Chile , entre el 22 y 25 de noviembre de 2016:

- 1) Sossa K¹., Obreque M¹., Sauer A¹., Ruiz-Tagle N²., Sanfuentes E¹., Urrutia H³., Perez C⁴., Becerra J⁴., Astuya A⁵. Evaluación de la actividad antimicrobiana e inocuidad de extractos de macroalgas marinas del intermareal .
- 2) Obreque M., Ruiz-Tagle N., Bustos E., Pérez C., Becerra J., Urrutia H., Sossa K. Actividad antifouling de biopinturas basadas en extractos de algas marinas y sus bacterias epibiontes.

El año 2017 se presentaron los siguientes trabajos en el XIX Congreso latinoamericano de fitopatología, realizado en Termas de Chillán- Chile , entre el 2 y 5 de Octubre de 2017

- 1) "Actividad antimicrobiana e inocuidad de extractos de macroalgas marinas sobre *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*", de los autores Obreque M., Sauer A., Ruiz-Tagle N., Urrutia H., Pérez C., Becerra J., Astuya A., Sanfuentes E. y Sossa K. Trabajo por el cual se ingresará una patente este 2017. Modalidad Oral
- 2) "Control de la pudrición de frutos de arándanos y uvas causada por *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., y *Aspergillus* sp., con extractos de macroalgas litorales", de los autores Obreque M., Sauer A., Ruiz-Tagle N., Urrutia H., Pérez C., Becerra J., Astuya A., Sanfuentes E. y Sossa K. Modalidad Poster

Además se realizó el taller final titulado: Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing, el día 15 de Diciembre de 2017, en la ciudad de Chillán (se adjunta programa y material de difusión en anexo 2), se había programado repetir este Taller en la ciudad de Los Angeles, el día 18 de Diciembre de 2017, pero estaban inscritos 3 estudiantes de pregrado, por lo que se decidió suspender este Taller en Los Angeles, considerando los costos y movilización de todos expositores del taller.

Al Taller realizado en Chillán Asistieron 20 personas entre ellos

- 3 empresarios del área productores de fruta y packing, (Frutemu, CoolChile y Monejo Integrado de Plagas Ltda.
- 6 investigadores: 4 profesionales de INIA Quilamapu y 2 de la Universidad de Concepción.
- 6 estudiantes de pregrado de carreras como: Agronomía, Ingeniería en Biotecnología vegetal, Técnico en Biotecnología y Ingeniería en alimentos
- 5 estudiantes de Postgrado en Ciencias Agronómicas y Ciencias Forestales

Se adjunta Lista de participantes.

Actividad 5.2.- Protección de propiedad intelectual

Se realizó el ingreso de solicitud n° 03472-2017 de patente del producto "Una formulación de Desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria" 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 el día 29 de Diciembre de 2017 (se adjunta copia de la patente ingresada en el anexo 3).

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.

La evaluación económica de la producción del desinfectante ambiental natural en base a extractos de algas marinas se encuentra en el anexo 4, en este análisis se concluye que Para el proyecto, considerando una tasa de descuento del 12%, se obtiene un VAN igual a \$85.059.522. A partir de estos resultados se puede concluir que el proyecto debiera aceptarse. Para el proyecto, se obtiene una TIR igual a 43,88%. Al ser contrastados con una tasa de rendimiento del 12%, se puede concluir que el proyecto debiera aceptarse.

Dentro de esta actividad se ha realizado una prospección de posibles licenciatarios interesados, por lo que se adjunta un Reporte de Posibles Licenciatarios en el anexo 4, dentro de la cual se prospectaron 3 empresas:

- Ecombio SA, empresa asociada a este proyecto y que tiene preferencia
- OXIQUM S.A.
- Miguel Maritano Industria de Jabones S.A., quienes han manifestado interés en desarrollar un desinfectante ambiental

Dado que la empresa Asociada Ecombio SA ha manifestado su interés en licenciar el Desinfectante natural desarrollado en base a extractos de algas es que con el propósito de llevar a cabo el Hito Crítico 6 y su resultado esperado 7, los cuales hacen énfasis al desarrollo de "Modelo de negocios y comercialización de desinfectante ambiental diseñado, con un convenio de licenciamiento obtenido", es que "en Concepción, a 3 de enero de 2017", se ha llevado a cabo una "Opción de Licencia" entre la UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN y la empresa Asociada al proyecto ECOMBIO LIMITADA, en un período de seis (6) meses contados desde la fecha de suscripción del Acuerdo en mención (se adjunta "Opción de Licencia" en anexo anexo 4). En éste, se hace mención a que La UNIVERSIDAD se adjudicó como entidad Beneficiaria el Proyecto PYT-2015- 0127, del cual, con fecha 29 de diciembre de 2017 se presentó la solicitud de patente chilena número CL20170542. Dejando de manifiesto, que la EMPRESA está interesada en explotar comercialmente los derechos de patente señalados en anteriormente. Con esta "Opción de Licencia", se logra el objetivo de regular entre las Partes el derecho de la EMPRESA a ejercer una primera opción de licenciamiento, con carácter de exclusivo, de los Derechos de Patente. En particular, el Acuerdo en mención regulará los términos, plazo y condiciones bajo las cuales se materializará la Opción de Licenciamiento señalado.

Adicionalmente, se han realizado las gestiones concernientes a un "ACUERDO DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL", entre el PROVEEDOR:UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN y el RECEPTOR:VIDAL Y URRUTIA LIMITADA (se adjunta documento en anexo 4), donde se

establecen las facultades para "Proporcionar al RECEPTOR "Fórmula del PROVEEDOR", con el fin de fabricar un desinfectante ambiental para aplicaciones en contenedores de frutas, para lo cual, se autoriza su uso exclusivamente para el desarrollo y fabricación de estos productos, a partir extractos naturales, formulados por el PROVEEDOR". Cabe destacar que el presente Acuerdo habilitará al RECEPTOR para utilizar los resultados objeto de la transferencia de los "Materiales del PROVEEDOR". Además, se dejan en manifiesto las obligaciones y responsabilidades de ambas partes, en el desarrollo y utilización del "Desinfectante ambiental en base a extractos de algas para el control de Fito patógenos pos cosecha".

En conclusión, se han desarrollado gestiones que buscan el desarrollo del objetivo 5 y sus actividades comprometidas: "Obtener un producto competitivo "Desinfectante ambiental en base a extractos de algas para el control de Fito patógenos pos cosecha", de aplicación comercial y lograr la transferencia al sector de los resultados, desarrollo de un modelo de negocios y una estrategia de comercialización". Lo que permitiría de este modo, el desarrollo del Hito y Resultado mencionado anteriormente, además de la validación y Empaquetamiento del Producto.

5.2 Logro de Hitos. Se deberá hacer un completo y detallado análisis y reflexión en cuanto al avance, cumplimiento o eventual atraso del hito definido para el periodo. (ANÁLISIS DE BRECHA DE HITOS)

Los hitos críticos planteados originalmente corresponden a:

Hitos críticos ¹	Resultado Esperado ² (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	marzo 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 IC50>0,07 mg/L, LC50> 0,1 mg/L, NOEC > 0,056 mg/l	Noviembre de 2017
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%)	Julio de 2017
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 ²	Diciembre 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"	Diciembre 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)	Diciembre de 2017 Queda pendiente Opción de licencia para Mayo 2018

Con respecto al Hito crítico 1. Colección de extractos de algas con actividad fungicida y/o bactericida se logró en marzo de 2016, sólo la colección de extractos que inhiben *Botrytis cinerea* se logró en julio de 2016, ya que estandarizar la técnica para este hongo.

El Hito crítico 2. Rango de concentración de la dosis efectiva de extractos de macroalgas determinada y ecotoxicológicamente permitidos, se demoró porque hubo que estandarizar adecuadamente las concentraciones de extractos a probar y se priorizó realizar en análisis a los extractos seleccionados con mayos actividad y por lo tanto se debía contar con esos resultados, finalmente los análisis de ecotoxicidad sólo se realizaron para el desinfectante natural desarrollado, por lo que se pudo realizar sólo al final del proyecto.

El Hito crítico 3. Formulación de desinfectante ambiental con extractos naturales con ensayos *in vitro*, se obtuvo con los bioensayos en cámara, lo que se obtuvieron en julio de 2017, y sus resultados están incluidos en el informe n°5

El Hito crítico 4. Desinfectante ambiental a base de productos naturales contra patógenos agrícolas postcosecha que reduzca la pudrición en frutos, se obtuvo con la aplicación por

¹ 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.

² Un hito puede estar asociado a uno o más resultados esperados y/o a resultados intermedios.

nebulización en packing del desinfectante desarrollado en diciembre de 2017, debido a que se requería aplicar en fruta (arandano y cereza) las cuales son estacionales y se encuentran disponibles desde finales de octubre a marzo, se gestionó la extensión del proyecto hasta diciembre de 2017 para realizar este ensayo crítico para la realización de las actividades siguientes.

El Hito crítico 5. Solicitud de protección de propiedad intelectual ingresada, se alcanzó en diciembre de 2017, una vez que se tenían los ensayos de aplicación por nebulización en packing del desinfectante desarrollado.

El Hito crítico 6. Modelo de negocios y comercialización de desinfectante ambiental diseñado, está parcialmente cumplido ya que se cuenta con la evaluación económica de la comercialización de desinfectante, pero el proceso de licenciamiento del paquete tecnológico es lento, ya que requiere la negociación del acuerdo y la evaluación legal entre las partes. La empresa asociada tiene interés en la licencia de la tecnología por lo que se está tramitando un Acuerdo de Transferencia de Material y un Acuerdo de Opción de Licencia, que debiera estar listo en mayo de 2018.

Como se observa Se ha cumplido con los hitos planteados, sólo queda pendiente el convenio de licenciamiento.

5.3 Evaluación económica con y sin proyecto

La Evaluación económica con y sin proyecto se adjunta en el anexo 4. Este informe concluye que Al comparar los resultados obtenidos en las dos situaciones, se puede concluir que en las condiciones presentadas el uso de desinfectante a base de macroalgas es una mejor alternativa. Usando este desinfectante, ambos indicadores muestran una mejoría, en particular, el VAN mejora en \$1.076.963 (aumento del 45,3%) y la TIR mejora en 48,26% (aumento del 273,0%).

Esto se puede explicar ya que los aspectos positivos de esta opción (un mayor precio de producto y menores pérdidas) superan los aspectos negativos (disminuciones de venta y costo mayor de desinfectante). Esto induce a pensar, además, que los indicadores son más sensibles a las variaciones de precio que de los demás factores.

5.4 Análisis de impacto logrado a la fecha medido y diferenciando en al menos los siguientes aspectos: descripción y cuantificación de los impactos obtenidos, y estimación de lograr otros en el futuro, comparación con los esperados, y razones que explican las discrepancias; ventas y/o anuales (\$), nivel de empleo anual (JH), número de productores o unidades de negocio que pueden haberse replicado y generación de nuevas ventas y/o servicios; nuevos empleos generados por efecto del proyecto, nuevas capacidades o competencias científicas, técnicas y profesionales generadas.

21. INDICADORES DE IMPACTO						
Selección de indicador ³	Indicador	Descripción del indicador ⁴	Fórmula del indicador	Línea base del indicador ⁵	Meta del indicador al término de la propuesta ⁶	Meta del indicador a los 2 años de finalizado la propuesta ⁷
	Ventas		\$/año			
	Costos		\$/unidad			
	Empleo		Jornadas hombre/año			
Producto	Otro (especificar)	Desinfectante ambiental contra fitopatógenos postcosecha desarrollado	1/ proyecto	0	Desinfectante ambiental contra fitopatógenos postcosecha	Desinfectante ambiental comercial para la industria agroalimentaria
Taller de capacitación	Taller difusión	Taller sobre Transferencia de ecotecnologías naturales aplicadas al control de fitopatógenos poscosecha realizado	1/ proyecto	0	Taller sobre Transferencia de ecotecnologías naturales aplicadas al control de fitopatógenos poscosecha realizado	Difusión a través de capacitaciones sobre uso de desinfectante y buenas prácticas agrícolas
propiedad intelectual	Solicitud protección de propiedad intelectual	Solicitud de protección de propiedad intelectual "Desinfectante ambiental a base de extractos naturales para el control de fitopatógenos postcosecha"	1/ proyecto	0	Solicitud de protección de propiedad intelectual "Desinfectante ambiental a base de extractos naturales para el control de fitopatógenos postcosecha"	Solicitud de protección de propiedad intelectual "Desinfectante ambiental a base de extractos naturales para el control de fitopatógenos postcosecha"

³ Marque con una X, el o los indicadores a medir en la propuesta.

⁴ Señale para el indicador seleccionado, lo que específicamente se medirá en la propuesta.

⁵ Completar con el valor que tiene el indicador al inicio de la propuesta.

⁶ Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar, al final de la propuesta.

⁷ Completar con el valor del indicador, al cual se espera llegar, al cabo de 2 años de finalizado la propuesta.

El producto final de este proyecto corresponde a un desinfectante ambiental inocuo basado en compuestos de origen natural (extracto de las algas *Mazzaella laminaroides* y *Ulva* sp) para el control de fitopatógenos (hongos y bacterias) de postcosecha para aplicar en la industria agroalimentaria, el cual podrá ser usado directamente en ambientes de almacenamiento de frutos y/o en presencia de frutos, lo que facilita operación del packing en periodos de alta actividad (periodos de cosecha), ya que los desinfectantes químicos no se deben aplicar en presencia de fruta y por lo tanto se deben vaciar las salas, aplicar y luego volver a llenar, con la consiguiente pérdida de tiempo, esto dificulta la desinfección constante de las instalaciones, desencadenando en la extensión entre los tiempos de desinfección de los ambientes.

El desinfectante natural formulado requiere de 30 min de tiempo de aplicación, por lo que todo el proceso de desinfección toma aproximadamente 1 hora, sin alterar el funcionamiento normal de las instalaciones, facilitando la desinfección continua de los ambientes, pudiéndose aplicar cada 7 o 14 días, como se recomienda, para mantener las instalaciones sanitizadas

La formulación propuesta, su método de obtención y el uso, fueron protegidos mediante una solicitud de patente n° 03472-2017 y agrupados en un paquete tecnológico que se transferirá a través de una "opción de licencia" a la Empresa asociada ECOMBIO interesada en la producción y comercialización del desinfectante natural.

Otro impacto es el desarrollo del Taller de difusión final, denominado: "Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing" en la ciudad de Chillán el día 15 de diciembre de 2017, en el cual participaron 20 personas, incluyendo profesionales del rubro silvoagrícola, empresarios, estudiantes e investigadores, el cual abrió una amplia discusión hacia la necesidad de este tipo de productos del mercado, la amplia cantidad de herramientas biotecnológicas e innovación que requiere el desarrollo de estos productos.

En este contexto el proyecto se generó un aporte al desarrollo del conocimiento científico y a la formación de capacidades en materia de herramientas biotecnológicas para el desarrollo de un desinfectante ambiental efectivo para el control de fitopatógenos postcosecha, no tóxico y amigable con el ambiente, apoyando la realización de 3 unidades de investigación y una memoria de título de Ingeniería en Biotecnología ambiental y una tesis de Postgrado del Magister en ciencias forestales, como se detalla a continuación:

1- Unidad de Investigación de la estudiante de Ingeniería en Biotecnología ambiental, Daniela Riffo, titulada: "Caracterización fenotípica y genotípica (ITS, ADNr 18S) de fitopatógenos postcosecha en cerezas y arándanos". Finalizada en diciembre de 2016

2- Unidad de Investigación del estudiante de Ingeniería en Biotecnología ambiental, Alan Sauer: "Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de extractos algales sobre hongos fitopatógenos postcosecha de arándanos y cerezas". Finalizada en diciembre de 2016

3- Unidad de Investigación del estudiante de Ingeniería en Biotecnología ambiental, Gabriel Pulgar: "Optimización del efecto inhibitorio de microorganismos ambientales sobre fitopatógenos postcosecha". Finalizada en diciembre de 2016

4- Memoria de título del estudiante de Ingeniería en Biotecnología ambiental, Alan Sauer: "Evaluación de la inhibición de extractos algales sobre la enfermedad causada por *Botrytis cinerea*, *Penicillium* spp. y *Aspergillus* spp. Finalizada en diciembre de 2017.

5.- Tesis del programa de Postgrado de Magister en Ciencias Forestales de la Srta. Marjorie Obreque Espinoza, titulada: Evaluación de extractos de macroalgas provenientes de la región del Biobío en el control de la pudrición producida por *Botrytis cinerea*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. en frutos de arándano, cereza y uva. Realizada en el periodo enero 2016- Diciembre 2017.

El sector industrial será el principal beneficiado de los resultados finales del proyecto en especial los las empresas productoras de agroquímicos y las empresas de empaquetamiento, procesamiento, almacenaje y transporte de productos agrícolas tanto de la gran, mediana como pequeña empresa, teniendo la opción de aplicar el desinfectante natural en forma regular, de forma de mantener desinfectadas sus instalaciones, evitando la contaminación de la fruta y la consecuente pérdidas por pudrición de frutos..

Dentro de los principales beneficios de implementación de este proyecto, se tiene:

- Disminución de las pérdidas de productos agrícolas por enfermedades de postcosecha
- Mejoras sanitarias en las instalaciones de empresas empaquetadoras, procesadoras, almacenaje y transporte de productos agroalimentarios
- Nuevos lugares de trabajo: Contribuye a la generación de nuevos puestos de trabajo para mano de obra calificada y no calificada. Mejora la economía regional. El proyecto tiene el potencial de generar nuevas plazas de empleo, ayudando por lo tanto a disminuir la tasa de desempleo., la producción y comercialización del desinfectante natural por la Empresa ECOMBIO SA.
- Exportaciones: Eventualmente, con este producto se podrá generar las capacidades en la mediana y pequeña agricultura para incrementarán las exportaciones o abrir nuevos mercados, tanto nacionales como extranjeros, cuyos ingresos permanecerán en el país.
- Impacto social: Se producen efectos positivos indirectos como el mejoramiento de la calidad de vida (más trabajo, más ingreso regional), lo que a nivel nacional se traduce en un ahorro para las arcas fiscales.
- Innovación: La tecnología a desarrollar tiene un alto grado de innovación, ya que corresponde a la elaboración de un producto natural, no tóxico y con efectos positivos para la sanidad de productos silvoagrícolas en postcosecha, no disponible en el mercado en la actualidad.

5.5 Resultados e impactos

Los principales impactos de los resultados son el desarrollo del producto final de este proyecto correspondiente a un Desinfectante ambiental natural formulado en base a extractos algales (extracto de *Mazzaella laminaroides* y *Ulva* sp) que reduce la carga microbiana de ambientes, la pudrición postcosecha de frutos de arándanos, cerezas y uvas, y es inocuo, por lo que se puede aplicar en presencia de fruta, siendo una alternativa atractiva de los desinfectantes químicos, con una potencial aplicación en la agricultura orgánica.

La formulación propuesta, su método de obtención y el uso, fueron protegidos mediante una solicitud de patente n° 03472-2017 y agrupados en un paquete tecnológico que se transferirá a través de una “opción de licencia “ a la Empresa asociada ECOMBIO interesada en la producción y comercialización del desinfectante natural.

Otro impacto es el desarrollo del Taller de difusión final , denominado : “ Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing” en la ciudad de Chillán el día 15 de diciembre de 2017, en el cual participaron 20 personas, incluyendo profesionales del rubro silvoagrícola, empresarios, estudiantes e investigadores, el cual abrió una amplia discusión hacia la necesidad de este tipo de productos del mercado, la amplia cantidad de herramientas biotecnológicas e innovación que requiere el desarrollo de estos productos.

En este contexto el proyecto generó un aporte al desarrollo del conocimiento científico y a la formación de capacidades humanas en materia de herramientas biotecnológicas para el desarrollo de un desinfectante ambiental efectivo para el control de fitopatógenos postcosecha, no tóxico y amigable con el ambiente, apoyando la realización de 3 unidades de investigación y una memoria de título de Ingeniería en Biotecnología ambiental y una tesis de Postgrado del Magister en ciencias forestales.

Los resultados de este proyecto validan la búsqueda de compuestos bioactivos desde organismos vivos como plantas, algas y micrororganismos, que corresponden a un recurso renovable, para su aplicación como desinfectante, plaguicida, antibiótico, anticancerígeno, etc. y que su producción y comercialización sea factible y tengan un precio competitivo.

5.6 En la medida que los resultados obtenidos permitan la elaboración de una ficha técnica (ejemplo ficha de cultivo), ésta debe ser adjuntada al informe.

Los resultados no permiten elaboración de ficha técnica

6. Fichas técnicas y análisis económico del cultivo, rubro, especie animal o tecnología que se desarrolló en el proyecto, junto con un análisis de las perspectivas del rubro después de finalizado el proyecto.

Actualización de Fichas Técnicas elaboradas

No se desarrolló ficha técnica y a la evaluación económica del producto se ha incluido en anexo 4

7. Problemas enfrentados durante la ejecución proyecto (legal, técnico, administrativo, de gestión) y las medidas tomadas para enfrentar cada uno de ellos.

Los principales problemas se tuvieron por la estacionalidad de la fruta, la que solo estaba disponible de finales de octubre a marzo, lo que limitó la realización de los análisis, teniendo que recurrir a usar fruta importada, y generando retrasos en la obtención de los hitos y usos de otras frutas disponibles como uva.

Metodológicamente se debió estandarizar varios de los métodos utilizados, lo que generó retrasos.

La limitación de tiempo entre que se pudo obtener las últimas pruebas en terreno y la generación de la solicitud de patente y opción de licencia, no permitió que se pudiera cumplir con la obtención de la opción de licencia

8. Difusión de los resultados obtenidos adjuntando las publicaciones realizadas en el marco del proyecto o sobre la base de los resultados obtenidos, el material de difusión preparado y/o distribuido, las charlas, presentaciones y otras actividades similares ejecutadas durante la ejecución del proyecto.

Todos los resultados de difusión fueron incluidos en resultados en la Actividad 5.1.- Difusión resultados y Organización Taller. y en el anexo 2

9. Productores participantes

Antecedentes globales de participación de productores

REGIÓN	TIPO PRODUCTOR	GÉNERO FEMENINO	GÉNERO MASCULINO	ETNIA (INDICAR SI CORRESPONDE)	TOTALES
	PRODUCTORES PEQUEÑOS		2		2
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES		1		1
	PRODUCTORES PEQUEÑOS				
	PRODUCTORES MEDIANOS-GRANDES				

Antecedentes específicos de participación de productores

NOMBRE	UBICACIÓN PREDIO			Superficie Hàs	Fecha ingreso al proyecto
	Región	Comuna	Dirección Postal		
José Miguel Vidal	VIII				Junio 2015
Sergio Belmar	VIII			Packing	Noviembre 2017
Juan Alarcón	VIII			20 Has	Noviembre 2017

Frutemu y CoolChile facilitaron sus bodegas y Packing para realizar pruebas con desinfectante ambiental

10. Conclusiones

Las principales conclusiones se describen a continuación:

- 1.- El Desinfectante ambiental natural formulado en base a Extractos algales provenientes de las costas de la región del Bio Bio controlan la pudrición postcosecha de frutos de arándanos, cerezas y uvas producida por los fitopatógenos *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, y *Penicillium spp.*
- 2.- El Desinfectante ambiental natural formulado en base a Extractos algales es inocuo, por lo que se puede aplicar en instalaciones de packing en presencia de fruta, sin entorpecer la actividad normal del proceso.
- 3.- El Desinfectante ambiental natural formulado en base a Extractos reduce significativamente la carga microbiana de ambientes de salas, cámaras y bodegas de packing.
- 4- La aplicación de Desinfectante ambiental natural no afectan las características deseables a nivel comercial de los frutos de arándanos, cerezas y uvas
- 5.- La producción comercial del Desinfectante ambiental natural validado es factible y aconsejable, siendo una buena alternativa para desinfectar ambientes, no toxico y con un precio competitivo.

11. Recomendaciones

2 años para desarrollar un producto natural y llegar a licenciarlo es muy poco tiempo, se recomienda ampliar la extensión de los proyectos, o plantear los proyectos en etapas de tal forma que en la primera etapa se llegue a nivel de generar el prototipo y en la segunda etapa desarrollar el producto, realizar la evaluación comercial, inscripción de marca y el licenciamiento o spinn off.

La etapa de licenciamiento es larga, ya que requiere una serie de acuerdos y tener todos los resultados con anterioridad para lograr el interés real de una empresa, por lo que se recomienda no incluirlos en este tipo de proyectos cortos.

12. Otros aspectos de interés

No hay otros aspectos de interés no abordados a lo largo del informe

13. Anexos

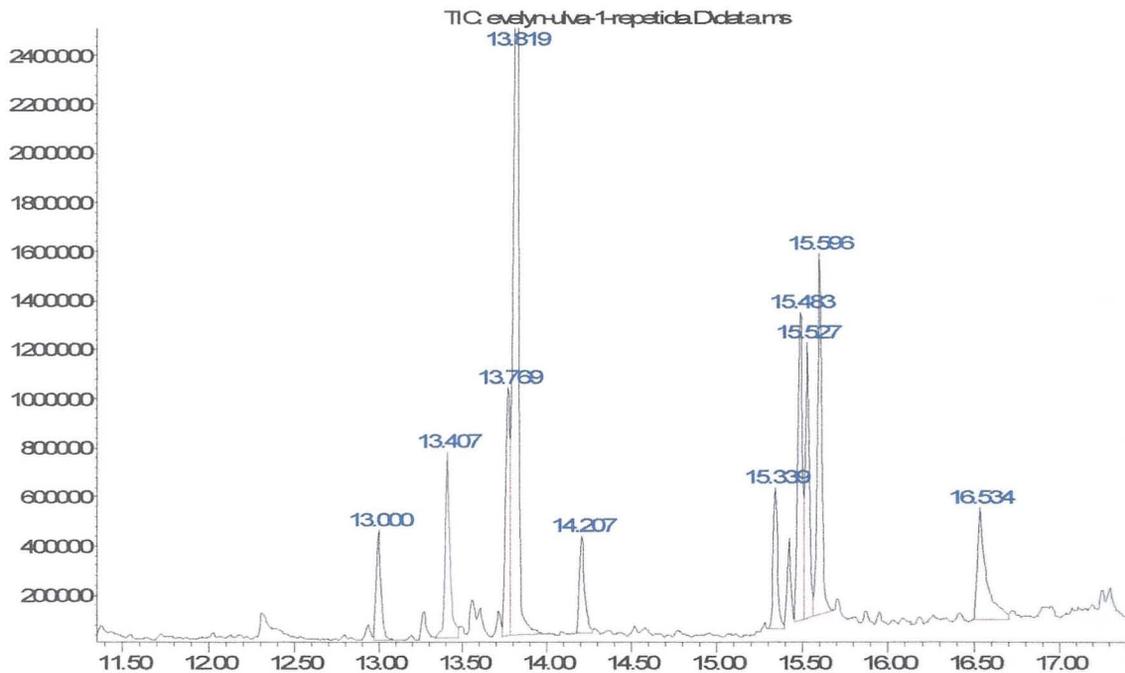
Anexo 1

Análisis químico de extractos de algas

Tabla N°1: Perfil químico de *Ulva* .sp, según Cromatografía gaseosa acoplada a detector de masas (CG-EM)

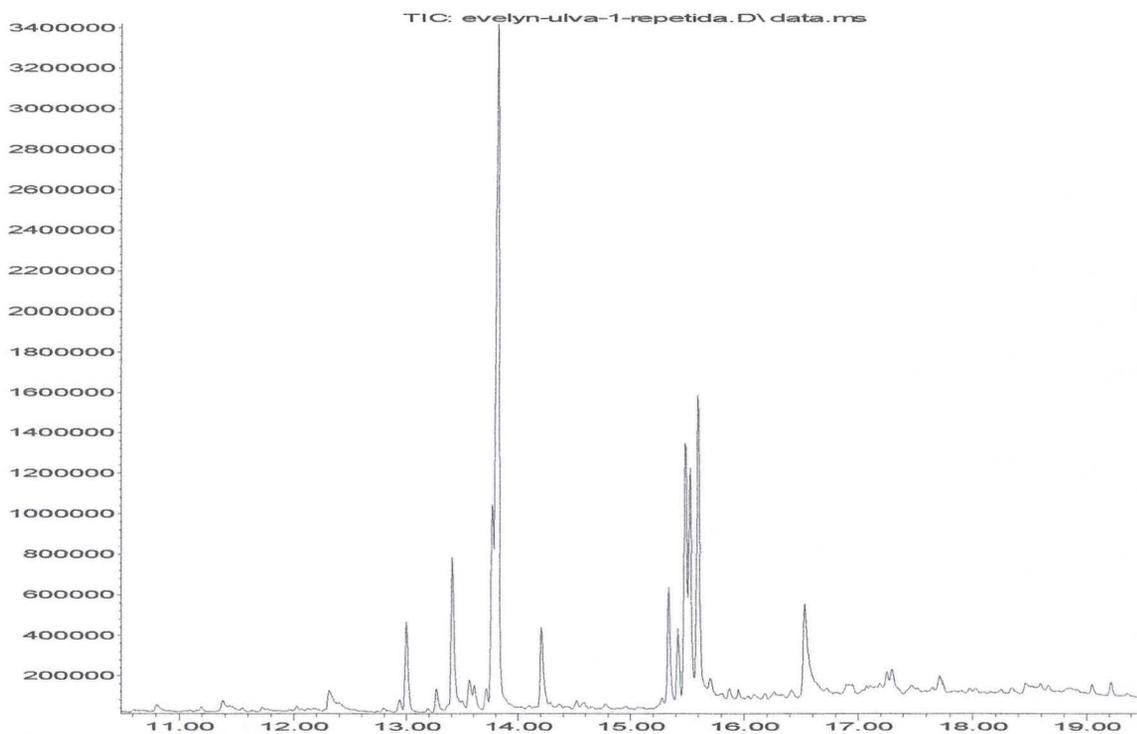
T.R	Compuesto	% Abundancia relativa
8,120	Deoxyspergualin	0,06
8,54	2-Methyltetracosane	0,10
8,79	Nonyl tetradecyl ether	0,04
8,98	Octacosane	0,09
9,10	3,4-Difluorobenzoic acid	0,22
9,23	2,4-Di-tert-butylphenol	0,06
9,34	Tetrapentacontane, 1,54-dibromo-	0,05
9,47	1-Undecene, 8-methyl-	0,07
9,69	Tridecane, 2-methyl-	0,17
9,79	Octane, 2-methyl-	0,15
10,01	.(-)-Isopinocampheol	0,09
10,14	1-(Piperidin-1-yl)octadecan-1-one	0,42
10,61	Dodecanoic acid, 1-methylethyl ester	0,13
10,80	trans-Carveol	0,44
11,19	8-Heptadecene	0,22
11,72	Methyl tetradecanoate	0,23
12,02	Octacosane	0,16
12,31	Loliolide (CAS: 073410-02-3)	1,47
12,79	Pentadecanoic acid, methyl ester	0,15
12,94	Neophytadiene	0,54
13,00	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl	3,99
13,19	3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecenol	0,17
13,40	Methyl 4,7,10,13-hexadecatetraenoate	7,18
13,56	7,10,13-Hexadecatrienoic acid, metil ester	1,34
13,71	8-Nonen-2-one	0,86
13,77	7-Hexadecenoic acid, methyl ester (z)	9,02
13,81	Hexadecanoic acid, methyl ester	31,10
14,52	Carbonic acid, eicosyl vinyl ester	0,36
15,28	9,12,15-Octadecatrienoic acid, metil ester, (z,z,z)-	0,22
15,42	9,15-Octadecadienoic acid, methyl ester (z,z)-	2,48
15,48	9,12,15-Octadecatrienoic acid, metil ester (z,z,z)	10,82
15,53	10-Octadecenoic acid, methyl ester	8,37
15,59	Phytol	12,01
16,53	2-Penten-4-one, 2-[(dimethyloctylsilyl)oxy]-	7,69
21,25	Squalene	0,64

Abundance



Time ->

Abundance



Time ->

Figura N°1. Perfil cromatograma del extracto *Ulva sp*

Observaciones:

Se puede observar en la tabla n°1 que según el perfil químico obtenido a partir del análisis cromatográfico, los principales compuestos del extracto liofilizado de *Ulva. Sp*, corresponderían a ácidos grasos, destacando el ácido hexadecanoico (ácido graso saturado de cadena larga, sinónimo: Ácido Palmítico), cuyo tiempo de retención a los 13,81 min, está representado en la figura n°1. También se puede observar la presencia de Fitol, diterpeno acíclico (precursor de Vitamina E y K1), cuyo tiempo de retención corresponde a los 15,59 min.

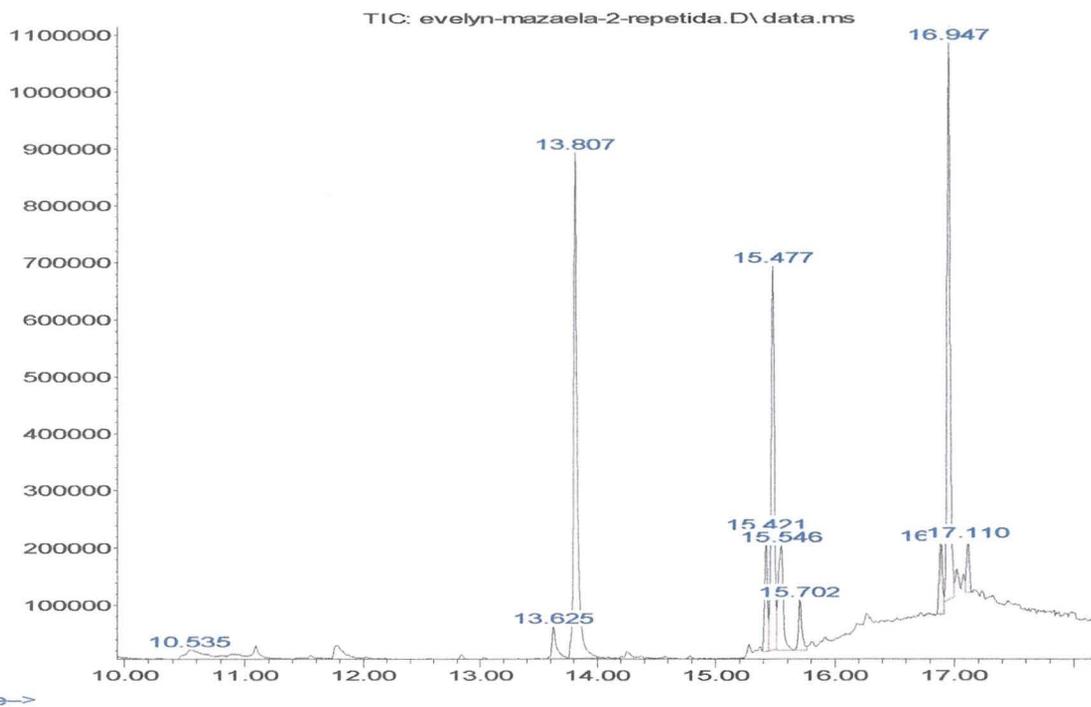
Tabla N°2: Perfil químico de *Mazaella.sp*, según Cromatografía gaseosa acoplada a detector de masas (CG-EM)

T.R	Compuesto	%
10,53	1-Di(t-butyl)silyloxypropane	2,71
11,09	3,4-Dihydroxyphenylglycol	1,02
11,77	Methyl tetradecanoate	2,36
13,62	cis-9-Hexadecenoic acid methyl ester	3,07
13,81	Hexadecanoic acid, methyl ester	34,52
14,79	Tetradecanoic acid, 12-methyl ester	0,29
15,28	cis-4,10,13,16-Docosatetraenoic Ac	1,05
15,42	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z) methyl ester	6,09
15,54	11-Octadecenoic acid, methyl ester	9,51
16,88	Arachidonic acid	3,69
16,95	cis-5,8,11,14,17-Eicosapentaenoic	31,76
17,11	9-Octadecenoic acid, (E)- methyl ester	2,51
19,22	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	1,41

Observaciones:

Se puede observar en la tabla n°2 que según el perfil químico obtenido a partir del análisis cromatográfico, los principales compuestos del extracto liofilizado de *Mazaella. Sp*, corresponderían a ácidos grasos, destacando el ácido graso saturado de cadena larga hexadecanoico (34,52%) y cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoico (EPA) (31,76%), este último corresponde al grupo de los omega 3 poliinsaturados.

Abundance



Abundance

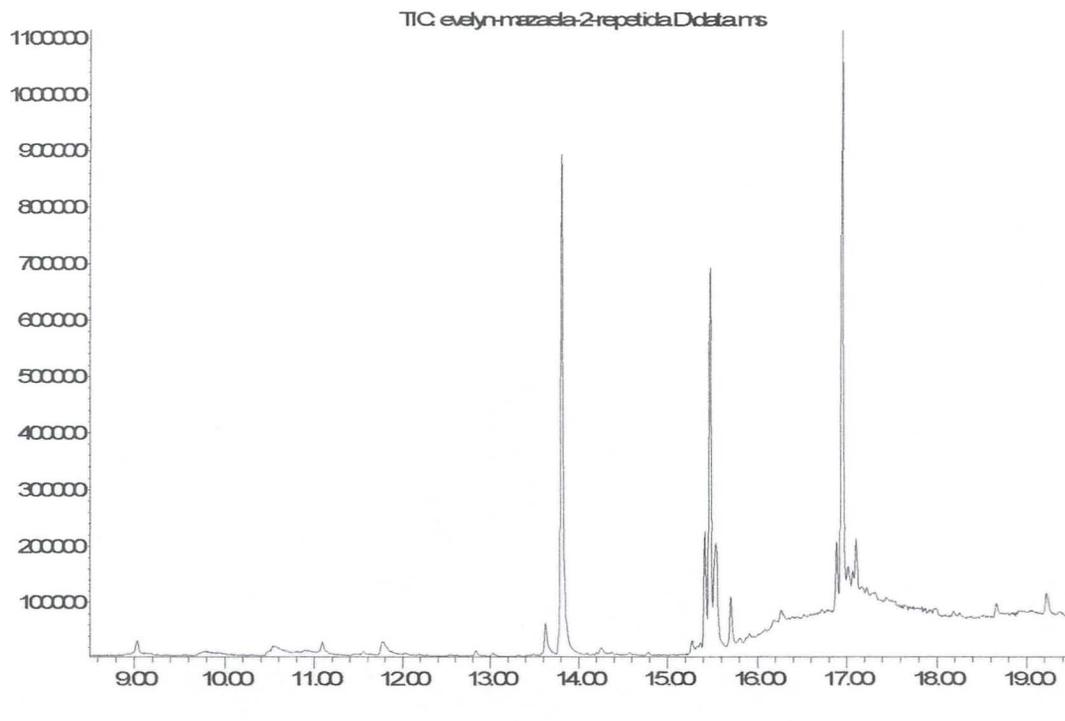
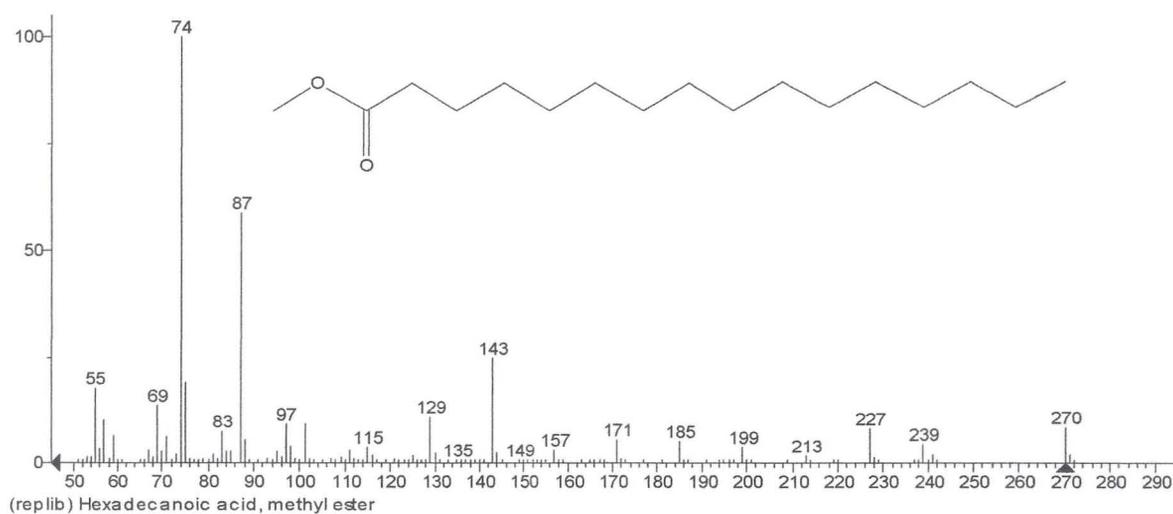


Figura N°2. Perfil cromatograma del extracto Mazaella sp

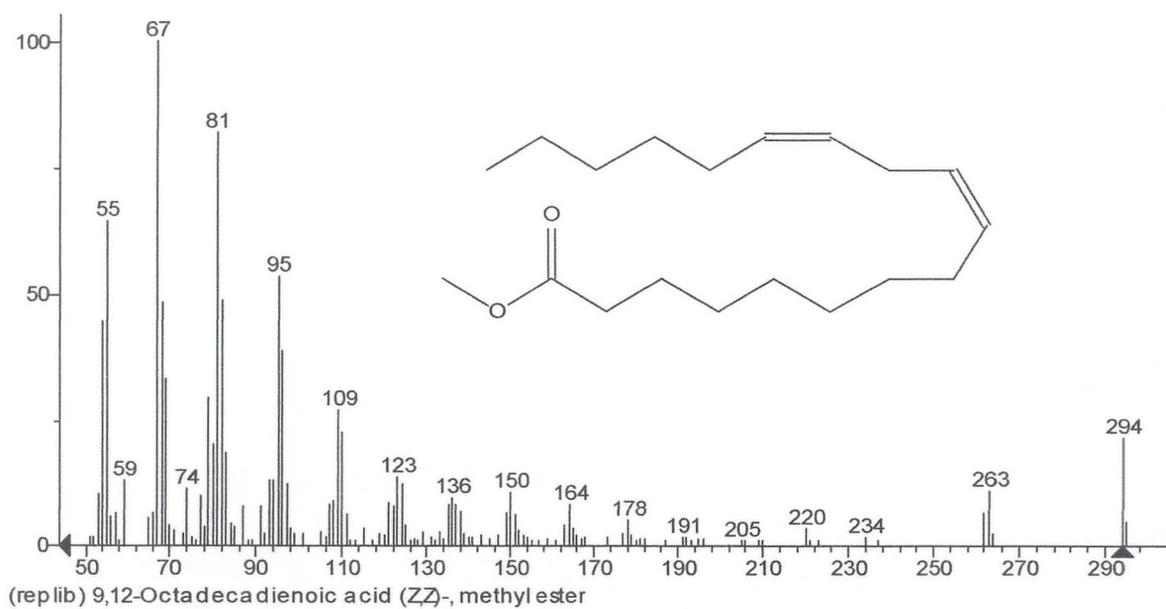
Anexos

- I. Fraccionamiento molecular de los principales compuestos presentes en la muestra de Ulva. Sp

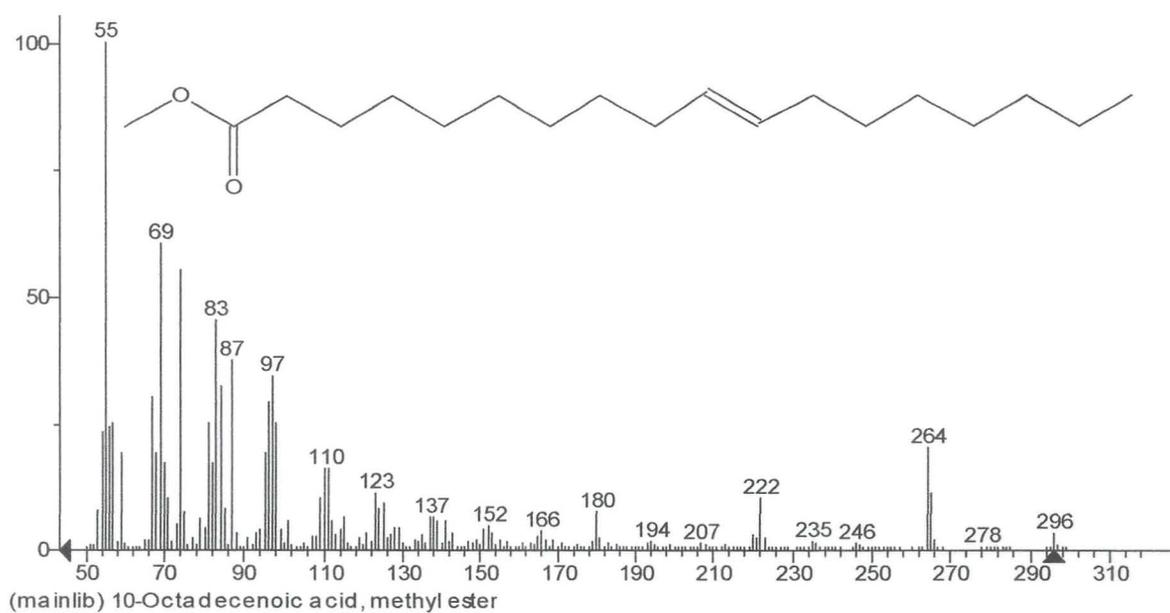
(13,81 min)



(15,42 min)

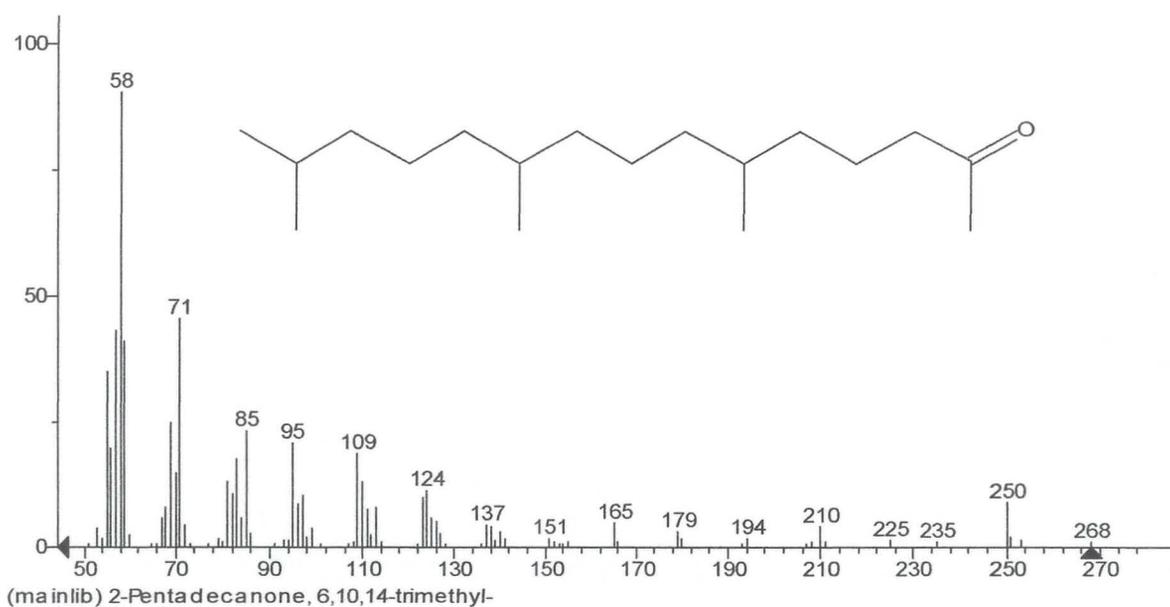


(15,54 min)

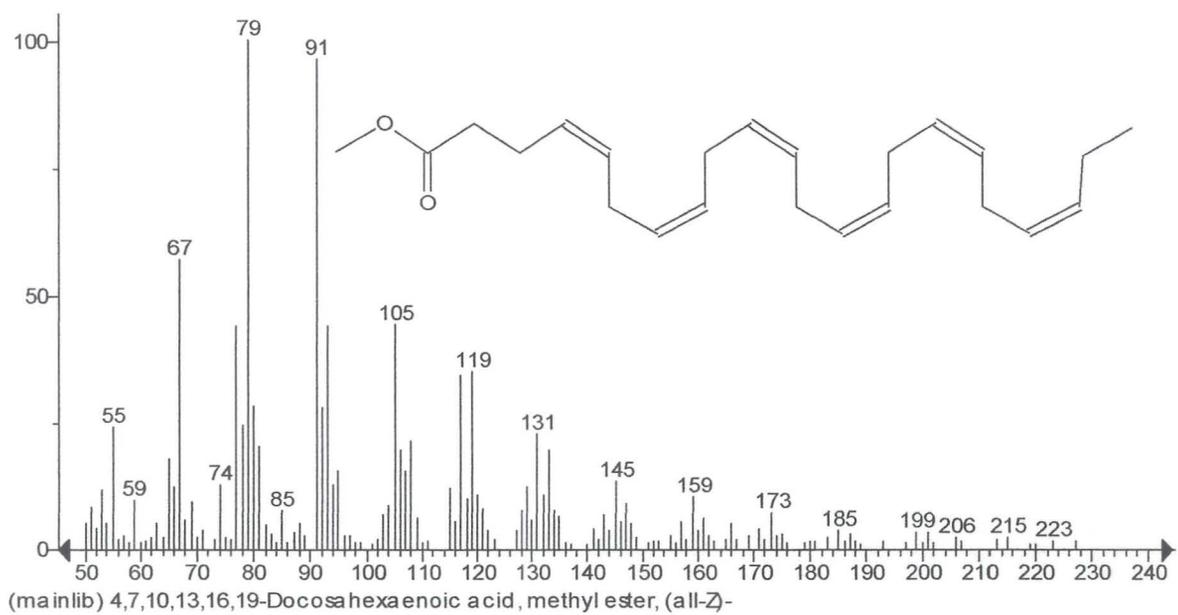


II. Fraccionamiento molecular de los principales compuestos presentes en la muestra de Mazaella. Sp

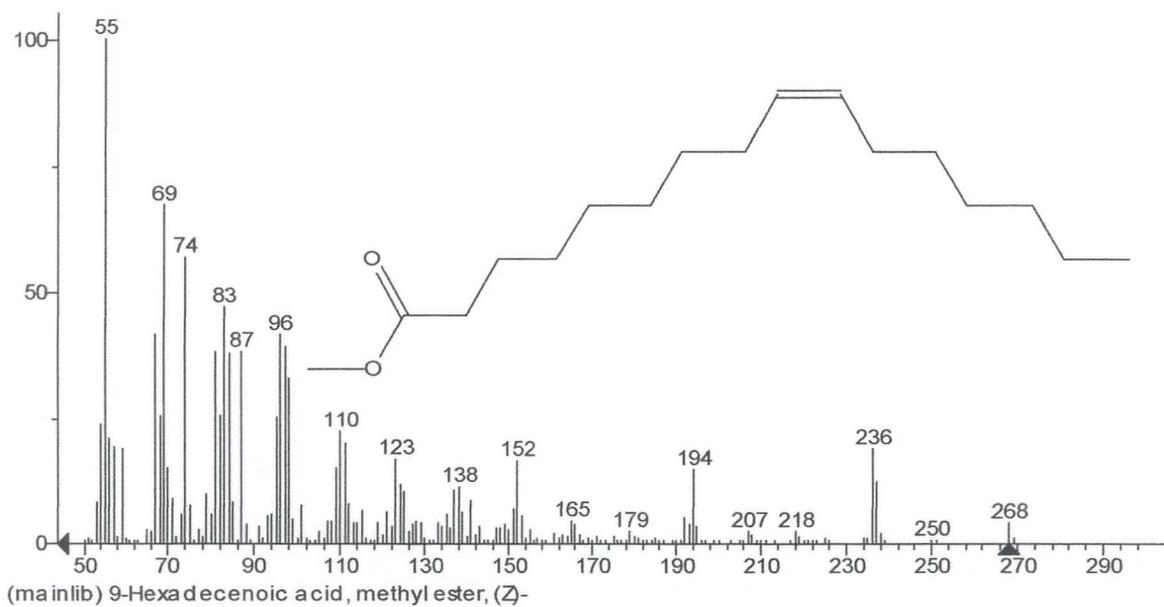
(13,00 min)



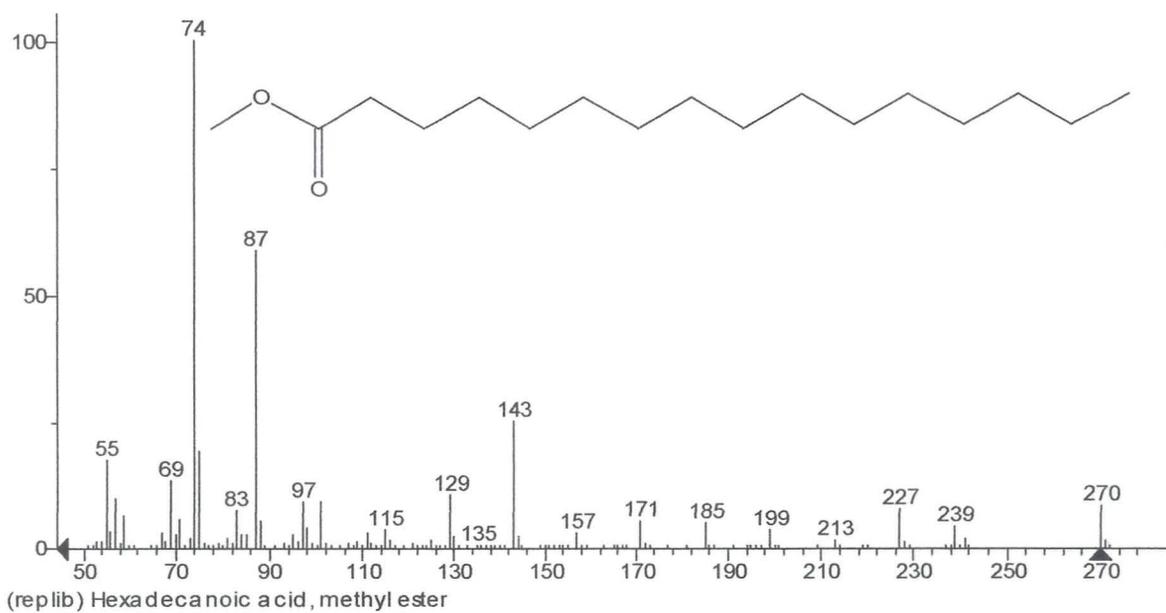
(13,40 min)



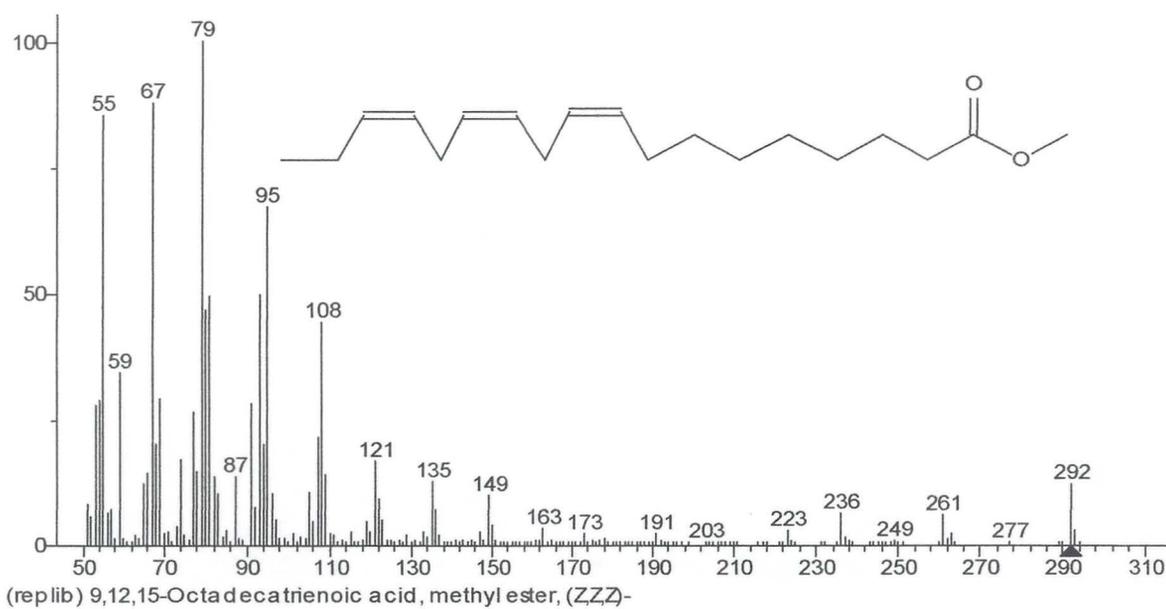
(13,77 min)



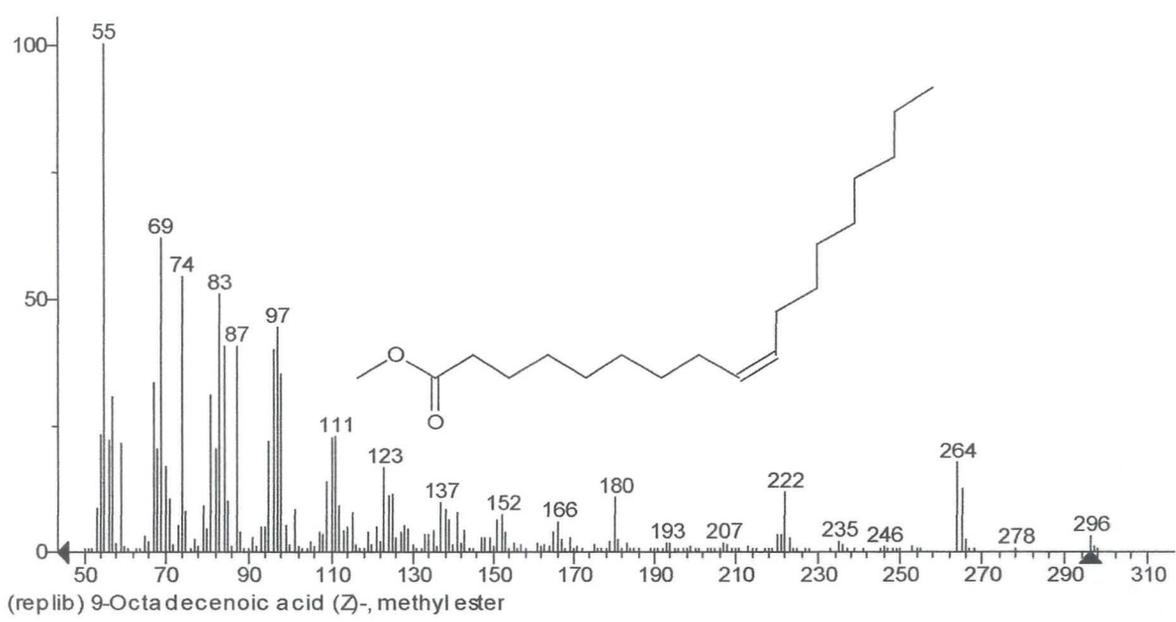
(13,81 min)



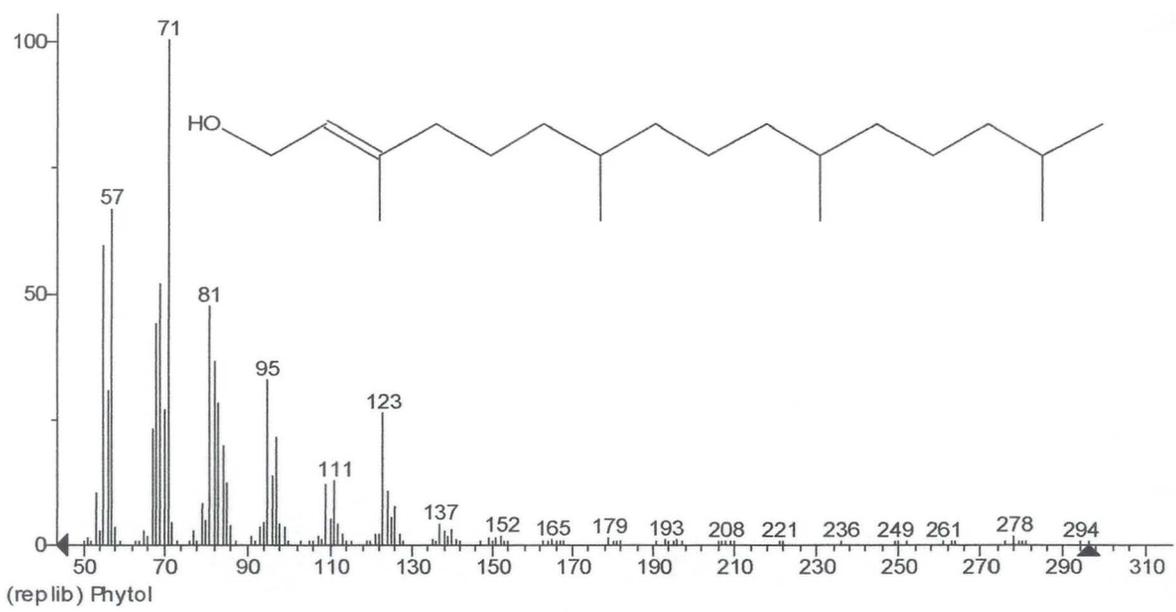
(15,48 min)



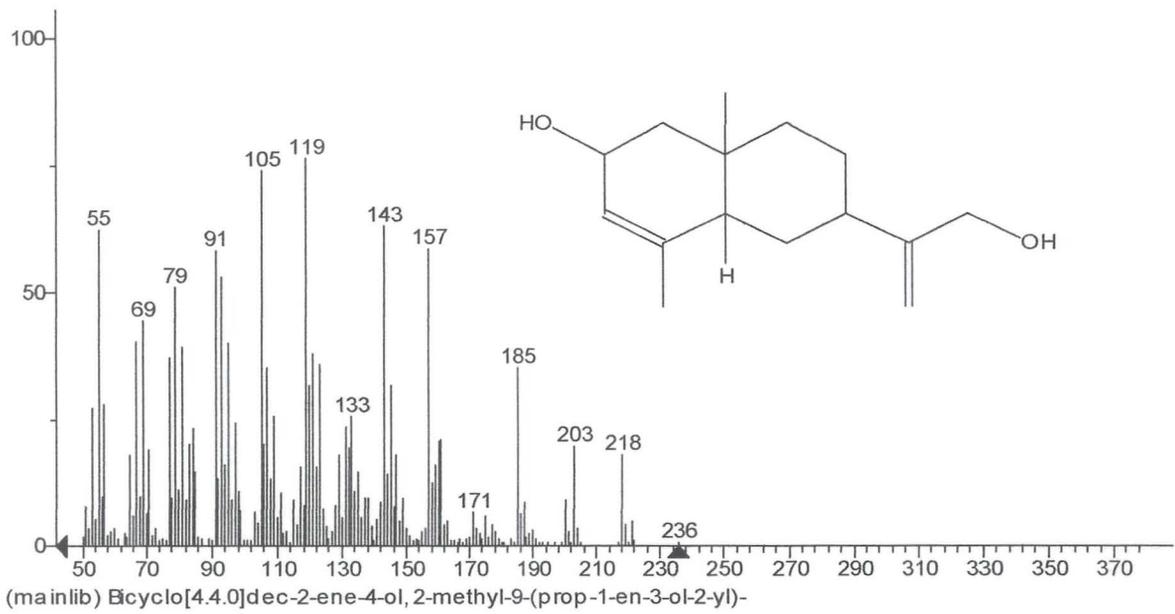
(15,53 min)



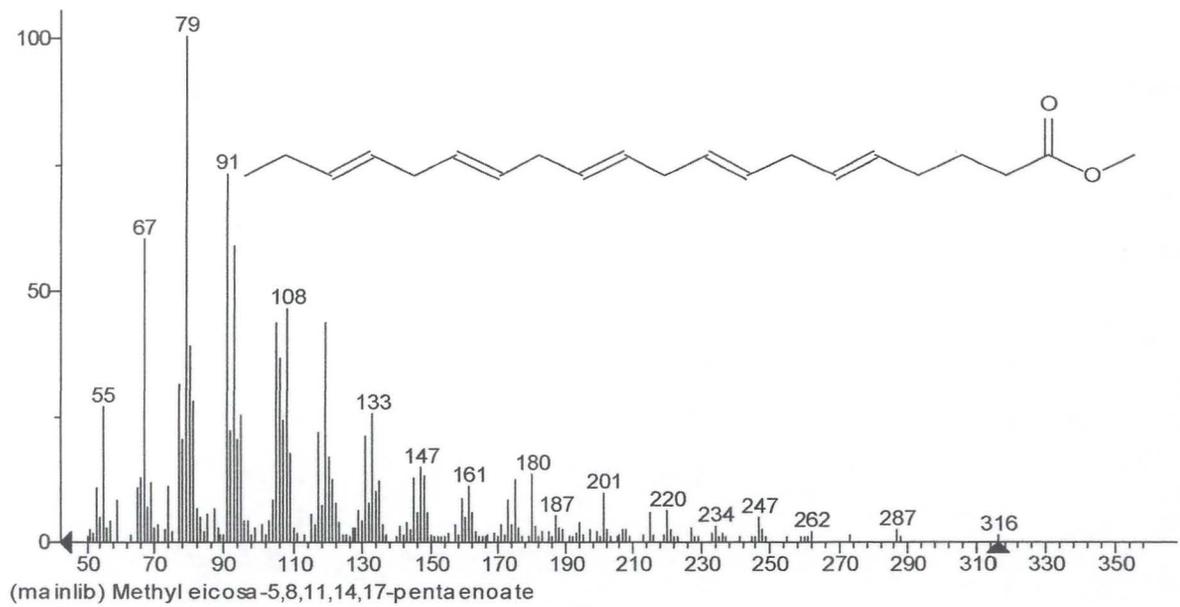
(15,59 min)



(16,53 min)



(16,95 min)



Anexo 2

Microbiota epibionte de macroalgas marinas del intermareal que controlan el crecimiento de bacterias del biofouling

Epibiont microbiota of intertidal seaweeds that control the growth of bacterial biofouling

Ruiz-Tagle, N¹., Aguilar, Luis¹., Obreque, Marjorie¹., Nocker, Andreas²., Urrutia, Homero³., Sossa, Katherine⁴.,

¹Centro de Biotecnología, Universidad De Concepción.²School of Energy, Environment and Agrifood, Cranfield University.³Microbiología, Ciencias Biológicas, Centro de Biotecnología, Universidad De Concepción.⁴Silvicultura, Ciencias Forestales, Centro de Biotecnología, Universidad De Concepción.

Biofouling son incrustaciones indeseables en superficies inertes inmersas en agua, como superficies de barcos, piscinas, redes acuícolas. Las algas marinas carecen de biofouling, aunque poseen una microbiota fúngica y bacteriana asociada, que poseen cualidades beneficiosas para el hombre como antivirales y antibióticas entre otras. Considerando que estas propiedades pueden ser un referente para la elaboración de biopinturas y/o biocidas aplicados en la industria acuícola o agroalimentaria, es que en este estudio se evaluó la actividad de bacterias epibiontes marinas sobre bacterias del biofouling. Se colectaron las algas *Ulva sp.*, *Pyropia sp.* y *Lessonia sp.* del intermareal rocoso de la Bahía de Concepción, las cuales fueron lavadas con agua de mar artificial (AMa). Desde cada fronda y mediante sacabocados se cortaron discos de 1 cm de diámetro. Los discos fueron agitados suavemente en AMa para remover las bacterias débilmente adheridas y luego sometidas a ultrasonido subletal para remover las bacterias fuertemente adheridas. El inóculo fue usado para aislar bacterias epibiontes con actividad antimicrobiana y los discos fueron esterilizados para la reinoculación de sus bacterias epibiontes y/o bacterias del biofouling. Los ensayos fueron evaluados mediante espectrofotometría, PMA-DGGE y q-PCR. 10 discos se utilizaron para cada ensayo en tres replicas. La esterilización se llevó a cabo usando mix de antibióticos (estreptomina, ampicilina, gentamicina, cicloheximida), biocida e NaClO(10%). No se observó crecimiento microbiano posterior a la esterilización de las algas. Se aisló bacterias epibiontes con actividad antimicrobiana relacionadas a los géneros *Shewanella sp.*, *Psychrobacter sp.*, *Vibrio sp.* las cuales tuvieron efecto significativo en la inhibición y disminución del número de bacterias del biofouling *Pseudoalteromonas sp.* en la superficie de las algas. Mediante este estudio se plantea que algas y sus bacterias actúan de manera conjunta como mecanismo de protección contra el biofouling.

INNOVA CORFO 11IDL2-10665, FIA 0127-2015

Evaluación de la actividad antimicrobiana e inocuidad de extractos de macroalgas marinas del intermareal

Evaluation of antimicrobial activity and safety of extracts intertidal seaweeds

Sossa, K¹., Obreque, Obreque¹., Sauer, Alan¹., Ruiz-Tagle, Nathaly²., Sanfuentes, Eugenio¹., Urrutia, Homero³., Perez, Claudia⁴., Becerra, José⁴., Astuya, Allisson⁵.,

¹ Ciencias Forestales, Universidad De Concepción. ² Centro de Biotecnología, Universidad De Concepción. ³ Ciencias Biológicas, Universidad De Concepción. ⁴ Botánica, Ciencias Naturales y oceanográficas, Universidad De Concepción. ⁵ Oceanografía, Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad De Concepción.

La exportación agropecuaria es el segundo ingreso con mayor importancia en Chile destacándose las frutas frescas, siendo importantes en la VIII la producción de arándano y cerezas, las cuales pueden ser afectadas por diversos patógenos, generando importantes pérdidas económicas. Uno de los principales patógenos es *Botrytis cinerea* entre los hongos y *Pseudomonas syringae* entre las bacterias.

Para el control de dichas enfermedades se dispone en Chile de diversos fungicidas químicos los que pueden ser tóxicos, corrosivos, cancerígenos o problemáticos para el medio ambiente, además se ha corroborado que seleccionan resistencia y poseen una imagen negativa, por lo que los consumidores se prefieren "productos naturales". Se conocen importantes beneficios de las macroalgas marinas en la industria cosmética, alimentaria y antibiótica, por ello, el objetivo de este estudio fue seleccionar macroalgas con actividad antimicrobiana e inocua.

14 extractos totales de macroalgas colectadas en el intermareal de la VIII región se utilizaron para realizar ensayos de inhibición de crecimiento de *Pseudomonas syringae* (halo de inhibición), además para ensayos de inhibición del crecimiento micelial (ICM) y germinación de conidias (IGC), del fitopatógeno *Botrytis cinerea* aislado de arándanos y cerezas enfermos, determinándose los parámetros EC50 y EC90.

Tres extractos inhibieron la germinación de conidias en *B. cinerea*, MRQ-16 (EC50=2.59 mg/ml); MRQ-17 (EC50=4,19 mg/ml); MRQ-23 (EC50=1,9 mg/ml), dos extractos inhibieron el crecimiento micelial: MRQ-16 (EC50=7,06 mg/ml); MRQ-23 (EC50=5,74 mg/ml), uno inhibió a *Ps. syringae* (MRQ-17=16mm). Ensayos de citotoxicidad sobre Neuro-2a presentaron IC50% > 360 mg/L.

Se demuestra que es posible el uso de macroalgas en el control patógenos agrícolas, como *B. cinerea* y *Ps. syringae*, con el potencial generar antifúngicos y antibacterianos para la agricultura que sean naturales e inocuos.

Financiado por FIA PYT-2015-0127



**XXV Congreso de la Sociedad Fitopatológica de Chile
XIX Congreso Latino Americano de Fitopatología
LVII APS Caribbean Division Meeting**

2 al 5 de Octubre de 2017

Cooperación para la Protección Vegetal y Biodiversidad

Estimado autor,

Junto con saludarle, tenemos el agrado de informarle que el Comité Científico del XXV Congreso de la Sociedad Fitopatológica de Chile - XIX Congreso Latino Americano de Fitopatología - LVII APS Caribbean Division Meeting, ha decidido aceptar el trabajo “Control de la pudrición de frutos de arándanos y uvas causada por *Botrytis cinerea*, *Penicillium* sp., y *Aspergillus* sp., con extractos de macroalgas litorales”, de los autores Obreque M., Sauer A., Ruiz-Tagle N., Urrutia H., Pérez C., Becerra J., Astuya A., Sanfuentes E. y Sossa K.

Dada la extensión del plazo para la presentación de resúmenes, próximamente se le indicará si vuestro trabajo fue considerado para presentación en modalidad oral o poster.

Agradecemos su participación.

Saluda cordialmente,

Comité Científico

Chillán, 19 de agosto de 2017



**XXV Congreso de la Sociedad Fitopatológica de Chile
XIX Congreso Latino Americano de Fitopatología
LVII APS Caribbean Division Meeting**

2 al 5 de Octubre de 2017

Cooperación para la Protección Vegetal y Biodiversidad

Estimado autor,

Junto con saludarle, tenemos el agrado de informarle que el Comité Científico del XXV Congreso de la Sociedad Fitopatológica de Chile - XIX Congreso Latino Americano de Fitopatología - LVII APS Caribbean Division Meeting, ha decidido aceptar el trabajo **“Actividad antimicrobiana e inocuidad de extractos de macroalgas marinas sobre *Botrytis cinerea* y *Pseudomonas syringae*”**, de los autores **Obreque M., Sauer A., Ruiz-Tagle N., Urrutia H., Pérez C., Becerra J., Astuya A., Sanfuentes E. y Sossa K.**

Dada la extensión del plazo para la presentación de resúmenes, próximamente se le indicará si vuestro trabajo fue considerado para presentación en modalidad oral o poster.

Agradecemos su participación.

Saluda cordialmente,

Comité Científico

Chillán, 19 de julio de 2017

TALLER: Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing

15 de Diciembre, Chillán
18 de Diciembre, Los Ángeles
Chile

Descripción:

Taller destinado a conocer problemas sanitarios de postcosecha de Arándanos y Cerezos y presentar una nueva alternativa para el control de fitopatógenos postcosecha en frutos y en ambientes de packing, basado en productos naturales inocuos y biodegradables. Este desarrollo se ejecutó en el marco del proyecto titulado “Desarrollo de un desinfectante ambiental basado en compuestos de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha de la industria agroalimentaria”, código PYT-2015-0127, cofinanciado por la Fundación para la Innovación Agraria (FIA) y ejecutado en la Universidad de Concepción.

Destinado a Agricultores, empresarios, administradores de packing, investigadores, académicos, estudiantes de postgrados, tesis, profesionales y técnicos del área agrícola.

A realizarse en Chillán y Los Ángeles:

➡ Fecha: **Viernes 15 de Diciembre**

Horario: 10:00 a 12:30

Lugar: Auditorio Suarez Fanjul, Casa Central, Campus Chillán, Universidad de Concepción.

Chillán, Chile

➡ Fecha: **Lunes 18 de Diciembre**

Horario: 10:00 a 12:30

Lugar: Auditorio Manuel Rioseco, edificio Aulas Manuel Rioseco, Campus Los Ángeles, Universidad de Concepción.

Los Ángeles, Chile

Contactar a : Katherine Sossa Fernández



Fundación para la
Innovación Agraria
MINISTERIO DE AGRICULTURA



Programa

Hora	Tema	Expositor
10:00 - 10:05	Apertura	Dr. Eugenio Sanfuentes, Director (s) Centro de Biotecnología Universidad de Concepción
10:05 - 10:35	Problemas Sanitarios postcosecha de Arándanos y cerezas	Dr. Ernesto Moya, Fitopatólogo. Universidad de Concepción
10:35 -11:20	Desarrollo de un desinfectante ambiental basado en compuestos de origen natural para el control de fitopatógenos postcosecha de la industria agroalimentaria	Dra. Katherine Sossa, Coordinadora Proyecto FIA PYT 2015-0127 Universidad de Concepción
11:20 -11:30	Importancia de nuevas alternativas de desinfectantes ambientales ecoamigables	Sr. José Miguel Vidal, Gerente General ECOMBIO S.A.
11:30 -11:40	Cierre	Dr. Homero Urrutia, Microbiólogo. Universidad de Concepción
11:40 -12:30	Cóctel	Casino Campus

Patrocinan y Auspician:



Fundación para la
Innovación Agraria
MINISTERIO DE AGRICULTURA



CB UdeC
Centro de Biotecnología
Universidad de Concepción
Región del Bío-Bío



Taller Gratuito, abierto a todos los interesados



TALLER: Ecotecnologías naturales para el control de fitopatógenos de postcosecha: aplicaciones en frutos y en ambientes de packing

Viernes 15 de Diciembre

10:00 a 12:30

Auditorio Suarez Fanjul,

Casa Central,

Campus Chillán,

Universidad de Concepción.

Chillán, Chile

Taller Gratuito, abierto a todos los interesados

Contactar a :

Katherine Sossa Fernández

Proyecto apoyado por:



Anexo 3

Concepción, Enero 17 de 2018.
U.P.I 038/2018.

SRA.
KATHERINE SOSSA FERNANDEZ
DOCENTE
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
PRESENTE

Estimada señora Katherine,

Nos es muy grato adjuntar copia de la Solicitud de Patente de Invención, denominada “Una formulación desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos de postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria”; la que fue presentada el 29 de diciembre de 2017, ante el Instituto Nacional de Propiedad Industrial del Ministerio de Economía, en el cual se le ha asignado el N° 03472-2017.

Cordiales saludos,

XIMENA SEPÚLVEDA BARRERA
Abogada
Jefa Unidad de Propiedad Intelectual

Adj.: Lo indicado.

c.c.: Archivo.



FPI - 41

(19)

HOJA TÉCNICA (RESUMEN)

(12) TIPO DE SOLICITUD

INVENCIÓN	<input checked="" type="checkbox"/>	MODELO DE UTILIDAD	<input type="checkbox"/>	(51) Int. Cl.	<input type="text"/>
-----------	-------------------------------------	--------------------	--------------------------	---------------	----------------------

(21) Número de Solicitud	<input type="text"/>	<input type="text"/>
--------------------------	----------------------	----------------------

(22) Fecha de Solicitud	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
-------------------------	----------------------	----------------------	----------------------

(30) Número de Prioridad (País, N° y Fecha)

(72) Nombre Inventor(es) (Incluir Dirección)
Sossa, K; Sanfuentes, E; Urrutia, H; Pérez, C; Becerra, J;
Astuya, A; Ruiz- Tagle; N.

(71) Nombre Solicitante (Incluir Dirección y Teléfono)
UNIVERSIDAD DE CONCEPCION

(74) Representante (Incluir Dirección y Teléfono)
Ximena Sepúlveda Barrera.
Empreudec, Concepción,

(54) Título de la Invención (Máximo 330 caracteres)
Una formulación desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos de postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria.

(57) Resumen (Máximo 1600 caracteres)
La presente tecnología corresponde a una formulación desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos de postcosecha que comprende extracto de <i>Ulva</i> sp.; extracto de <i>Mazzaella</i> sp.; solución Metanol/ Acetona (1/1); y agua. El uso de esta formulación está orientado al proceso de limpieza y desinfección en bodegas almacenadoras y empaquetadoras de alimentos. Por su inocuidad esta formulación se puede utilizar directamente en frutos, su utilización permite desinfectar tanto el aire, como las superficies y evitando el reasentamiento de los fitopatógenos postcosecha como <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp., y <i>Pseudomonas syringae</i> .

Firma Solicitante o Apoderado

N° Solicitud
Fecha de Registro

FPI - 40

SOLICITUD DE REGISTRO DE PATENTES

12 TIPO DE SOLICITUD	<input checked="" type="checkbox"/> INVENCIÓN	PRIORIDAD	<input type="checkbox"/> RESUMEN	DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS	<input type="checkbox"/> LISTADO DE SECUENCIAS	
	<input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD		<input type="checkbox"/> 31 N° _____		<input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA	<input type="checkbox"/> CERTIFICADO DEPOSITO MATERIAL BIOLÓGICO
	<input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL		<input type="checkbox"/> 32 FECHA ____ ____ ____		<input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES	<input type="checkbox"/> DIVULGACIÓN INOCUA
	<input type="checkbox"/> DIBUJO INDUSTRIAL		<input type="checkbox"/> 33 PAIS _____		<input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS	<input type="checkbox"/> TRADUCCIÓN SOLICITUD INTERNACIONAL PCT
	<input type="checkbox"/> ESQUEMA DE TRAZADO O TOPOGRAFÍA DE CIRCUITOS INTEGRADOS		<input type="checkbox"/> 31 N° _____		<input checked="" type="checkbox"/> PODER	<input type="checkbox"/> INFORME DE BÚSQUEDA PCT
	<input type="checkbox"/> DIVISIONAL N° SOLICITUD ORIGEN		<input type="checkbox"/> 32 FECHA ____ ____ ____		<input type="checkbox"/> CESION	<input type="checkbox"/> EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL PCT
			<input type="checkbox"/> 33 PAIS _____		<input type="checkbox"/> DOCUMENTO(S) DE PRIORIDAD	
			<input type="checkbox"/> 31 N° _____			
			<input type="checkbox"/> 32 FECHA ____ ____ ____			
	<input type="checkbox"/> 33 PAIS _____					

PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

CAPÍTULO I

CAPÍTULO II

86	N° SOLICITUD INTERNACIONAL PCT:	FECHA: ____ ____ ____
87	N° PUBLICACIÓN INTERNACIONAL PCT:	FECHA: ____ ____ ____
51	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)	
54	TÍTULO O MATERIA DE LA SOLICITUD Una formulación desinfectante ambiental de origen natural para el control de fitopatógenos de postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria.	

71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN		
		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
	TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
	1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica	Concepción	8	Chile
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO	
				SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>

72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social SOSSA FERNÁNDEZ, Katherine		
		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
	TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
	1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica	Concepción	8	Chile
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO	
				SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>

74	REPRESENTANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social Sepúlveda Barrera, Ximena		
		DIRECCIÓN (Calle, Número)		
	TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS
	1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica	Concepción	8	Chile
	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO	
				SEXO 1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>

De conformidad con el Art. 44 de la Ley N° 19.039 sobre Propiedad Industrial, declaro/declaramos que los datos consignados en este formulario son verdaderos

N° DE PODER

(N° de Custodia Inapi)

9191

USO EXCLUSIVO INAPI
RECEPCIÓN

Fecha		N° Solicitud
Fecha Publicación		
N° de Registro	Fecha de Registro	

**ANEXO SOLICITUD DE PATENTES
OTRO/S, SOLICITANTE/S, INVENTOR/ES, Y OTRA/S PRIORIDAD/ES**

PRIORIDAD

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social			
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino
<input type="checkbox"/>		E-MAIL	TELÉFONO		<input type="checkbox"/>
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social			
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino
<input type="checkbox"/>		E-MAIL	TELÉFONO		<input type="checkbox"/>
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social			
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino
<input type="checkbox"/>		E-MAIL	TELÉFONO		<input type="checkbox"/>
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social SANFUENTES VON STOWASER, Eugenio			
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD Concepción	REGIÓN 8	PAIS Chile	1: Masculino 2: Femenino
<input checked="" type="checkbox"/>		E-MAIL	TELÉFONO		<input checked="" type="checkbox"/>
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social URRUTIA BRIONES, Homero			
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD Concepción	REGIÓN 8	PAIS Chile	1: Masculino 2: Femenino
<input checked="" type="checkbox"/>		E-MAIL	TELÉFONO		<input checked="" type="checkbox"/>
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social PÉREZ MANRÍQUEZ, Claudia			
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD Concepción	REGIÓN 8	PAIS Chile	1: Masculino 2: Femenino
<input checked="" type="checkbox"/>		E-MAIL	TELÉFONO		<input checked="" type="checkbox"/>
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social BECERRA ALLENDE, José			
RUT:		DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO 1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica		CIUDAD Concepción	REGIÓN 8	PAIS Chile	1: Masculino 2: Femenino
<input checked="" type="checkbox"/>		E-MAIL	TELÉFONO		<input checked="" type="checkbox"/>



USO EXCLUSIVO INAPI

Fecha		N° Solicitud
Fecha Publicación		
N° de Registro	Fecha de Registro	

ANEXO SOLICITUD DE PATENTES
OTRO/S, SOLICITANTE/S, INVENTOR/ES, Y OTRA/S PRIORIDAD/ES

PRIORIDAD

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

31	N°	_____
32	FECHA	__ __ __
33	PAIS	_____

71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
71	SOLICITANTE	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social ASTUYA VILLALON, Allison		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input checked="" type="checkbox"/>	Concepción	8	Chile	
	E-MAIL	TELÉFONO		<input checked="" type="checkbox"/>
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social RUIZ-TAGLE MOENA, Nathaly		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input checked="" type="checkbox"/>	Concepción	8	Chile	
	E-MAIL	TELÉFONO		<input checked="" type="checkbox"/>
72	INVENTOR O CREADOR	DIRECCIÓN (Calle, Número)		
RUT:	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		
72	INVENTOR O CREADOR	Apellido Paterno, Apellido Materno, Nombre o Razón Social		
RUT:	DIRECCIÓN (Calle, Número)			SEXO
TIPO	CIUDAD	REGIÓN	PAIS	1: Masculino 2: Femenino <input type="checkbox"/>
1: Persona Natural 2: Inst. Investigación 3: Universidad 4: Otra persona Jurídica <input type="checkbox"/>	E-MAIL	TELÉFONO		

Nombre y Firma Representante

Nombre y Firma Solicitante

MEMORIA DESCRIPTIVA

ESTADO DEL ARTE

La exportación agropecuaria es la segunda en importancia en Chile y siendo la más relevante el subsector agrícola, de esta forma Chile se ha consolidado como el principal abastecedor de fruta fresca desde el Hemisferio Sur (uva de mesa, palta, frutos de carozos y arándanos), abasteciendo especialmente a Estados Unidos, Asia y Europa, esto implica que los productos exportados deben ser almacenados y transportados por largos periodos de tiempo, lo que conlleva un importante riesgo de infección por hongos y bacterias fitopatógenos que pueden afectar la calidad de frutas y hortalizas, generando importantes pérdidas del producto en la etapa de postcosecha, registrándose en promedio un 20% de pérdidas por infecciones en postcosecha a nivel mundial, lo que podría significar a Chile pérdidas que pueden alcanzar los US\$250 millones anuales por concepto de exportación de uva y arándanos, ya que estos frutos están dentro de los más susceptibles.

Uno de los mayores problemas que afecta a las plantas de procesamiento, almacenamiento y distribución de alimentos, tanto nacionales como internacionales, es la contaminación, por bacterias y hongos, la que provoca la pudrición de los alimentos en etapas de postcosecha, por tal motivo la industria agroalimentaria ha generado una serie de medidas que permiten mitigar estas pérdidas, una de ellas es el uso de desinfectantes ambientales para eliminar microorganismo patógenos adheridos a las superficies y en partículas en el aire, estos desinfectantes ambientales generales (germicidas) pueden contener amonios cuaternarios, hipoclorito, peróxido de hidrógeno, ácido peracético, etc, los que logran eliminar a los microorganismos patógenos, pero que son altamente tóxicos, corrosivos, irritantes y peligrosos para el medio ambiente, por lo que su utilización no es recomendable para el contacto directo con los alimentos.

Otra alternativa, son los productos de naturaleza química que tienen una actividad más específica eliminando hongos (fungicidas) y bacteria (bactericidas), pero que también se ha descrito como tóxicos, cancerígenos, teratogénicoa y peligrosos para el medio ambiente; por otra parte, estos productos, podrían seleccionar microorganismos resistentes, lo que se traduce en una disminución en la eficiencia en el tiempo.

La pequeña y mediana agricultura presentan las mayores pérdidas postcosecha, pudiendo alcanzar hasta un 65% de pérdidas de su producción, lo que los obliga a vender rápidamente sus productos y limitarlos en los mercados a los que podrían acceder. Las principales causas de baja calidad y pérdidas postcosecha, son la manipulación poco cuidadosa del producto y la falta de sistemas adecuados para el enfriamiento y el

mantenimiento de bajas cargas de patógenos en el lugar donde se empaacan y almacenan los productos.

El manejo efectivo durante el período de postcosecha es la clave para alcanzar los objetivos deseados, el uso de tecnologías avanzadas e inversión de capital en maquinaria moderna, pueden ofrecer ventajas en las operaciones a gran escala, pero frecuentemente estas opciones no son factibles para los productores a pequeña escala. En su lugar, las tecnologías simples y de bajo costo pueden ser frecuentemente más adecuadas para pequeños volúmenes, operaciones comerciales de recursos limitados y productores involucrados en el mercadeo directo.

Las tecnologías de postcosecha desarrolladas y disponibles a nivel internacional han sido introducidas en Chile y los protocolos utilizados en la realidad chilena han sido desarrollados por la investigación en función de los requerimientos comerciales de las empresas exportadoras para cada especie y variedad. Incluyen dicarboximidas, anilinopyrimidinas, hidroxianilidas, estrobilurinas. También se han aplicado fungicidas naturales a base de extractos cítricos y control biológico a base de *Bacillus subtilis* (Serenade) y *Trichoderma spp.* (Trichonativa).

Por otra parte, los organismos marinos han mostrado gran versatilidad en la superación de ataque de organismos patógenos en su superficie. Se han logrado detectar en extractos de macroalgas propiedades antimicrobianas (Guedes et al., 2012), a concentraciones menores al 2%. Extractos de microalgas (*Spirulina platensis*), macroalgas verdes (*Ulva lactuca*), rojas (*Gracilaria chilensis*, *Laurencia dendroidea*), pardas (*Lessonia trabeculata*, *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*) se ha detectado inhibición de *Botrytis cinerea*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre otros fitopatógenos (Jiménez et al., 2011; Perez et al., 2012; Saidani et al., 2012). Sumado a esta actividad, se ha detectado el potencial en extractos de algas en promover respuestas de defensa contra fitopatógenos en plantas (Vera et al., 2011) o cubiertas protectoras contra fouling (Callow and Callow, 2011) o las propiedades de los hidrocolides obtenidos desde algas (Glicksman, 1987) los cuales son utilizados en la industria alimentaria y/o cosmética.

Para el control de *Botrytis*, Syngenta ha desarrollado un sistema de manejo para determinar la forma óptima en la cual cada aplicación de fitosanitarios debe ser realizada. Para tal objetivo, tiene definido parámetros estandarizados que son precisos para determinar dicha condición de aplicación. Ejemplo AMISTAR® TOP (azoxystrobin y difenoconazole) para floración del cultivo y en la que está más expuesto, ya que en dicha etapa, *Botrytis cinerea* tiene su mayor período de esporulación. Otro es SWITCH® 62,5 WG (Ciprodinilo y Fludioxonilo), para el control eficaz de esporas y control del hongo en fase de crecimiento. Otro punto importante es el amplio espectro de SWITCH en el control de hongos, ya que las pudriciones postcosecha en uva de mesa están compuestas no tan sólo por inóculo de *Botrytis*, sino por *Cladosporium*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.*,

entre otros. Otros fungicidas y bacteriocidas postcosecha también están comercialmente disponibles en Chile por Syngenta S.A, son Scholar 230 SC (Fludioxonilo); Tazer FLO (Hidroxido de cobre), TECTO 60 PH (tiabendazol). A pesar de la preocupante limitaciones de los plaguicidas sintéticos, se ha logrado obtener extractos naturales de Quillay como acaricida, fungicida los cuales están disponibles como NemaQ, también saponinas de Quinoa que tratan y previenen la infestación de *B. cinerea*, en "Natural extract for the control of *Botrytis cinerea* at pre- and post-harvest", Patent US20090280201 (Navarro et al., 2009). Sumado a estas investigaciones de (Jiménez et al., 2011) lograron mostrar que extractos del alga parda *Lessonia trabeculata* inhibe el crecimiento bacteriano y reduce ambos el número y tamaño de la lesión necrótica en hojas de tomate luego de la infección con *Botrytis cinerea*, que el alga roja *Gracillaria chilensis* previene el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* y extractos del alga parda *Durvillaea antarctica* fue capaz de disminuir el daño causado por virus TMV en hojas de tabaco. Sin embargo, el principal uso de los extractos de algas es como fertilizantes en el área agrícola, Fartum Foliar Inversiones Patagonia S.A le incluye además la función de estimulante vegetal aplicado como fertilizante. Otras interesantes aplicaciones de las algas marinas en la protección de plantas son los productos *OSPO-V55 (algas marinas Atlántico Norte de la especie Ascophyllum nodosum 10%. SP)* y *BRASSTEC (algas marinas 7%) del Grupo Agrotecnología, cuya composición enriquecida* estimula los procesos fisiológicos defensivos en las plantas tratadas en situaciones de estrés, y resistencia a plagas entre otras características. Pese a estos interesantes trabajos en Chile no hay disponible productos comerciales de desinfectante ambiental a base de productos naturales para el control específico de fitopatógenos de postcosecha, inocuos y ambientalmente amigables.

El uso de fungicidas/bacteriocidas es variable, y comprende 26% del mercado de protección de plantas en Europa y Asia y 6% en USA (Jutsum, 1988). Aprox. 23 millones de Kg de fungicida son aplicados a frutas y vegetales anualmente, y es aceptado que la producción y mercado de estos productos perecibles no puede ser posible sin el uso de estos componentes (Ragsdale and Sisler, 1994)

Diversos fungicidas sintéticos postcosecha han sido descritos para el control de podredumbre en frutas, orientados principalmente hacia el control de podredumbres por *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Gloeosporium spp.* Fungicidas sintéticos como Imazalil, tiabendazol, pirimetanil (Smilanick et al., 2008), prochloraz (Danderson, 1986), y guazatine (FAO report, 1997) son generalmente usados como la primera línea de defensa contra patógenos postcosecha y aplicados en baños (Philabuster 400 SC). Un buen manejo antiresistencia se puede obtener al combinar fungicidas de bajo riesgo (Vorstermans et al., 2005). Sin embargo, los problemas de residuos y resistencia y se mantienen y enfatizan la necesidad de reemplazar este tipo de fungicidas por alternativas seguras y biodegradables (Wisniewski et al., 2001). Entre las alternativas están, el uso de

biocontrol, establecido ya sea como (1) uso de microorganismos preexistentes en el producto, los cuales pueden ser manejados, o (2) microorganismos artificialmente introducidos contra patógenos postcosecha (Sharma et al., 2009). Ejemplos de ellos se han usado *Trichoderma spp* para el control de *Botrytis* en fresa (Tronsmo and Dennis, 1977), *Bacillus subtilis* (Pusey and Wilson, 1988). Diversos antagonistas han sido patentados y evaluados para su uso comercial: ASPIRE, YieldPlus, y BIOSAVE-110 son los más ampliamente usados en el mundo para el control de enfermedades postcosecha de frutas y vegetales. Sumado a esto, se ha explorado productos naturales como compuestos saborizantes, ácido acético, jasmonatos, glucosinolatos, fusapyrone, propóleo y deoxyfusapyrone, quitosano, cubiertas protectoras de aceites esenciales y/o (*d*)-limonene, R(-)-carvone, 1,8-cineole (Combrinck et al., 2006; du Plooy et al., 2009), principios activos de algunas plantas, extractos de plantas se usan en el manejo de deterioro de frutas causadas por hongos fitopatogenos. Algunos volátiles de plantas como: acetaldehído, benzaldehído, cinnamaldehído, etanol, benzyl alcohol, nerolidol, 2-nonanone, se han encontrado con actividad antifúngica contra algunos patógenos de frutas y vegetales como *P. digitatum*, *R. stolonifer*, *Colletotrichum musae* y *Ervinia caratovora* en ensayos in vitro (Utama et al., 2002). El Benzaldehído ha sido usado en laboratorio para fumigar melocotones y usarlos contra podredumbre de *Rhizopus rot*, e inhibe totalmente la germinación de esporas de *B. cinerea* y la germinación de *M. fructicola* (Wilson et al., 1991).

Patentes relevantes halladas en relación a fungicidas con base extractos naturales son patente **US6346252**, "*Method of obtaining an antibacterial and/or antifungal extract from the algae Bonnemaisiniacea*" (Moigne, 2002), describe un método para obtener un extracto de alga que corresponde a una fracción de moléculas orgánicas halogenadas, mayor de 10000 gr/mol el que se mezcla con ácido cítrico y otros componentes obteniéndose una composición con actividad antibacteriana y/o antifúngica. El alga que se utiliza es *Asparagopsis armata*. Esta patente está orientada hacia el área clínica, si bien es cierto se aíslan compuestos con actividad antibacteriana y antifúngica a partir de algas. Otra solicitud de patente es **WO2005079210**, "*Methods and compositions for preventing biofilm formations, reducing existing biofilms, and for reducing existing biofilms, and for reducing populations of bacteria*", la cual describe una composición y un método para prevenir la formación de biopelículas, reduciendo la existencia de biopelículas y/o reducir la población de bacterias patógenas que son indicadores de descomposición. Esta composición comprende uno o más fermentados libres de células, donde dichos fermentados provienen de bacterias como *Lactobacillus sp.*, *Lactococcus sp.* y *Pediococcus sp.*; y comprende extracto de algas específicamente del alga *Delisea pulchra*. Esta tecnología comprende además un método para tratar biopelículas procedentes de variados microorganismos, entre ellos de las especies *Pseudomonas*, *Salmonellas*, *Staphylococcus*,

etc., donde dichas biopelículas se encuentran en diferentes superficies tales como carne, fruta, vegetales y/o superficies como metal, plástico, cerámica, etc. Una tercera tecnología que es relevante es la patente coreana **KR100871629** "An antibacterial composition comprising an extract of sea algae" la cual se refiere a una composición antibacteriana contra *Provatella intermedia* y una composición para prevenir o tratar gingivitis. Esta composición antibacteriana comprende al menos un extracto de algas *Scytosiphon lomentaria* y *Ulva pertusa*. El extracto se realiza utilizando alcohol, etilacetato, hexano y diclorometano para la extracción por solvente.

Por otra parte también se encontraron algunos artículos, relevantes para esta propuesta como la que se expone en el artículo "Anti-phytopathogenic activities of macroalgae extracts" (Jiménez et al., 2011) es un estudio que se realizó para determinar las propiedades *in vitro* e *in vivo* de 9 macroalgas chilenas, recolectadas en diferentes estaciones, sobre patógenos que crecen en plantas. Los resultados de este estudio sugirieron que las macroalgas estudiadas contienen compuestos con propiedades químicas que podrían ser consideradas para el control de patógenos en plantas.

Otro estudio que se desarrolló, "Antifungal activity of macroalgae extract" (Cosoveanu, A.; Scientific Papers, UASVM Bucharest, Series A, Vol. LIII, 2010, ISSN 1222-5339) encontraron que extracto provenientes de las macroalgas *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus* sp. (Bioalgua®), *Spirulina platensis*, y *Ecklonia maxima* (Kelpak®) tienen efecto sobre *Fusarium roseum*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *A. dauci*, *A. longipes*, *Trichoderma viride*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium expansum*.

Actualmente, aún existe la necesidad de contar con desinfectantes ambientales que actúen específicamente sobre fitopatogenos postcosecha, que sean de origen natural, de rápida biodegradación, amigables con el ambiente, que provenga de un recurso renovable, que no sea toxico para el humano, y por lo tanto, no implique un riesgo al estar en contacto con el producto alimenticio.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Efecto de extractos algales en el crecimiento y biopelículas de *Pseudomonas syringae*.

Figura 2: Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en arándanos, tratamientos (A) a 25°C y (B) a 4°C.

Figura 3: Incidencia de la enfermedad causada por *Penicillium* spp en arándanos, tratamientos (A) a 25°C y (B) a 4°C.

Figura 4: Incidencia de la enfermedad causada por *Aspergillus* spp en arándanos, tratamientos (A) a 25°C y (B) a 4°C.

Figura 5: Incidencia de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* en uvas, tratamientos (A) a 25°C y (B) a 4°C.

Figura 6: Incidencia de la enfermedad causada por *Penicillium* spp en uvas, tratamientos (A) a 25°C y (B) a 4°C.

Figura 7: Incidencia de la enfermedad causada por *Aspergillus* sp en uvas, tratamientos (A) a 25°C y (B) a 4°C.

Figura 8: Efecto de los extractos de algas en las características organolépticas de arándanos. A: pérdida de peso, B: Brillo, C: acidez. MRQ23: extracto de *Ulva* sp., MRQ24: extracto de *Mazzaella* sp.

Figura 9: Efecto de los extractos de algas en las características organolépticas de Cerezas. A: pérdida de peso, B: Brillo, C: acidez. MRQ23: extracto de *Ulva* sp., MRQ24: extracto de *Mazzaella* sp.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente tecnología corresponde a una formulación desinfectante ambiental que comprende compuestos de origen natural para el control de fitopatógenos de postcosecha y su uso en la industria agroalimentaria.

La formulación desinfectante comprende:

- a) 0,4-1,2 mg/ml de extracto de *Ulva* sp.;
- b) 2,0-3,2 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp.;
- c) 0,04 – 0,16 % v/v solución Metanol/ Acetona (1/1); y
- d) agua c.s.p.

Esta formulación desinfectante ambiental de origen natural es inócua, con actividad antifúngica y bactericida contra fitopatógenos, cuya aplicación podría ser integrada al proceso de Limpieza y Desinfección (L+D) en bodegas almacenadoras y empaquetadoras de alimentos. Este producto será agregado a una base acuosa con el objetivo de desinfectar tanto el aire, como las superficies y evitar el reasentamiento de los fitopatógenos.

Este desinfectante además de resolver el problema de los patógenos en sí, permite su aplicación directa sobre frutos, debido a sus componentes naturales este producto es no tóxico, y es compatible con los cultivos orgánicos. Esta formulación puede catalogarse como del tipo biocotrolador, los que se definen como organismos vivos o partes de estos.

Esta formulación permite la inhibición del crecimiento de fitopatógenos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y *Pseudomonas syringae*.

Ventajosamente, esta formulación desinfectante permite atacar al hongo de manera diferenciada, actuando a nivel del crecimiento micelial, cuando el patógeno ya está presente en la fruta, o a nivel de la germinación de conidias, cuando las frutas llegan a almacenamiento contaminadas desde la etapa de cosecha, sin que se detecte visualmente su contaminación.

Esta formulación desinfectante ambiental por su origen natural presenta una rápida biodegradación, es amigable con el ambiente, además de provenir de un recurso renovable, no es tóxico para el humano y por lo tanto permite su aplicación directa sobre el producto (frutas).

En una forma de realización sugerida de esta tecnología se utiliza un nebulizador (dispersor) en cámaras controladas, controlando la carga ambiental de fitopatógenos en el ambiente y sobre los frutos.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN

Ejemplo 1: Generación de extractos algales activos cuyas dosis sean efectivas contra los patógenos e inocuas para el ser humano y el medio ambiente.

Se colectó más de 15 distintas algas del intermarial de la octava región, de las costas de Dichato, Cocholgue, Merquiche y desembocadura del río Biobio, indicadas en la tabla 1. 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).

Tabla 1: Colección de Algas del intermarial de la octava región.

Cód.	Nombre común	Especie	División
B-01	Lechuga de mar	<i>Ulva sp.</i>	Chlorophyta
B-02, MRQ-16	Luche	<i>Pyropia sp.</i>	Rhodophyta
B-04, MRQ-17	Chascón	<i>Lessonia sp.</i>	Phaeophyta
B-05, MRQ-05; MRQ-24	Luga cuchara o corta	<i>Mazzaella laminarioides</i>	Rhodophyta

MRQ-01; MRQ-23	Lechuga de mar	<i>Ulva rigida</i>	Chlorophyta
MRQ-02, MRQ-12	--	<i>Ahnfeltiopsis sp.</i>	Rhodophyta
MRQ-03	--	<i>Ceramium sp.</i>	Rhodophyta
MRQ-04; MRQ-09	--	<i>Grateloupia sp.</i>	Rhodophyta
MRQ-07; MRQ-19	Chicoria	<i>Chondracanthus chamissoi</i>	Rhodophyta
MRQ-08	--	<i>Mastocarpus papillatus</i>	Rhodophyta
MRQ-10; MRQ-18	Huiro	<i>Macrocystis pyrifera</i>	Phaeophyta
MRQ-11	--	<i>Ectocarpus confervoides</i>	Phaeophyta
MRQ-13	--	<i>Rhodomenia sp.</i>	Rhodophyta
MRQ-14	--	<i>Plocamium sp.</i>	Rhodophyta
MRQ-15	Cochayuyo, ulte	<i>Durvillaea antarctica</i>	Phaeophyta
MRQ-22	--	<i>Codium dimorphum</i>	Chlorophyta

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, para la caracterización química de cada extracto.

Recolección de fitopatogenos postcosecha: Se realizó el aislamiento de hongos y bacterias desde muestras de ambiente y frutos con signos y síntomas de pudrición desde líneas de almacenamiento en distintos packing desde la VI a VIII región y cultivos de la octava región. Posteriormente los aislados fueron identificados caracterización morfológica y molecular, secuenciando el ADNr 16S o 18S y regiones ITS. Se seleccionaron aquellos aislados que correspondieron a los hongos *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y la bacteria *Pseudomonas syringae*.

Posteriormente se realizó test de Agresividad (incidencia y severidad) a los aislados obtenidos, de los cuales se seleccionó los 3 aislados más agresivos de *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* sobre cerezas y arándanos (Tabla 2), para probar la efectividad de los extractos de algas como desinfectante.

Tabla 2: Aislados seleccionados de hongos fitopatógenos de cereza y arandano.

Código	Fitopatógeno	Procedencia
FD2-CO1	<i>Botrytis cinerea</i>	Desechos frutos cereza
BC	<i>Botrytis cinerea</i>	Laboratorio Patología Forestal
R-CO2	Candidato <i>B.cinerea</i>	Frutos de arándanos
CAF-A02	<i>Aspergillus</i> sp.	Frutos de arándanos
CAF-RO4	<i>Aspergillus</i> sp.	Residuos de arándanos
CAF-H02	<i>Aspergillus</i> sp.	Hojas de arándanos
CAF-R05	<i>Penicillium</i> sp.	Residuos de arándanos
E1-CO1	Candidato <i>Penicillium</i>	Empaque de cereza
R-CO1	<i>Penicillium</i> spp.	Residuos de cereza.

Evaluación de actividad antifúngica y antibacteriana de extractos de algas in vitro

- Ensayo de inhibición de la germinación de conidias de hongos fitopatógenos: En tubos Eppendorf se agregaron 100 µl del extracto algal en concentraciones de 10; 5; 2,5; 1,25; y 0,625 mg/ml, a esto se le adicionaron 100 µl de la suspensión de conidias del patógeno a ensayar; se utilizó como control negativo agua y metanol-acetona (para eliminar el posible efecto del solvente en la inhibición) y como control positivo el desinfectante ambiental cloruro de benzalconio en su concentración comercial (5mg/ml). La mezcla se incubó por 24h a 25°C. Fue evaluado el número de conidias germinadas mediante examinación microscópica de los tubos germinativos (Rego et al. 2006), considerando conidias germinadas aquellas que morfológicamente presentaron signos de desarrollo o expresión del tubo germinativo inicial. El ensayo se realizó con cuadruplicado.

- Ensayo de inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos: El efecto inhibitorio del crecimiento micelial de los fitopatógenos fue evaluado mediante una modificación de la metodología descrita por Rego et al. (2006), se agregó sobre una placa Petri 1 ml de extracto algal en las mismas concentraciones utilizadas para la inhibición de germinación de conidias, quedando una concentración final de 0,16 mg/cm², 0,07 mg/cm², 0,04 mg/cm², 0,02 mg/cm², 0,01 mg/cm² en función a la superficie de la placa. Una vez seca la placa se dispuso en el centro un disco de micelio del hongo a evaluar con 4 días de crecimiento, se dejó el ensayo a 25°C por 7 días y se evaluó el crecimiento radial (mm) en 5 direcciones.

Determinación de EC50: La inhibición fue determinada mediante el porcentaje de germinación (para inhibición de germinación de conidias) y el crecimiento radial (para inhibición de crecimiento micelial) en relación con la dosis 0, se calcularon los valores

EC50 que corresponden a la determinación de la concentración efectiva en que el 50 % del agente etiológico es inhibido en su crecimiento y/o proliferación por la adición o contacto con un agente antimicrobiano, en este caso el extracto algal (Rustiom et al. 1989, Silva 2016). Para este cálculo se utilizó la tasa de mortalidad corregida con respecto a la dosis 0 (agua), con el cual se obtuvo un valor PROBIT de tabla, con estos datos se realizó la regresión lineal con el PROBIT de mortalidad y el logaritmo de la dosis para la determinación de EC50 (Rustiom et al. 1989, Silva 2016) (Tabla 3).

Tabla 3: EC50 (mg/ml) para extractos algales en ensayos de inhibición de germinación de conidias y crecimiento micelial de hongos fitopatógenos.

Alga	<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Aspergillus spp.</i>		<i>Penicillium spp.</i>	
	Conidias	Micelio	Conidias	Micelio	Conidias	Micelio
<i>Pyropia sp. (MRQ-16)</i>	1,517	7,59	0,011	9,68	0,066	4,43
<i>Lessonia sp. (MRQ-17)</i>	1,259	N.I	12,16	N.I	4,16	N.I
<i>Macrocystis sp. (MRQ-18)</i>	1,402	5,088	4,623	6,03	(>LS)	4,89
<i>Chondractus sp. (MRQ-19)</i>	8,735	N.I	(<LI)	N.I	0,066	N.I
<i>Grateloupia sp. (MRQ-20)</i>	8,555	N.I	0,675	N.I	2,025	N.I
<i>Ulva sp. (MRQ-23)</i>	0,566	5,35		3,78	0,268	2,76
<i>Mazzaella laminarioides (MRQ-24)</i>	0,269	8,76	2,591	6,84	0,017	2,08

Los valores calculados >100 mg/ml se muestran como mayor límite superior (>LS) y los valores <0,001 mg/ml se muestran como menos a límite inferior (<LI)

Las estimaciones de EC50 y EC90 demuestran que se requieren mayores concentraciones de extractos para inhibir el crecimiento micelial de los hongos (Tabla 3) que para inhibir la germinación de conidias, estas concentraciones no son limitantes, debido a que el objetivo de esta propuesta es reducir la aparición de hongos fitopatógenos, y al lograr la reducción del 50% de la germinación de las conidias (forma de diseminación y contaminación más frecuente de estos fitopatógenos) se cumple el objetivo.

Se observa que los extractos con valores EC 50 tanto de germinación de conidias como de inhibición del crecimiento micelial de los 3 hongos corresponde a *Pyropia sp.* *Ulva sp.* y *Mazzaella laminarioides*.

- Ensayo inhibición del crecimiento y formación de biopelículas de: *Pseudomonas syringae*: Cultivos de fitopatógenos fueron evaluados en microplacas de 96 pocillos. Para ello se mezclan en cada pocillo 20 µl de inóculo conteniendo *P. syringae* (1x10⁶cél/ml), cepas

DC3000 o CC94 resuspendidas en King B, 160 µl medio King B, 20 µl de extracto a concentraciones entre 0 y 20 mg/ml. Como blanco se usa 180 µl de medio más 20 µl del solvente usado en la preparación de los extractos. Los ensayos fueron incubados en agitación continua (90 rpm) por 96 h. Al finalizar el tiempo de incubación, se separaron 150 µl de la fase planctónica y las células adheridas (biopelículas): La fase planctónica (suspendidas) de los cultivos se traspasó a una nueva microplaca y se midió la absorbancia a 540 nm (D.O₅₄₀) para determinar la inhibición en el crecimiento de *P. syringae*. Los pocillos conteniendo las células adheridas (biopelículas) se lavaron con agua estéril y se fijaron con 250 µl de metanol por 15 min., luego fueron teñidas con 250 µL de cristal violeta 1%, por 20 min, seguido por lavados con agua estéril y posterior recuperación del cristal violeta en 200 µL de etanol 70%. Se midió la absorbancia a 595 nm (D.O₅₉₅) para determinar la inhibición en la formación de la biopelícula de *P. syringae* (Peeters et al., 2008). Aquellos extractos donde no se observa crecimiento de células plánctonicas y biopelículas inhiben el crecimiento y biopelículas de: *Pseudomonas syringae* a una concentración determinada. En la figura 1 se muestra el efecto de los extractos algales en el crecimiento y formación de biopelículas de *Pseudomonas syringae*.

Los extractos de algas que inhiben el crecimiento y la formación Biopelículas de *Pseudomonas syringae*. Corresponden a las algas *Grateloupia* sp (MRQ-04), *Mazzaella* sp (MRQ-04 y B-05), *Chondracanthus* sp (MRQ-07), *Macrocystis* sp (MRQ-10), *Rhodymenia* sp (MRQ-13), *Pyropia* sp (B-02), *Lessonia* sp (B-04), *Mazzaella* sp (B-05), entre concentraciones de 0,1 a 20 mg/ml.

En base a estos resultados se seleccionó los extractos de *Ulva* sp. y *Mazzaella laminarioides*, los como los de mayor efectividad a menores concentraciones, especialmente para la inhibición de conidias de los fitopatógenos estudiados, se muestra resumen en tabla 4.

Tabla 4: Resultados de EC50 en mg/ml, para extractos algales en ensayos de inhibición de germinación de conidias, crecimiento micelial de hongos patógenos (*B. cinerea*, *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp) y formación específica de biopelículas de *Pseudomonas syringae*.

		<i>Ulva</i> sp.	<i>Mazzaella laminarioides</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	Conidias	0,566	0,269
	Micelio	5,35	8,76
<i>Aspergillus</i> sp.	Conidias	-	2,591
	Micelio	3,78	6,84
<i>Penicillium</i> sp.	Conidias	0,268	0,017

	Micelio	2,76	2,08
<i>Pseudomonas</i>	DC3000	-	+
<i>syringae</i>	CC94	-	+

Determinación de rangos de inocuidad para los extractos seleccionados con actividad antimicrobiana y antifúngica, se determinó a través de citotoxicidad en línea celular de linaje neuronal (Neuro-2a) y Bioensayo de toxicidad aguda y crónica con *Daphnia*.

El ensayo de citotoxicidad del extracto fue evaluado en la línea celular de neuroblastoma de ratón (Neuro-2a) (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, MD; CCL-131, las que fueron mantenidas en medio RPMI 1640 (GIBCO) con 1mM de piruvato de sodio (GIBCO) suplementados con 10% de suero bovino fetal (SBF) (GIBCO), 2mM glutamina, 100 µg/mL penicilia, 100 U/mL estreptomina y 2,5 µg/mL de amphotericina B (GIBCO). Los cultivos fueron mantenidos en una incubadora a 37°C con de inyección de CO₂ 5%. Para la evaluación de la actividad citotóxica, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos a una densidad de 125.000 células/mL, en un volumen de 200 µL. Luego de 24 horas de incubación las células fueron expuestas a 100 µL de una solución con los extractos de la serie MRQ-15 al MRQ-24, por 24 horas. El extracto a evaluar fue disuelto metanol/acetona a concentración menor al 1,5% (v/v) en agua. El rango evaluado de concentración de los extracto fueron de 360 mg/L a 45 mg/L. Una vez terminado el período de incubación con el extracto, este fue eliminado y se agregaron 60 µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-YI)-2,5-difenil-tetrazolio bromuro, Invitrogen) a una concentración de 0,83 mg/mL. Luego de 30 minutos a 37°C fue retirado y las sales de formazán fueron disueltas con 100 µL de DMSO. Se midió la densidad óptica en un lector de microplacas (Synergy H1, Biotek, Vermont, USA) a 570 nm. Se calcularon los respectivos porcentajes de viabilidad celular respecto a su control y se representaron mediante el programa estadístico Prism 4 (GraphPad, San Diego, California, USA)

El bioensayo de toxicidad aguda con *Daphnia magna* permite medir el efecto del extracto de alga sobre neonatos (<24 horas) de *Daphnia*, los cuales son expuestos bajo condiciones de laboratorio controladas a una serie de diluciones de extracto de alga por un tiempo de 24 o 48 horas, al final de las cuales se estima el LC₅₀, que corresponde a la concentración del extracto de alga que en 24 o 48 horas provoca la muerte del 50% de los organismos.

Para lo cual se realiza una prueba preliminar que da una valor aproximado de 24h-LC₅₀ (ó 48h-LC₅₀) y se determina los rangos de concentraciones que deben ser probadas en la prueba de toxicidad definitiva.

La Prueba definitiva consiste en determinar el valor del 24h-LC₅₀ ó 48h-LC₅₀ 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 de *Daphnia magna*. En la prueba definitiva se deben considerar al menos cinco concentraciones más un control, y por cada concentración 20 individuos divididos en cuatro réplicas mantenidas a una temperatura de 20 °C ± 2°C. : 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-LC₅₀ ó 48h-LC₅₀ con método estadístico Probit analysis.

El Bioensayo de toxicidad crónica con *Daphnia magna* consiste en colocar en una serie de cámaras de prueba, volúmenes crecientes de extracto de algas 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. 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.

Posteriormente se debe coleccionar y seleccionar neonatos de *Daphnia* sp. de menos de 24 horas de nacidos. Introducir en cada unidad experimental 1 neonato. Hacer recambios de medio cada 2 días. 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. Al final del período de observación (21 días) se deben analizar las diferencias significativas entre el número de neonatos producidos en las diferentes concentraciones.

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 (g/L). 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 el de Williams o el Spearman – Karber (para datos no paramétricos). El valor LOEC entregado por el programa estadístico, 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.

A través de este bioensayo se demostró que los extractos seleccionados con efecto inhibitorio sobre fitopatógenos presentan baja toxicidad aguda con *Daphnia*.

Se utilizó cloruro de benzalconio como control negativo su LC₅₀ fue >0,001 g/L, indicando su alta toxicidad, ya que a concentraciones mayores a 0,1 mg/L produce la muerte del

50% de los individuos. El extracto de *Ulva* sp tuvo un LC50% de 3,14 mg/mL y el extracto de *Mazzaella laminarioides* tuvo un LC50% de 14,4 mg/ml. Todos los extractos de algas evaluados presentan menor toxicidad que el cloruro de benzalconio. Los parámetros obtenidos corresponden a IC 50 que describe el efecto no toxico; LC50 la ecotoxicidad aguda; LOEC ecotoxicidad Crónica (Concentración más baja del extracto que causa un efecto significativo en el número de descendencia por hembra con respecto al grupo control); y NOEC ecotoxicidad Crónica (Concentración más alta del extracto que no causa un efecto significativo en el número de descendencia por hembra con respecto al grupo control); y se muestran en la tabla 5.

Tabla 5: Citotoxicidad y ecotoxicidad de extractos de algas y Cloruro de benzalconio.

	IC50 (mg/ml)	LC50 (mg/ml)	LOEC	NOEC
<i>Ulva</i> sp.	0,128	3,54		
<i>Mazzaella laminarioides</i>	0,089	14,4	0,312-0,625	0,312

Además se observa que ninguna de las concentraciones inhibitorias del extracto de *Mazzaella laminarioides* alcanza concentraciones de toxicidad aguda en *Daphnia* y extractos de *Ulva* sp supera el LC50 solo a concentraciones inhibitorias de crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* y *Aspergillus* sp.

Por lo que recomienda usar para los siguientes ensayos las concentraciones de 0,6 mg/mL de extracto de *Ulva* sp y 2,6 mg/ml del extracto de *Mazzaella laminarioides*.

Ejemplo 2: Desarrollo de 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.

Ensayos de inhibición de enfermedad por fitopatógenos *B. cinerea*, *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp en frutos: Inoculación y pre-incubación en cámaras de crecimiento: unidades experimentales consistieron de 50 frutas ubicadas en placas de Petri o pocillos plásticos previamente esterilizados, conteniendo papel Whatman No. 1 humedecido con agua desionizada estéril. Sobre cada grupo de aplicó la mezcla de solvente + compuesto activo, sumado a este procedimiento de aplicaron como control el fungicida cloruro de benzalconio. 48h después los frutos fueron inoculados con 20 µL de la suspensión de 1x10⁸cfu/ml de *P. syringae* y 1x10⁵conidia/ml de *B. cinerea*, *Aspergillus* sp., y *Penicillium*

sp. (cepas aisladas desde frutas infectadas). Como control se usaron frutos tratados con agua estéril. Las frutas inoculadas fueron pre-incubadas a 23–25 °C y luego mantenidas por 10 días, periodo durante el cual fueron evaluadas diariamente.

Diseño experimental en bloque

Frutos de arándano, cereza y/o uvas fueron seleccionados según homogeneidad de tamaño, turgencia y color, frutos con lesiones evidentes o contaminación por patógenos fueron descartados. La desinfección de los frutos consistió en 2 min. de exposición en hipoclorito de sodio al 2%, y un lavado en agua destilada estéril, los frutos fueron secados a temperatura ambiente por 30 min. (Qin et al. 2006, Xu et al. 2008, Wang et al. 2015). Las aplicaciones se realizaron por fruto de forma independiente, para cada ensayo el diseño experimental correspondió a un diseño factorial (2X4X5X4) en bloques generalizado completamente al azar, donde:

- A. Bloque: Se realizó un bloque por temperatura,
 - Temperatura Bloque 1: 4°C.
 - Temperatura Bloque 2: 25°C
 -
- B. Factor A: Correspondió a los fitopatógenos a utilizar, y consta de tres niveles
 - *Botrytis cinerea* aislado BC + RCO2
 - *Penicillium* aislado CAFRO5 + RC01
 - *Aspergillus* aislados CAFRO4 + CAFH02
 - *P. syringae*(DC3000 + CC94)
 -
- C. Factor B: Correspondió al extracto algal, consta de cinco niveles:
 - *Ulvasp.* (MRQ23) concentración 0,6 mg/ml
 - *Mazzaellasp.* (MRQ24) concentración 2,6 mg/ml
 - MRQ23 + MRQ24 (0,6 mg/ml + 2,6 mg/ml)
 - Agua (Control)
 - Cloruro de benzalconio (Control positivo)

Cada bloque constó de 4 repeticiones con 10 unidades de observación por replica (U.O= 1600).

Se realizaron heridas a los frutos de cerezas y arándanos, de 1-2 mm de profundidad (Smilanick et al. 2006) y fueron sumergidos por 2 min. en suspensión de conidias de acuerdo a lo que se indica en Factor A ($1,5 \times 10^5$ UFC/ml en hongos y 1×10^6 UFC/ml en bacterias) y se secaron por 24 h (Romanazzi et al. 2008, Smilanick et al. 2006) a las

temperaturas 4 y 25°C. Pasadas las 24h fueron sumergidos por 3 min. en los tratamientos (Factor B) y dispuestos en forma equidistante en placas Petri (Sholberg et al. 2004).

Análisis estadístico: La severidad de la infección fue 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: Σ (escala x n° de piezas dañadas) x 100 / (n° total piezas x escala más alta). La incidencia se calcula como el número de frutos enfermos/total de frutos *100. Las observaciones pueden ser analizadas mediante ANOVA, seguido de test de Duncan ($P \leq 0,01$).

Ensayos con extracto algal resuspendido en agua: Los resultados de reducción de pudrición causada por los fitopatógenos *B. cinerea*, *Penicillium* sp., y *Aspergillus* sp., en frutos de arándanos indicaron que los extractos liofilizados de las algas *Ulva* sp., *Mazzaella* sp. y la mezcla de ambos tuvieron un efecto dependiente de la temperatura. A 25°C no tuvieron efecto en reducir la incidencia de ninguno de los tres patógenos evaluados, así como tampoco sobre la severidad de la pudrición. Solo se constató efecto de los extractos en reducir la pudrición en los primeros siete días del ensayo. Cloruro de benzalconio mostró un efecto significativo en disminuir la incidencia de la enfermedad, sin embargo, este aumenta desde los 7 días de incubación.

Debido a que en postcosecha los frutos son mantenidos en cámaras de packing a temperaturas entre -2 a 4°C, los frutos fueron expuestos a fitopatógenos, asperjados con los extractos de las algas e incubados a 4°C. Se observó que el efecto de los extractos en la protección del fruto contra fitopatógenos fue dependiente fitopatógeno evaluado; en el caso de *B. cinerea* se observa una reducción en la incidencia y severidad de la pudrición respecto al control agua solo cuando se aplican los extractos de las algas por separado, disminuyendo en alrededor del 80% la incidencia. El efecto de los tratamientos fue significativamente distinto al de cloruro de benzalconio.

En cuanto a *Penicillium* spp. No se observan diferencias significativas entre los tratamientos y el cloruro de benzalconio, reduciendo a 15% la incidencia, de esta forma los extractos de algas aplicados en forma separada y combinados redujeron pudrición en arándanos.

En frutos inoculados con *Aspergillus* spp. se observó que los extractos de algas aplicados en forma separada como los combinados redujeron en forma similar la incidencia de la pudrición en arándanos, sin embargo, logran reducir estos indicadores a <15% respecto al control agua (45%). Al evaluar severidad de la enfermedad se logra observar que los extractos tienen un comportamiento similar al del cloruro de benzalconio.

Ensayos con extracto algal resuspendido en solución Metanol/ Acetona y diluido en agua.

Uvas y arándanos fueron inoculados con los fitopatógenos modelos de este estudio, y asperjados como se indica en la actividad anterior. Los extractos de las algas fueron resuspendidos en solución de Metanol/ Acetona (1/1) y posteriormente disueltos en agua hasta lograr la concentración de 0,6 mg/ml (*Ulva* sp) y 2,6 mg/ml (*Mazzaella* sp)

Estudio en arándanos:

En el caso de *B. cinérea* se constató una reducción de incidencia de la pudrición por parte de los extractos algales, tanto a 4°C como 25°C (Figura 2). En el caso de 25°C, los extractos algales tuvieron la misma eficacia de control de enfermedad que el control cloruro de benzalconio, alcanzando un 30% de reducción de la incidencia con respecto al control negativo (agua). A 4°C, todos los extractos presentaron algún nivel de control de la pudrición, *Ulva* sp. y la mezcla de *Ulva* sp. + *Mazzaella* sp redujeron en 10% la pudrición, y solo con *Mazzaella* sp. se obtuvo un nivel de control equivalente a cloruro de benzalconio (desinfectante ambiental comercial toxico).

En el caso de *Penicillium* spp. y *Aspergillus* sp, se observó que a 25°C (Figura 3A y 4A) el efecto de los extractos de *Ulva* sp. y la mezcla de los extractos no mostraron diferencias significativas respecto al control agua, solo con extractos de *Mazzaella* spp. se constata reducción de la incidencia, concluyéndose que a 25°C no tiene efecto. En el caso de 4°C (Figura 3B y 4B) para ambos hongos, los extractos de *Ulva* sp., de *Mazzaella* sp y la mezcla de ambas presentan reducción de la incidencia iguales al ejercido por el cloruro de benzalconio.

Estudio en uvas:

En uvas se observan efectos de los extractos similares a los observados en arándanos, referente al efecto de la temperatura en control de la pudrición. En el caso de frutos inoculados con *B. cinerea*, a 4°C, todos los extractos algales redujeron la incidencia de la pudrición (Figura 5B), pero solo extractos de *Mazzaella* sp. presentaron un efecto de control de la enfermedad igual a cloruro de benzalconio. A 25°C, solo el desinfectante cloruro de benzalconio tuvo efecto de control sobre la pudrición causada por el patógeno.

Los extractos de las algas redujeron la incidencia de *Penicillium* sp. a ambas temperaturas. A los 25°C, todos los extractos redujeron la incidencia y fueron estadísticamente iguales al control positivo (Figura 6A), mientras que a 4°C, todos los extractos logran controlar la

incidencia, sin embargo, ninguno alcanza los niveles de control del cloruro de benzalconio (Figura 6B)

En relación a la enfermedad causada por *Aspergillus* spp. se observa que los extractos de las algas reducen la incidencia del patógeno tanto a 25°C (Figura 7A) como a 4°C (Figura 7B). A 4°C, los extractos aplicados en forma separada poseen un nivel de inhibición estadísticamente igual al ejercido por el cloruro de benzalconio, mientras que a los 25°C tan solo el extracto de *Mazzaella* spp. alcanza este nivel.

Ejemplo 3: Formulación del desinfectante ambiental con extractos de algas activos.

Para la formulación del desinfectante ambiental en base a extractos de algas que se pueda aplicar en presencia de fruta se debe evaluar su efecto en las características organolépticas del fruto, de tal forma que no altere las características del fruto para su comercialización.

Para esto se realizó un diseño completamente aleatorio (DCA) con submuestreo, para ello se dispuso de cuatro réplicas por tratamiento donde cada una tendrá 20 unidades de observación. Las mediciones se realizaron con muestreo aleatorio sobre 5 unidades de observación diferentes para las distintas características organolépticas a evaluar.

Adicionalmente se incluyó una placa de control absoluto (CA). El conjunto total de placas fueron mantenidas en una cámara a 4°C. La aplicación de los extractos de algas y otros tratamientos (Tabla 4) se realizó por medio de aspersiones, cada placa recibió 4 aspersiones de forma uniforme. Las evaluaciones de los frutos expuestos a los diferentes tratamientos se realizaron en el séptimo día tras el inicio del ensayo.

Tabla 4: Tratamientos aplicados sobre frutos

Tratamiento	Extractos	Concentración
T1	<i>Ulvasp</i>	0,6 mg/ml
T2	<i>Mazzaellasp</i>	2,6 mg/ml
T3	<i>Ulvasp+ Mazzaella</i> sp	0,6:2,6 (100 ml c/u)
T4	Control positivo:Cloruro de benzalconio	2,5 mg/ml
T5	Control negativo: Agua	s/n

Firmeza/Turgencia: Este análisis se realizará mediante durómetros, penetrómetros o texturómetro como sigue:

a.- Durómetros medidores de deformación (no destructivos): según el modelo, están basados en el desplazamiento de una pequeñísima bola o de un pequeño cilindro al ser presionados sobre el fruto. Funcionan muy bien con frutos de carne blanda (melocotón, albaricoque) y poseen la ventaja de su reducido tamaño y bajo precio. No son muy precisos en frutos de pepita.

b.- Penetrómetro manual MagnessTaylor (destructivo): consiste en un dinamómetro acoplado a un vástago que se introduce 8 mm en la pulpa de la fruta después de quitar la piel.

c.- Texturómetro de laboratorio (destructivo): equipo con el que se puede hacer el ensayo Magness-Taylor y otros como punción, compresión, corte; aporta mucha más información y es versátil

Sólidos solubles: El contenido de sólidos solubles (CSS) se determina mediante refractómetro (Zapata *et al.* 2014). Para su evaluación se utilizarán 2 g de tejido congelado y molido con nitrógeno líquido, homogenizado en 5 ml de agua destilada y filtrado (Saavedra, 2015) para la obtención de extractos totalmente líquidos en cada una de las réplicas. Con dos gotas de cada extracto se determinará el CSS en grados Brix a 20°C utilizando un refractómetro (Atago).

Este análisis en combinación con medición de firmeza en pulpa sirve para determinar la calidad potencial del fruto (Fedefruta, 2012)

Análisis de acidez: Para realizar la determinación se hará uso de un vaso precipitado de 150 ml donde se colocarán 5 ml de mosto (jugo de la muestra)(1/10, v/v), se añadirán 3-4 gotas de fenolftaleína al 1% para titular con hidróxido de sodio o potasio 0,1 N, el mosto estará en constante agitación lo que dure el proceso (Soyomayor, 1984). Los resultados se expresarán en proporción CSS/AT (Saavedra, 2015).

Peso: Se evaluará el peso de los frutos por cada tratamiento en una balanza calibrada analítica, antes de la aplicación del producto y dos horas luego de la aplicación para determinar variaciones.

Brillo: Colorimetría: El colorímetro AGROCOLOR define una escala de 0 a 100 entre el color más claro y el más oscuro (0 para el más claro y 100 para el más oscuro). Las muestras de de colores a usar son AGROCOLOR® Tipo G trabaja en los matices de verde y AGROCOLOR® Tipo B trabaja en los matices de azul.

Antocianinas: La concentración de antocianina se determinará por el método de pH-diferencial (Giusti y Wrolstad, 2001). Para ello, una alícuota de extracto de antocianina se mezclará con tampón a pH 1.0 de cloruro de potasio 0.025 M (ajustado con ácido clorhídrico) y otra con tampón a pH 4.5 de acetato de sodio 0.4 M (ajustado con ácido acético).

La diferencia en la absorbancia a la longitud de onda de máxima absorción (510 nm) es proporcional al contenido de antocianinas (Wrolstad, 1993). Posteriormente y con el propósito de efectuar la corrección de la medida debida a la presencia de compuestos degradados o sustancias interferentes, se medirá la absorbancia a 700 nm. Las mediciones se realizarán con un espectrofotómetro con un blanco de agua ultra pura. La concentración de las antocianinas se expresarán como mg cianidina-3-glucósido/100mL de extracto de acuerdo a la siguiente expresión (Wrolstad et al., 2005).

$$\Delta A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=1} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH}=4.5} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{AT (mg/L)} = \frac{\Delta A \text{ PM FD } 1000}{\epsilon \cdot l} \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde:

AT: Antocianinas totales

ΔA : Cambio en la absorbancia

PM: Masa molecular para cianidina-3-glucósido, 449.2 g/mol

FD: Factor de dilución

ϵ : Coeficiente de extinción molar para cianidina-3-glucósido, 26900

l: Longitud de paso de celda, 1cm

1000: factor de conversión de gramos a miligramos

Sabor:

1ra) Se realizará de forma previa una degustación de uvas, arándanos y cerezas para reunir datos y definir los parámetros a considerar en la generación de una encuesta. Se recurrirá a cincuenta personas, cada una contará con cinco arándanos que deberá consumir al mismo tiempo y manifestar su percepción.

2da) Definidos los parámetros a medir en la degustación y haciendo uso de escala de preferencia creada previamente, se encuestarán 36 personas con 20 arándanos, 4 arándanos de cada tratamiento.

En las figuras se observó que tanto para Cereza (fig. xx) como para Arándano (fig. xx) tratados con extractos de algas, los frutos presentaron una pérdida de peso significativamente menor que el control negativo y con Cloruro de benzalconio y entre cada tratamiento con extracto de alga no hubo diferencias significativas, indicando que

actúa los extractos mejor incluso que el control sin desinfectante ya que mantiene su peso.

Con respecto al Brillo y acidez los tratamientos con extractos de algas, control negativo y desinfectante comercial no hubo diferencias significativas, indicando que el desinfectante no produce alteraciones de las características comerciales de arándano y cerezas.

En las figuras 8 y 9 se muestran los resultados del análisis organoléptico donde los tratamientos cuantificados son: desinfectante comercial (i); MRQ23 (ii); MRQ24 (iii); MRQ23+MRQ24 (iv); Agua (v); y Control Absoluto (vi).

Según los resultados La formulación final del desinfectante ambiental incluye 0,6 mg/ml de extracto de *Ulva* sp. y 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp. diluido en agua.

Ensayos de disminución de la carga ambiental del desinfectante ambiental en packing.

Se realizará el ensayo en sala de mantención y de descarte de Packing de la región del Biobío. Para esto se tomará muestras ambientales, posteriormente se nebulizará con el desinfectante ambiental formulado

La formulación final del desinfectante ambiental incluye 0,6 mg/ml de extracto de *Ulva* sp. y 2,6 mg/ml de extracto de *Mazzaella* sp. diluido en agua y será aplicado a través de equipo nebulizador X3 para la desinfección ambiental y el equipo móvil MO NEXT 0122 para desinfección de superficies.

Las Muestras ambientales: Para realizar el monitoreo ambiental de fitopatógenos se usará el aerobiocolector 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 μm . Generalmente, en el análisis de ambientes se determinan Gérmenes totales y Mohos, aunque variando el medio de cultivo puede utilizarse para otros microorganismos.

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
Temperatura	37 °C	30 °C
Tiempo	48 horas	72 horas, repetir lectura a los 5 días.

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 m³. El valor NMP se calcula a partir del dato de las ufc obtenidas en la placa, mediante la aplicación de la ley de Feller. Los Recuentos postaplicación del desinfectante deben ser < 2% inicial (UFC/m²).

REIVINDICACIONES

1. Una formulación desinfectante ambiental CARACTERIZADA porque comprende
 - a) 0,4-1,2 mg/ml de extracto de *Ulva sp.*;
 - b) 2,0-3,2 mg/ml de extracto de *Mazzaella sp.*;
 - c) 0.04 – 0.16 % v/v solución Metanol/ Acetona (1/1); y
 - d) agua c.s.p.

2. Una formulación desinfectante ambiental, según reivindicación 1, CARACTERIZADA porque es inócua y es compatible con los cultivos orgánicos.

3. Uso de una formulación desinfectante ambiental, según reivindicación 1, CARACTERIZADA porque su utilización permite desinfectar tanto el aire, como las superficies y evitando el reasentamiento de los fitopatógenos.

4. Uso de una formulación desinfectante ambiental, según reivindicación 3, CARACTERIZADA porque se puede utilizar directamente sobre los frutos.

5. Uso de una formulación desinfectante ambiental, según reivindicación 3, CARACTERIZADA porque su utilización permite la inhibición del crecimiento de fitopatógenos postcosecha como *Botrytis cinerea*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, y *Pseudomonas syringae*.

6. Uso de una formulación desinfectante ambiental, según reivindicación 3, CARACTERIZADA porque su utilización es integrada al proceso de Limpieza y Desinfección en bodegas almacenadoras y empaquetadoras de alimentos.

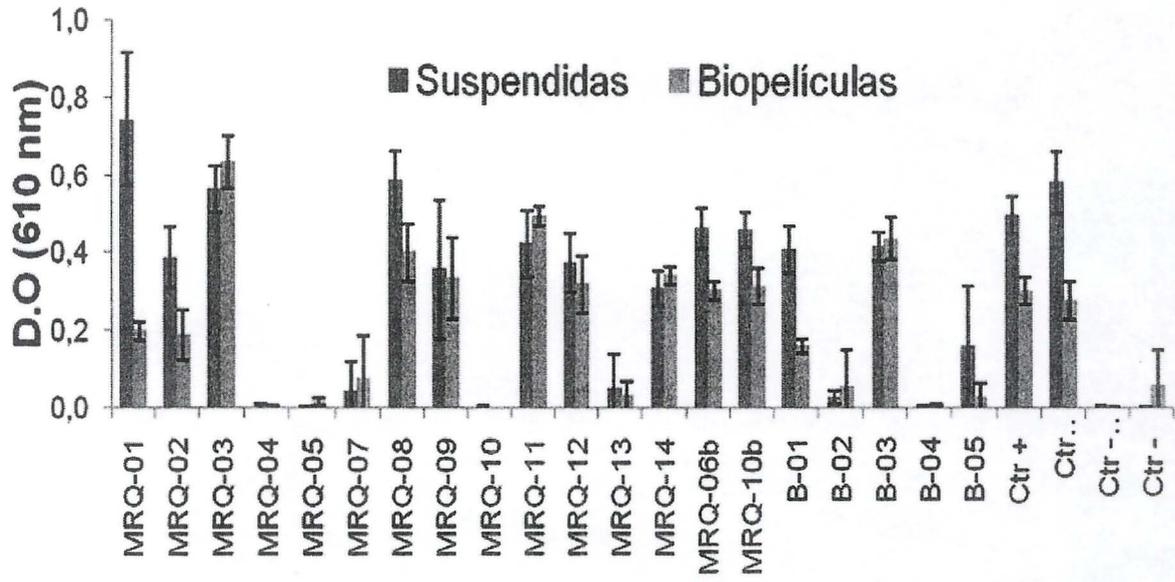
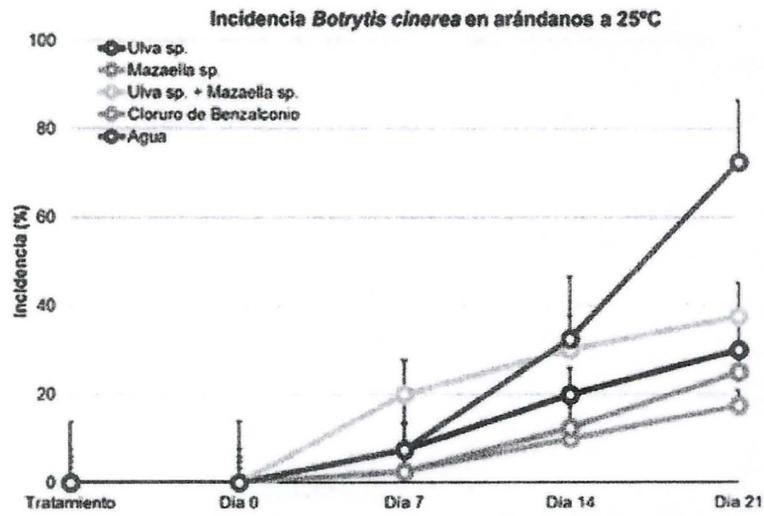


Fig. 1

A



B

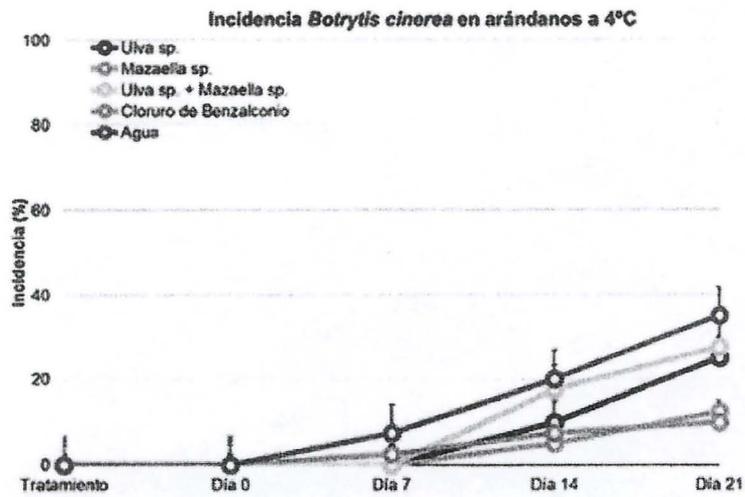
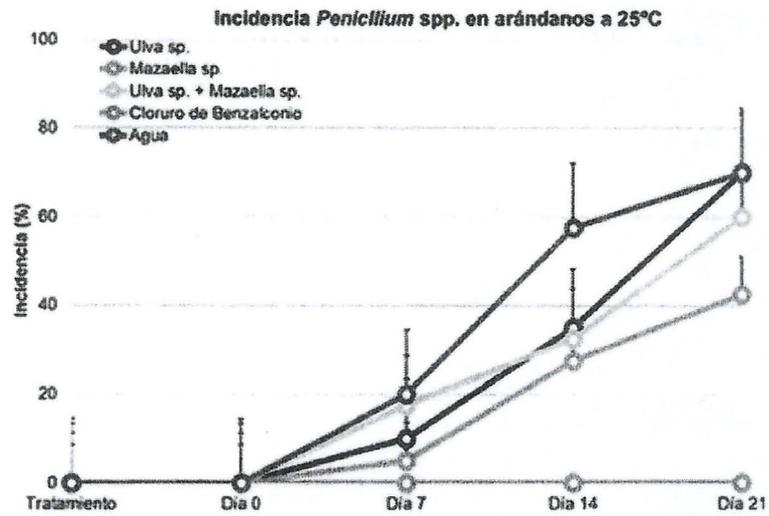


Fig. 2

A



B

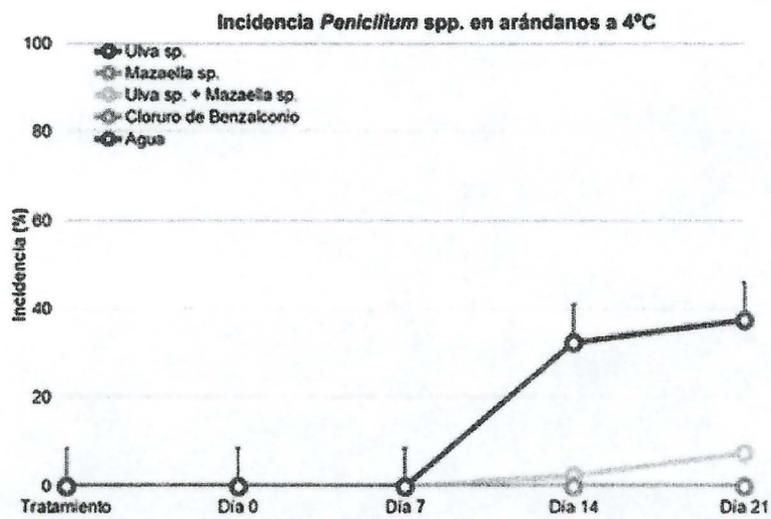


Fig. 3

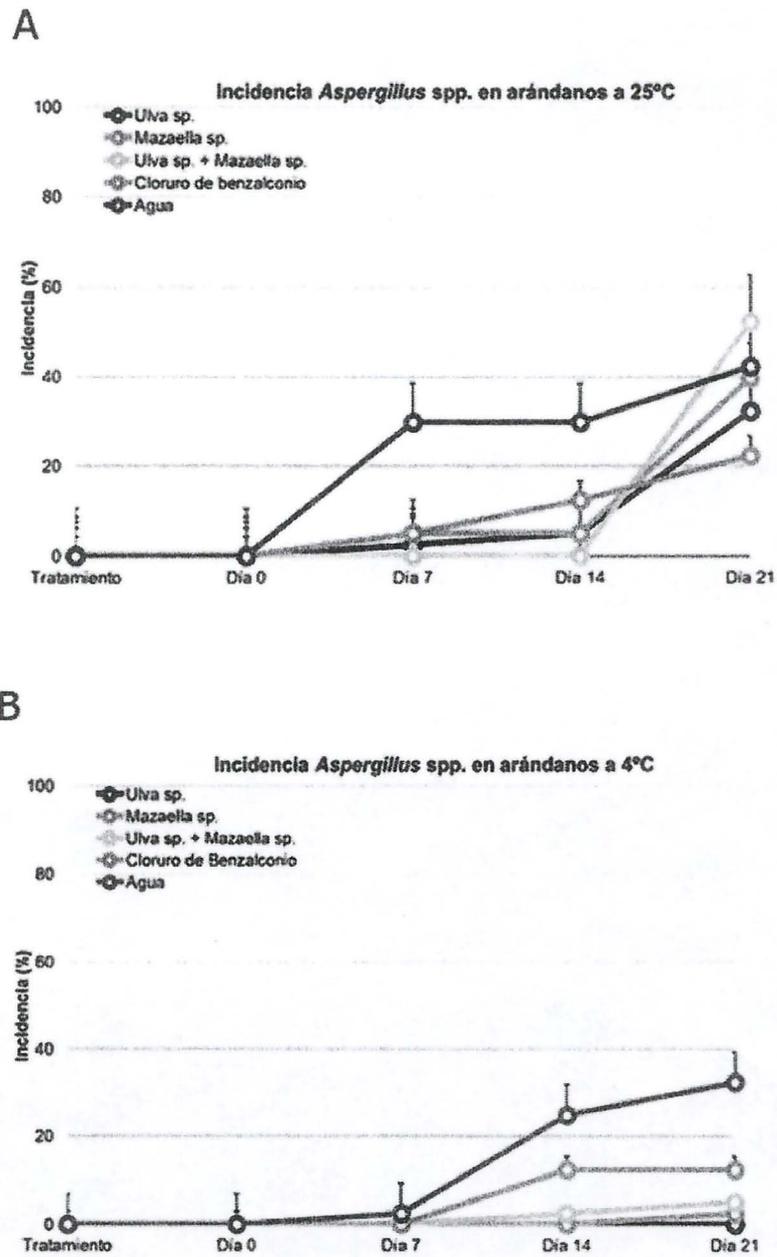
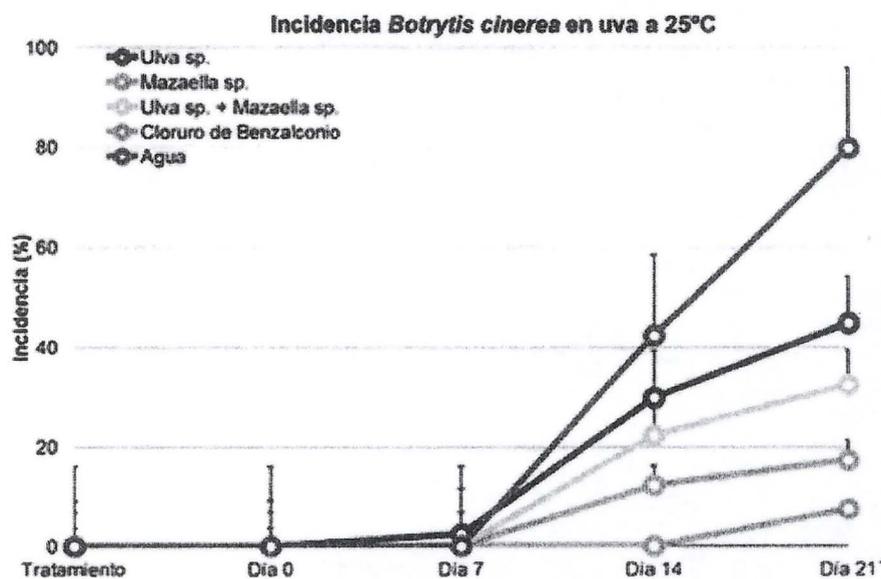


Fig. 4

A



B

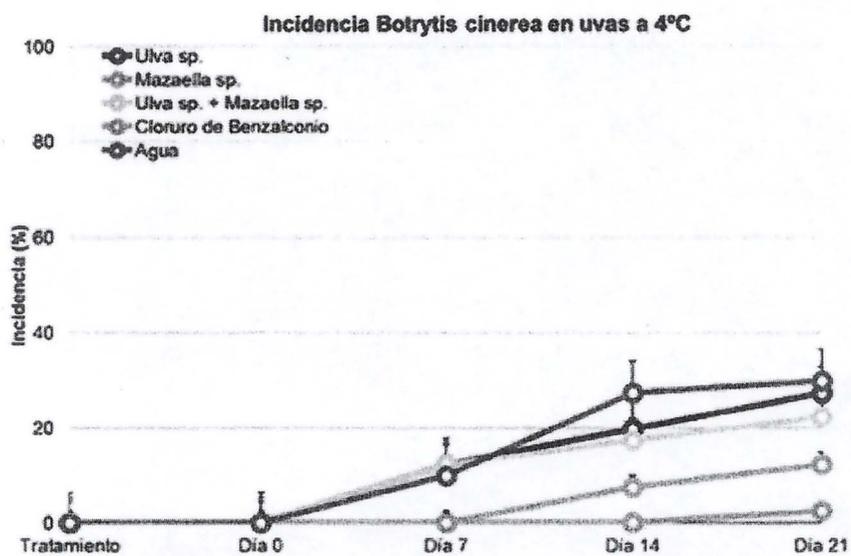
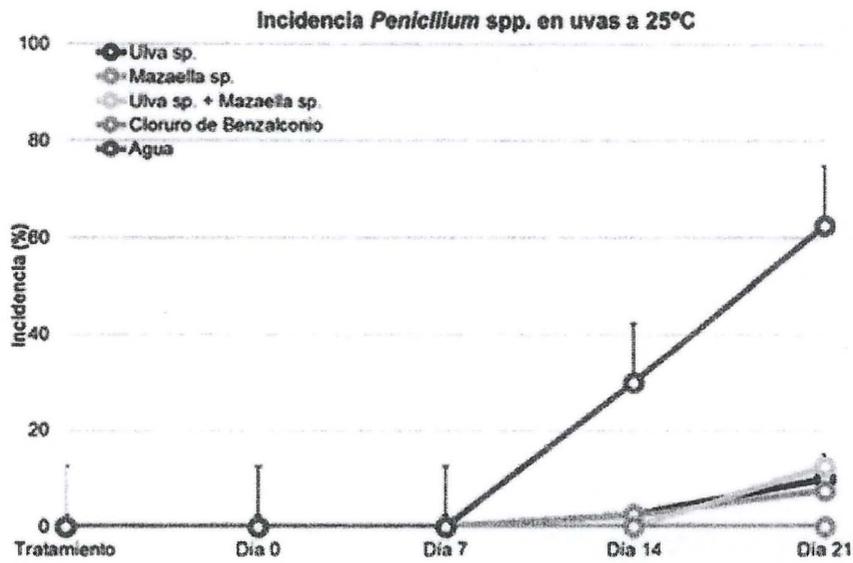


Fig. 5

A



B

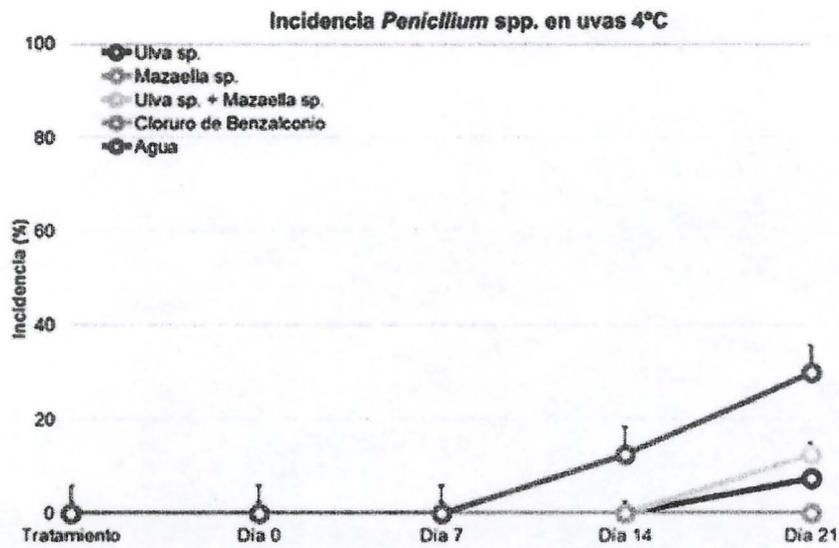
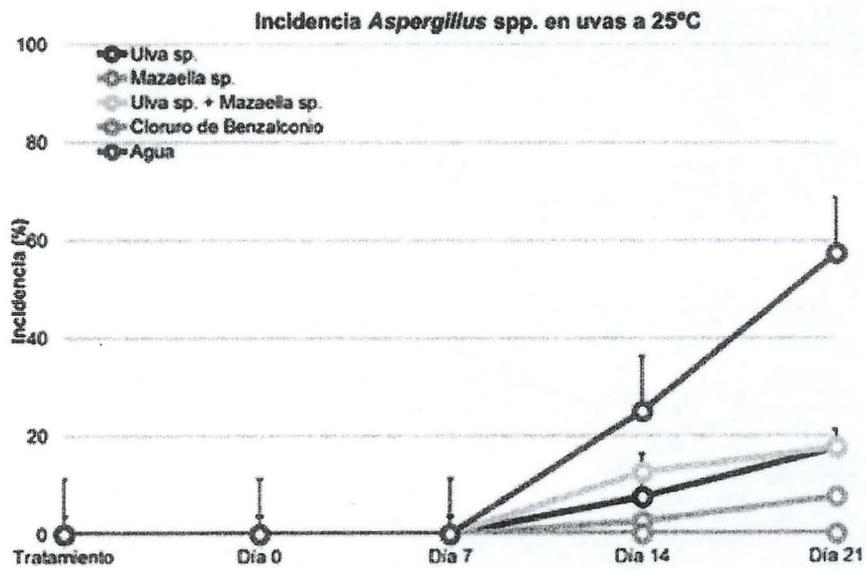


Fig.6

A



B

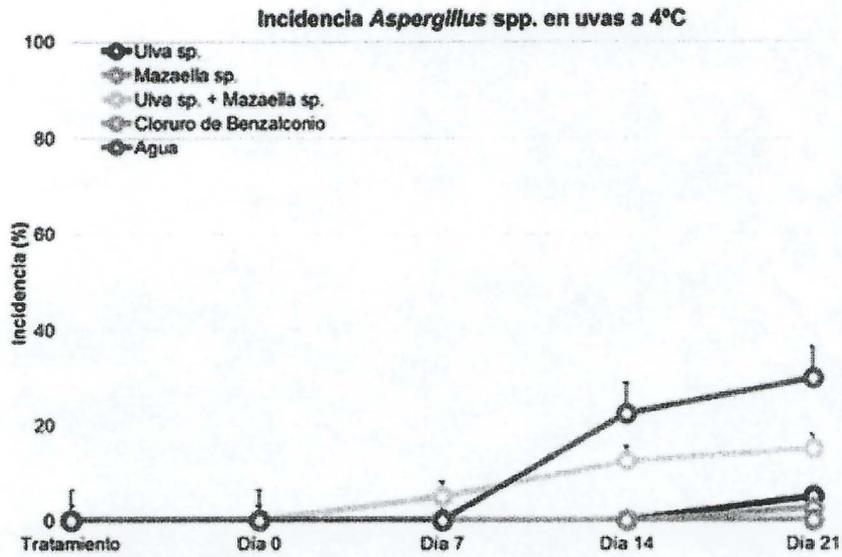


Fig. 7

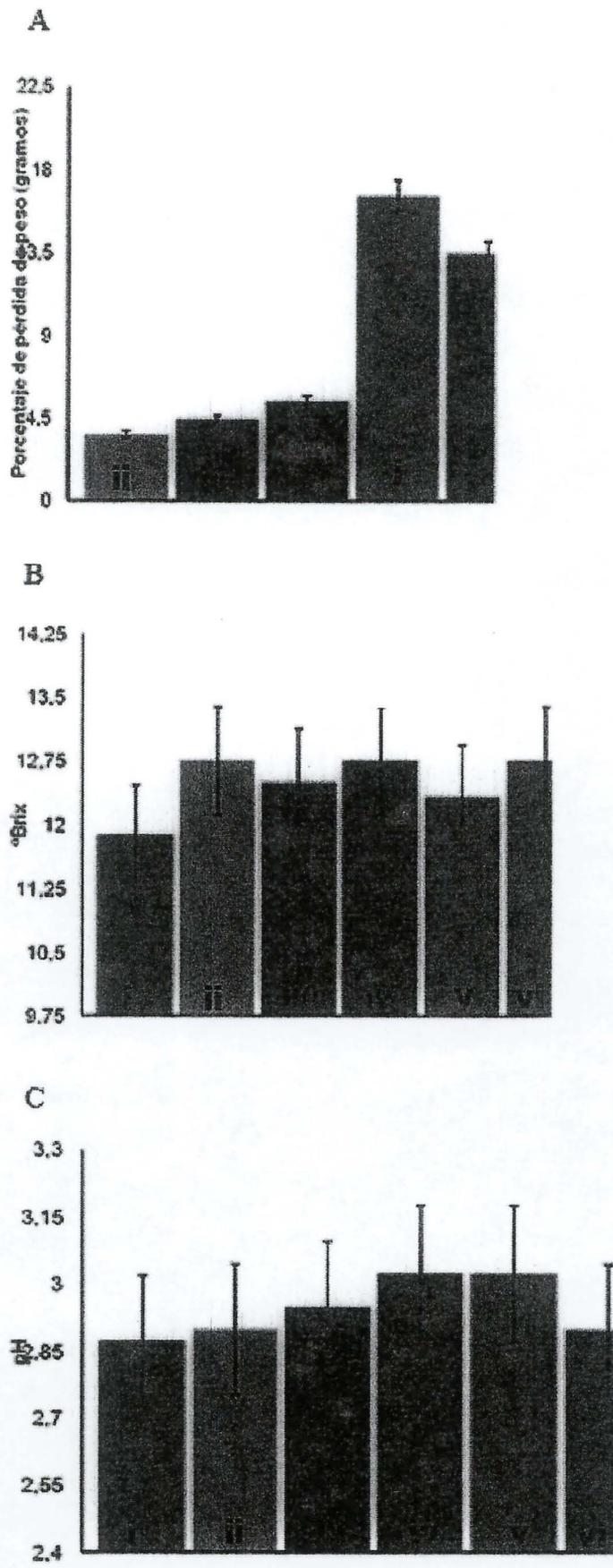


Fig. 8

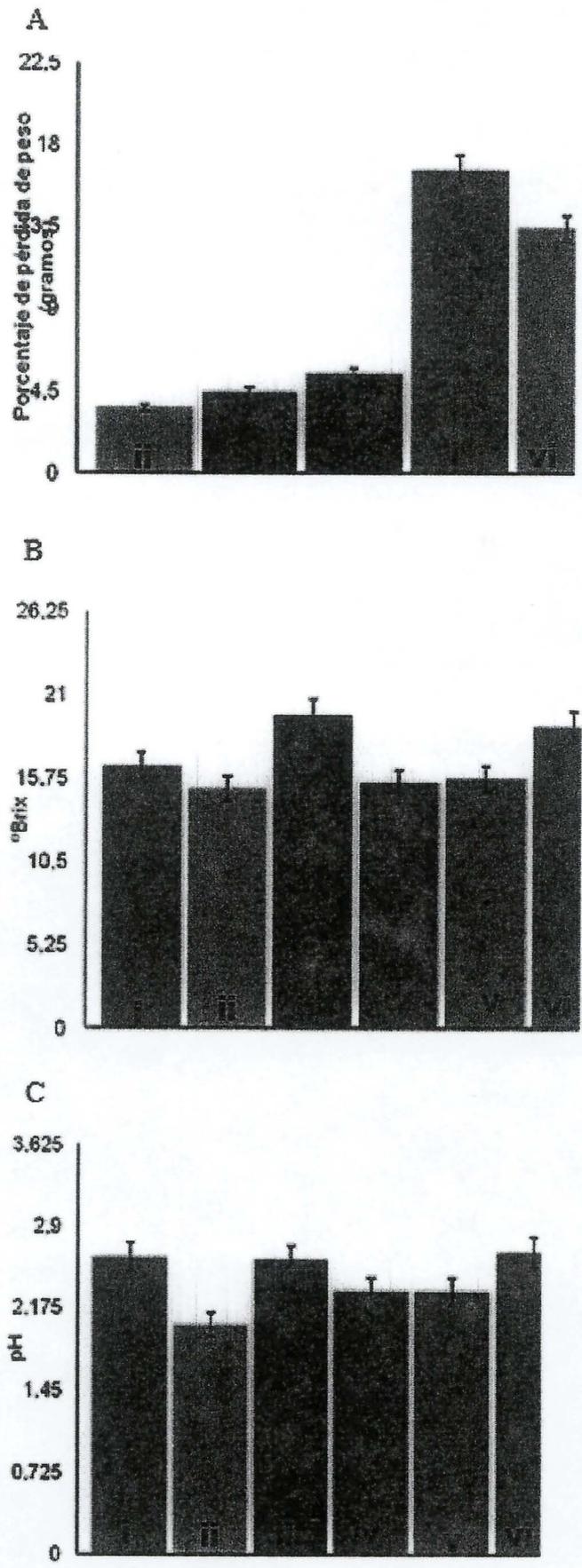


Fig. 9

Anexo 4

EVALUACIÓN ECONÓMICA
Desinfectante Ambiental para control de patógenos postcosecha de fruta
Proyecto FIA PYT 2015-0127

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 determinar cuán atractivo es el proyecto presentado, es necesario evaluarlo económicamente. Esta evaluación involucra el estudio de los flujos de caja esperados durante la vida del proyecto. Inicialmente, se hará una revisión de los aspectos productivos para luego, obtener los flujos de caja y posteriormente, su evaluación.

PRODUCCIÓN

La revisión de los aspectos productivos del proyecto nos proporciona los costos de producción del desinfectante. Inicialmente se debe identificar el proceso productivo para luego, determinar los requerimientos y costos incurridos en insumos y en recursos humanos para la elaboración del desinfectante.

Proceso de Producción

El proceso de producción del desinfectante está compuesto por dos grandes partes: obtención del extracto y obtención del desinfectante. A continuación, se describen las partes de cada una de estas, además del uso de insumos y equipamiento respectivo. Inicialmente los resultados de la obtención del extracto son logrados utilizando como materia prima 9 kilos de alga.

Obtención del extracto

Recolección. En esta etapa se recolectan las algas de las cuales se obtendrá el extracto. En particular, son dos los tipos de algas consideradas para tal efecto: *Mazzaellaminarioides* y *Ulva sp.* Inicialmente se ha obtenido directamente de la fuente, sin embargo, en la medida que se aumente la cantidad de desinfectante a producir, será necesario comprar las algas a recolectores. Son recolectados 9 kilos de alga.

Lavado. En esta etapa las algas son lavadas con la finalidad de eliminar restos indeseados como arena y organismos marinos. Para este fin es necesario el uso de agua potable, el cual se estima en una razón de 5 litros por kilo de alga.

Secado. En esta etapa las algas son secadas y deshidratadas para eliminar el exceso de agua proveniente de la etapa anterior. Para este fin es necesario el uso de una estufa u horno de laboratorio.

Maceración. En esta etapa las algas son dejadas en matraces para su maceración con solventes orgánicos (acetona 50%: metanol 50%). Para este fin son necesarios 9 matraces y 16 litros de cada solvente.

Filtrado. En esta etapa las algas son filtradas para eliminar el exceso de solvente proveniente de la etapa anterior. Para este fin es necesario el uso de un embudo y 10 pliegos de papel filtro.

Concentración. En esta etapa las algas son llevadas al rotavapor para eliminar los solventes restantes y aumentar la concentración del extracto. Para este fin son necesarios 12 matraces y el uso de un rotavapor.

Liofilización. En esta etapa el extracto es secado mediante liofilización. Para este fin es necesario el uso de un liofilizador, el cual implica un gasto fijo de 3 litros de aceite cada 2 meses de operación del equipo.

Almacenado. En esta etapa los extractos son almacenados en un refrigerador a la espera de ser utilizados en la elaboración del desinfectante. Para este fin son necesarios 13,13 viales y el uso de un refrigerador.

Obtención del desinfectante

Preparación. En esta etapa el extracto es disuelto hasta alcanzar una concentración de 3,2 mg/ml (2,6 mg/ml de *Mazzaellaminarioides* y 0,6 mg/ml de *Ulva sp.*). Para este fin es necesario el uso de 49,22 litros de agua potable, y 7,88 mililitros de acetona y de metanol como disolvente; y como conservante, 0,06 kilos de sorbato de potasio.

Envasado. En esta etapa el desinfectante es envasado para su posterior venta. Para este fin es necesario el uso 2,46 envases de 20 litros, y sus respectivas etiquetas.

Requerimientos de Insumos

A continuación, se detalla los requerimientos de insumos necesarios para el procesamiento de 9 kilos de alga, y por tanto, la elaboración de 49,22 litros de desinfectante.

Etapa	Insumo	Unidad	Cantidad
Recolección	Alga	kg	9
Lavado	Agua potable	l	45
Maceración	Matraz	u	9
	Acetona	l	16
	Metanol	l	16
Filtrado	Embudo	u	1
	Papel filtro	u	10
Concentración	Matraz	u	12
Liofilización	Aceite ¹	l	-
Almacenado	Vial	u	13,13
Preparación	Agua potable	l	49,22
	Acetona	l	7,88e-3
	Metanol	l	7,88e-3
	Sorbato de potasio	kg	0,06
Envasado	Envase	u	2,46
	Etiqueta	u	2,46

Tabla 1. Requerimientos de insumos para la elaboración de 49,22 l de desinfectante.

¹Costo fijo.

Ensayos en laboratorio han determinado que los rendimientos de extractos algales son los siguientes:

	Alga (kg)	Extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>Mazzaellalaminarioides</i>	3,66	67,72	1,85
<i>Ulva sp.</i>	3,45	44,65	1,29

Tabla 2. Rendimientos de extractos algales.

Para efectos de cálculo, el rendimiento del alga ha sido considerado como el promedio ponderado de los rendimientos mostrados, obteniendopor tanto, un rendimiento del 1,75%. Con este dato, si se considera un desinfectante con una concentración de 3,2 g/l y una densidad de 1 g/ml aproximadamente, es posible obtener la relaciónentre kilos de alga y kilos de desinfectante, la cual corresponde a 0,18. Es decir, para la obtención de 1 kilo de desinfectante es necesario el uso de 0,18 kilos de alga (180 gramos de alga).

Con la información anterior y lo observado en laboratorio, es posible proyectar los requerimientos de insumos para la obtención de un kilo de desinfectante.

Etapa	Insumo	Unidad	Cantidad
Recolección	Alga	kg	0,18
Lavado	Agua potable	l	0,91
Maceración	Matraz	u	0,18
	Acetona	l	0,33
	Metanol	l	0,33
Filtrado	Embudo	u	0,02
	Papel filtro	u	0,20
Concentración	Matraz	u	0,24
Liofilización	Aceite	l	-
Almacenado	Vial	u	0,27
Preparación	Agua potable	l	1,00
	Acetona	l	1,60e-4
	Metanol	l	1,60e-4
	Sorbato de potasio	kg	1,22e-3
Envasado	Envase	u	0,05
	Etiqueta	u	0,05

Tabla 3. Requerimientos de insumos para la elaboración de 1 kg de desinfectante.

Requerimientos de Recursos Humanos

A continuación, se detalla los requerimientos de recursos humanos necesarios para la elaboración de desinfectante.

Recursos Humanos	Cantidad	Costo Mensual (\$)
Administrador	1	1.200.000
Administrativo	1	650.000
Técnico	2	1.000.000
Vendedor	2	600.000 ²
Total		3.450.000

Tabla 4. Requerimientos de recursos humanos.

² Sueldo base.

Para efectos de cálculo de los costos de producción, solo se debe considerar el costo de los técnicos, ya que solo estos forman parte de la mano de obra directa.

Costos de Producción

Considerando lo anterior, a continuación se detallan los costos asociados a cada insumo para la elaboración de 1 kilo de desinfectante.

Insumo ³	Unidad	Cantidad	Costo Unitario	Costo Total
Alga	kg	0,18	300	54,00
Agua potable	l	1,91	0,395	0,75
Matraz de vidrio 5 l	u	1,83e-3	31.943	58,46
Acetona 1 l	l	0,33	8.776	2.896,08
Metanol 1 l	l	0,33	4.225	1.394,25
Embudo	u	2,03e-4	6.259	1,27
Pliego de papel filtro 3 mm	u	0,20	1.433	286,60
Matraz de vidrio de fondo redondo 250 ml	u	2,44e-3	2.787	6,80
Vial ámbar con tapa rosca 12 ml	u	0,27	332	89,64
Sorbato de potasio 1 kg	kg	1,22e-3	19.900	24,28
Envase de plástico 20 l	u	0,05	2.750	137,50
Etiqueta adhesiva	u	0,05	90	4,50
Total Insumos				\$ 4.954,13
Técnico			125	125,00
Total Recursos Humanos				\$ 125,00
Total				\$ 5.079,13

Tabla 5. Costos de producción para la elaboración de 1 kg de desinfectante.

Del resultado anterior, se obtiene que el costo para producir 1 kilo de desinfectante es igual a \$5.079,13.

CONSTRUCCIÓN FLUJOS DE CAJA

A continuación, se muestra la estructura básica que sigue un flujo de caja.

+ Ingresos afectos a impuestos
- Egresos afectos a impuestos
- Gastos no desembolsables
= Utilidad Antes de Impuesto
- Impuesto
= Utilidad Después de Impuesto
+ Ajustes por gastos no desembolsables
- Egresos no afectos a impuestos
= Flujo de Caja

Tabla 6. Estructura general de un flujo de caja.

³ Material de vidrio puede utilizarse hasta 100 veces.

Tras identificar cada componente, se procede a la construcción de los flujos de caja para medir la rentabilidad del proyecto.

El horizonte de evaluación se ha determinado en 10 años. Este periodo de tiempo representa fielmente un ciclo del proyecto, marcado por el fin de la vida útil contable de algunos activos, lo que implica venderlos y reinvertir en equipamiento nuevo, generando nuevos movimientos de caja.

Ingresos Afectos a Impuestos

Están constituidos por el ingreso por venta de productos y el ingreso por venta de activos.

Ingreso por venta de productos

Para obtener el primer componente, es necesario conocer el precio de venta y el volumen de producción.

- Precio de venta

Para la determinación del precio de venta es necesario considerar dos aspectos: los costos de producción y los factores competitivos. El primero de ellos, se basa en calcular el costo unitario de producción para obtener un precio base. Evidentemente el precio del producto debe ser mayor a este valor en una cierta cantidad (margen) definida. El segundo, se basa en realizar *benchmarks* de la competencia, para obtener un precio de referencia con el cual se maneja el mercado. A continuación, se muestran otros desinfectantes y sus respectivos precios.

Desinfectante	Precio (\$)
Ácido láctico	7.000
Ácido peracético	2.200
Amonio cuaternario	1.900

Tabla 7. Precio por kilo de otros desinfectantes.

Si se aplica lo anteriormente mencionado, en la primera situación se obtiene un costo unitario de producción de \$5.079. En la segunda situación, se puede apreciar que los desinfectantes inorgánicos son bastante más baratos. Sin embargo, se debe tomar como verdadera referencia el desinfectante a base de ácido láctico, ya que por sus características, se asemeja más al desinfectante propuesto.

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que al menos se debe cobrar un precio de \$5.079 (precio base), y si se desea ser competitivo, un precio menor que \$7.000 (precio de referencia). Teniendo esto en consideración, se determina que el precio del desinfectante sea igual a \$6.200, obteniendo un margen de 18,1%.

- Volumen de producción

Para el primer año de operación se ha estimado una producción de 96 toneladas, esto equivale a 8.000 kilos mensuales. Para los años posteriores, se ha utilizado como base las proyecciones del crecimiento del país para el periodo del proyecto, las cuales indican un crecimiento promedio del 3,68% anual. Esto nos sugiere un incremento de ventas del

3,68% por año. Considerando este dato, se estima un incremento del volumen de producción del 5% anual.

Año	Volumen de Producción (kg)
1	96.000
2	100.800
3	105.840
4	111.132
5	116.689
6	122.523
7	128.649
8	135.082
9	141.836
10	148.928

Tabla 8. Volúmenes de producción proyectados.

Finalmente, con el precio de venta y el volumen de producción ya definidos, se puede obtener el ingreso por venta de productos tal como se muestra a continuación.

Año	Ingreso por Venta de Productos (\$)
1	595.200.000
2	624.960.000
3	656.208.000
4	689.018.400
5	723.469.320
6	759.642.786
7	797.624.925
8	837.506.172
9	879.381.480
10	923.350.554

Tabla 9. Ingresos por venta de productos proyectados.

Ingreso por venta de activos

Para obtener el segundo componente, es necesario conocer el nivel de inversión de los activos vendidos (por haber cumplido su vida útil), y un porcentaje estimado de lo que se pretende recuperar al vender. Si se considera que es posible recuperar un 10% de lo invertido, se obtiene lo siguiente en el año 9.

Equipo	Vida Útil (años)	Costo (\$)	Ingreso por Venta de Equipos (\$)
Horno de laboratorio	9	2.331.194	233.119
Liofilizador	9	2.389.805	238.981
Refrigerador	9	219.990	21.999
Rotavapor	9	1.890.000	189.000

Total	6.830.989	683.099
-------	-----------	---------

Tabla 10. Ingreso por venta de equipos.

Además, se debe considerar los ingresos obtenidos por las licencias otorgadas, los cuales se estiman que correspondan al 3% del ingreso por venta de productos.

Año	Ingreso por Venta de Licencias (\$)
1	17.856.000
2	18.748.800
3	19.686.240
4	20.670.552
5	21.704.080
6	22.789.284
7	23.928.748
8	25.125.185
9	26.381.444
10	27.700.517

Tabla 11. Ingresos por venta de licencias proyectados.

Finalmente, con el ingreso por venta de equipos y licencias ya definido, se puede obtener el ingreso por venta de activos tal como se muestra a continuación.

Año	Ingreso por Venta de Activos (\$)
1	17.856.000
2	18.748.800
3	19.686.240
4	20.670.552
5	21.704.080
6	22.789.284
7	23.928.748
8	25.125.185
9	27.064.543
10	27.700.517

Tabla 12. Ingresos por venta de activos proyectados.

Egresos Afectos a Impuestos

Están constituidos por los costos fijos y variables de producción, y los gastos de administración y ventas. Para obtener el primer componente, es necesario considerar aquellos costos que son independientes del nivel de producción. Los costos fijos a considerar son los costos fijos de los servicios básicos, aceite del liofilizador y mantenimiento (5% inversión en equipos). Para obtener el segundo componente es necesario considerar el volumen de producción y el costo unitario de producción; mientras que, para obtener el tercer componente, es necesario considerar remuneraciones y comisiones (5% ingreso por venta de productos), gastos destinados a movilización, viáticos y marketing, arrendamiento de galpón, y patentamiento, este último con un valor de \$2.500.000 un único año.

Insumo	Costo Fijo Mensual (\$)	Costo Fijo Anual (\$)
Agua	16.263	195.156
Electricidad	1.052	12.624
Aceite	29.850	358.200
Mantenimiento	28.462	341.549
Total	75.627	907.529

Tabla 13. Costos fijos de producción.

Año	Costo Variable (\$)
1	487.584.000
2	511.963.200
3	537.561.360
4	564.439.428
5	592.661.399
6	622.294.469
7	653.409.193
8	686.079.653
9	720.383.635
10	756.402.817

Tabla 14. Costos variables de producción proyectados.

Año	Comisiones (\$)
1	29.760.000
2	31.248.000
3	32.810.400
4	34.450.920
5	36.173.466
6	37.982.139
7	39.881.246
8	41.875.309
9	43.969.074
10	46.167.528

Tabla 15. Comisiones proyectadas.

Gastos	Costo Mensual (\$)	Costo Anual (\$)
Remuneraciones	2.450.000	29.400.000
Movilización y viáticos	1.000.000	12.000.000
Marketing	1.400.000	16.800.000
Arrendamiento	2.000.000	24.000.000
Total	6.850.000	82.200.000

Tabla 16. Gastos de administración y ventas.

Gastos No Desembolsables

Están constituidos por la depreciación (lineal) de la totalidad de los activos y el valor libro de los que son vendidos. Para obtener el primer componente, es necesario conocer el nivel de inversión respectivo y la vida útil contable según el tipo de activo. A continuación, se muestra la depreciación anual por activos.

Activo	Vida Útil (años)	Costo (\$)	Depreciación Anual (\$)
Horno de laboratorio	9	2.331.194	259.022
Liofilizador	9	2.389.805	265.534
Refrigerador	9	219.990	24.443
Rotavapor	9	1.890.000	210.000
Total		6.830.989	758.999

Tabla 17. Depreciación anual activos.

Para obtener el segundo componente, es necesario trabajar con la información anterior, considerando el nivel de inversión de los activos que se venden al inicio del año 9, y su depreciación anual. En el caso propuesto, es evidente que el valor libro es igual a 0, ya que los activos se han depreciado completamente. Sin embargo, en caso de que un activo se venda antes de cumplir su vida útil, el valor libro es calculado por la siguiente expresión:

$$\text{Valor Libro} = \text{Inversión} - \text{Depreciación Acumulada}^4$$

Impuesto

Está constituido por el Impuesto de Primera Categoría, impuesto aplicado sobre las utilidades de las empresas, el cual corresponde al 25%. No obstante, por efecto de la Reforma Tributaria 2014, este valor crecerá gradualmente. Frente a esta situación, por simplicidad, se ha optado por trabajar con este único valor. A continuación, se muestra el desembolso por concepto de impuestos.

Año	Impuesto (\$)
1	2.333.248
2	4.154.492
3	5.410.548
4	6.729.407
5	8.114.209
6	9.568.251
7	11.094.995
8	12.698.077
9	14.552.087
10	16.148.709

Tabla 18. Impuestos proyectados.

Egresos no afectos a impuestos

Está constituido por las diversas inversiones que se realizan durante el horizonte de evaluación, como por ejemplo la inversión inicial, la inversión en capital de trabajo y la inversión de reemplazo. Para el caso propuesto, la inversión inicial es igual a \$16.989.249, y corresponde a la inversión realizada en equipos e insumos. La inversión en capital de trabajo es igual a \$20.276.881, y corresponde a los costos de operación de 3 meses. Ambas inversiones son realizadas en el año 0. Por otro lado, la inversión de reemplazo es igual a \$6.830.989, y corresponde a la inversión realizada en activos que

⁴ Es la depreciación que se ha acumulado por el transcurso de los años. Se calcula como la depreciación anual por la cantidad de años hasta su venta.

han cumplido con su vida útil durante el horizonte de evaluación, y por tanto, deben ser reemplazados. Como se puede suponer, esta inversión es realizada en el año 9.

Inversión	Costo (\$)
Inversión inicial	16.989.249
Inversión en capital de trabajo	20.276.881
Inversión de reemplazo	6.830.989
Total año 0	37.266.130
Total año 9	6.830.989

Tabla 19. Inversiones proyectadas.

FLUJOS DE CAJA

Luego de haber calculado cada componente, se pueden construir los flujos de caja. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

(miles de \$)	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ingresos	-	595.200	624.960	656.208	689.018	723.469	759.643	797.625	837.506	879.381	923.351
Venta activo	-	17.856	18.749	19.686	20.671	21.704	22.789	23.929	25.125	27.065	27.701
Costos fijos producción	-	908	908	908	908	908	908	908	908	908	908
Costos variables producción	-	487.596	511.976	537.575	564.454	592.677	622.310	653.426	686.097	720.402	756.422
Gastos administración y venta	-	114.460	113.448	115.010	116.651	118.373	120.182	122.081	124.075	126.169	128.368
Depreciación	-	759	759	759	759	759	759	759	759	759	759
Utilidad Antes de Impuesto	-	9.333	16.618	21.642	26.918	32.457	38.273	44.380	50.792	58.208	64.595
Impuesto	-	2.333	4.154	5.411	6.729	8.114	9.568	11.095	12.698	14.552	16.149
Utilidad Después de Impuesto	-	7.000	12.463	16.232	20.188	24.343	28.705	33.285	38.094	43.656	48.446
Depreciación	-	759	759	759	759	759	759	759	759	759	759
Inversión inicial	16.989	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inversión en capital de trabajo	20.277	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inversión de reemplazo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6.831	-
Flujo de Caja	-37.266	7.759	13.222	16.991	20.947	25.102	29.464	34.044	38.853	37.584	49.205

Tabla 20. Detalle flujos de caja.

ANÁLISIS FLUJOS DE CAJA

Tras la construcción de los flujos de caja, es necesario aplicar ciertos métodos que permitan evaluar los resultados obtenidos.

Valor actual neto

Este método consiste en valorar en moneda actual, los flujos de caja futuros obtenidos con el proyecto.

El criterio de decisión de este método es:

Si $VAN \geq \$ 0$, entonces el proyecto debe aceptarse

Para el proyecto, considerando una tasa de descuento del 12%, se obtiene un VAN igual a \$85.059.522. A partir de estos resultados se puede concluir que el proyecto debiera aceptarse.

Tasa interna de retorno

Este método consiste en evaluar el proyecto en función de una única tasa de rendimiento por periodo, con la cual la totalidad de los flujos de caja futuros, expresados en moneda actual, son exactamente iguales a la inversión en el periodo 0.

El criterio de decisión de este método es:

Si $TIR \geq i$, entonces el proyecto debe aceptarse

donde i es la mínima tasa de rendimiento aceptada. Para el proyecto, se obtiene una TIR igual a 43,88%. Al ser contrastados con una tasa de rendimiento del 12%, se puede concluir que el proyecto debiera aceptarse.

Indicador	Resultado
VAN	\$ 85.059.522
TIR	43,88 %

Tabla 21. Resultados de los indicadores.

EVALUACIÓN ECONÓMICA CON Y SIN PROYECTO

Desinfectante Ambiental para control de patógenos postcosecha de fruta Proyecto FIA PYT 2015-0127

En esta situación, el proyecto es evaluado desde el punto de vista del usuario, el exportador de fruta. Dado que para cada negocio hay ingresos y egresos diferentes, solo va ser considerado los aspectos relevantes del problema, para todo lo demás se asume constante. Los factores más relevantes son: precio, pérdidas, costo del desinfectante y aspectos comerciales.

CASO 1: USO DE DESINFECTANTE TRADICIONAL

Este caso corresponde a la situación actual, es decir, utilizando un desinfectante ya existente en el mercado. El desinfectante escogido es el cloruro de benzalconio, el cual pertenece a la familia de los desinfectantes conocidos como amonios cuaternarios.

Para efectos de cálculo son usados los siguientes datos:

Producto : Cerezas
Precio : \$ 2.290 por kilo
Cantidad : 277.000 kilos (primer año con un incremento anual de 5 %)
Desinfectante : Cloruro de benzalconio
Precio : \$ 1.900 por kilo
Rendimiento : 10 ml/m³

Se ha escogido un volumen de producción de 277.000 kilos por año, ya que corresponde a la carga máxima que aceptan diez container estándar tipo reefer, con un volumen de 59,3m³ cada uno.

Año	Volumen de Producción (kg)
1	277.000
2	290.850
3	305.393
4	320.662
5	336.695

Tabla 22. Volumen de producción.

Con estos datos, se obtienen los ingresos del exportador como se muestra a continuación.

Año	Ingresos (\$)
1	507.464.000
2	532.837.200
3	559.479.060
4	587.453.013
5	616.825.664

Tabla 23. Ingresos.

Es importante señalar que las pérdidas debido al transporte pueden llegar hasta el 40%. Gran parte de esta pérdida es producto del daño mecánico. De igual manera, se estima que el 20% de la producción puede ser rechazada por efecto de fitopatógenos.

Por otra parte, de forma arbitraria, se determina que los costos fijos son iguales a \$207.000.000, y los costos variables corresponden al 50% de los ingresos de la producción estipulada (sin pérdidas), además del costo del desinfectante. Por consecuencia se obtiene la siguiente tabla.

Año	Egresos (\$)
1	524.176.267
2	540.035.080
3	556.686.834
4	574.171.176
5	592.529.735

Tabla 24. Egresos.

Flujos de Caja

Luego de haber calculado los componentes, se pueden construir los flujos de caja. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

(miles de \$)	0	1	2	3	4	5
Ingresos	-	507.464	532.837	559.479	587.453	616.826
Egresos	-	524.178	540.037	556.689	574.173	592.532
Utilidad Antes de Impuesto	-	16.714	7.200	2.790	13.280	24.294
Impuesto	-	4.179	1.800	698	3.320	6.073
Utilidad Después de Impuesto	-	12.536	5.400	2.093	9.960	18.220
Flujo de Caja	-	12.536	5.400	2.093	9.960	18.220

Tabla 25. Detalle flujos de caja.

Análisis Flujos de Caja

Tras la construcción de los flujos de caja, son aplicados los métodos VAN y TIR, para finalmente evaluar los resultados obtenidos.

Valor actual neto

Para esta situación, considerando una tasa de descuento del 12%, se obtiene un VAN igual a \$2.375.677. A partir de estos resultados se puede concluir que esta situación resulta atractiva.

Tasa interna de retorno

Para esta situación, se obtiene una TIR igual a 17,68%. Al ser contrastados con una tasa de rendimiento del 12%, se puede concluir que esta situación resulta atractiva.

Indicador	Resultado
VAN	\$ 2.375.677
TIR	17,68 %

Tabla 26. Resultados de los indicadores.

CASO 2: USO DE DESINFECTANTE A BASE DE MACROALGAS

Este caso corresponde a la situación proyectada, es decir, utilizando el desinfectante a base de macroalgas.

Para efectos de cálculo son usados los siguientes datos:

Producto : Cerezas
Precio : \$ 2.519 por kilo
Cantidad : 249.300 kilos (primer año con un incremento anual de 1 %)
Desinfectante : Extracto de algas
Precio : \$ 6.200 por kilo
Rendimiento : 10 ml/m³

Como se puede observar, el precio del producto ha aumentado en un 10% de la situación anterior debido a que sus características son más beneficiosas y por tanto son mayormente valoradas. Sin embargo, es un desinfectante más caro y nuevo, por lo que algunos exportadores pueden no estar dispuestos a pagar más ni correr riesgos. Este hecho puede afectar en las ventas, traduciéndose en un 10% menos de producción y un incremento de ventas de solo un 1%. Por otra parte, en comparación con el cloruro de benzalconio, el desempeño del desinfectante a base de macroalgas mejora en al menos un 15%, logrando así menos pérdidas y por ende, mayores ingresos.

Año	Volumen de Producción (kg)
1	249.300
2	251.793
3	254.311
4	256.854
5	259.423

Tabla 27. Volumen de producción.

Con estos datos, se obtiene los ingresos del exportador como se muestra a continuación.

Año	Ingresos (\$)
1	518.771.622
2	523.959.338
3	529.198.931
4	534.490.921
5	539.835.830

Tabla 28. Ingresos.

De la misma forma que en la situación anterior, se determina que los costos fijos son iguales a \$207.000.000, y los costos variables corresponden al 50% de los ingresos, además del costo del desinfectante. Por consecuencia se obtiene la siguiente tabla.

Año	Egresos (\$)
1	521.008.288
2	524.148.968
3	527.321.085
4	530.524.955
5	533.760.896

Tabla 29. Egresos.

Flujos de Caja

Luego de haber calculado los componentes, se pueden construir los flujos de caja. A continuación, se muestran los resultados obtenidos.

(miles de \$)	0	1	2	3	4	5
Ingresos	-	518.772	523.959	529.199	534.491	539.836
Egresos	-	521.008	524.149	527.321	530.525	533.761
Utilidad Antes de Impuesto	-	2.237	190	1.878	3.966	6.075
Impuesto	-	559	47	469	991	1.519
Utilidad Después de Impuesto	-	1.677	142	1.408	2.974	4.556
Flujo de Caja	-	1.677	142	1.408	2.974	4.556

Tabla 30. Detalle flujos de caja.

Análisis Flujos de Caja

Tras la construcción de los flujos de caja, son aplicados los métodos VAN y TIR, para finalmente evaluar los resultados obtenidos.

Valor actual neto

Para esta situación, considerando una tasa de descuento del 12%, se obtiene un VAN igual a \$3.452.640. A partir de estos resultados se puede concluir que esta situación resulta atractiva.

Tasa interna de retorno

Para esta situación, se obtiene una TIR igual a 65.94%. Al ser contrastados con una tasa de rendimiento del 12%, se puede concluir que esta situación resulta atractiva.

Indicador	Resultado
VAN	\$ 3.452.640
TIR	65.94 %

Tabla 31. Resultados de los indicadores.

Al comparar los resultados obtenidos en las dos situaciones, se puede concluir que en las condiciones presentadas el uso de desinfectante a base de macroalgas es una mejor alternativa. Usando este desinfectante, ambos indicadores muestran una mejoría, en particular, el VAN mejora en \$1.076.963 (aumento del 45,3%) y la TIR mejora en 48,26% (aumento del 273,0%).

Esto se puede explicar ya que los aspectos positivos de esta opción (un mayor precio de producto y menores pérdidas) superan los aspectos negativos (disminuciones de venta y

costo mayor de desinfectante). Esto induce a pensar, además, que los indicadores son más sensibles a las variaciones de precio que de los demás factores.

Reporte de Posibles Licenciarios

Con el fin de llevar a cabo la totalidad de las actividades del objetivo específico número 6, atendiendo al desarrollo de sus indicadores, es que se ha procedido a realizar una "prospección de potenciales licenciarios", de la cual se desprenden las siguientes entidades:

ECOMBIO LIMITADA

Vidal y Urrutia limitada tiene directamente o por intermedio de terceros, individualmente o en conjunto con otros, dentro del territorio de la república de Chile o en el extranjero los siguientes objetivos:

- a) Diseño, construcción, asesoría técnica y/ o administración de procesos biotecnológicos de tratamiento de residuos biológicos o bacteriológicos de agua, gases y sólidos, incluyendo suelos, lodos y residuos, así como de cualquier otro elemento que directamente o indirectamente esté relacionado con el medio ambiente.
- b) La prestación de servicios de laboratorio y la realización de todo tipo de análisis físicos, químicos, biológicos o bacteriológicos de agua, gases y sólidos, incluyendo suelos, lodos y residuos, así como de cualquier otro elemento que directamente o indirectamente esté relacionado con el medio ambiente y su protección.
- c) El estudio, desarrollo, implementación, construcción y explotación de sistemas de solución para el manejo de agua, gases y sólidos, incluyendo suelos, lodos y residuos, así como de cualquier otro elemento que directamente o indirectamente esté relacionado con el medio ambiente y su protección.
- d) Representación de empresas de biotecnología tanto nacional como extranjera.
- e) La importación y comercialización de toda clase de bienes y servicios y la explotación de los mismos y en especial la compraventa o arrendamiento de materiales, equipos, vehículos, maquinarias e insumos para el desarrollo de toda clase de actividades vinculadas con la prestación de servicios sanitarios o de otra naturaleza, de disposición de residuos y de laboratorio y la prestación de toda clase de asesorías y otros servicios del área, como asimismo la representación en Chile de fabricantes o comercializadoras de equipos, maquinarias o insumos para la prestación de servicios de biotecnología y laboratorio.
- f) La realización de inversiones en toda clase de bienes muebles e inmuebles, sean estos corporales e incorporeales, incluyendo la adquisición de acciones en sociedades anónimas, sociedades por acciones, derechos en sociedades de personas, debentures, bonos, efectos de comercio y toda clase de valores mobiliarios en instrumentos de inversión y la administración de estas inversiones y sus frutos.
- g) La participación como inversionista socio, participe o asesora en toda clase de proyectos y el desarrollo de los mismos por cuenta propia o ajena o en asociación con terceros.
- h) La realización de todas aquellas actividades comerciales o industriales que fueren complementarios o anexas al giro principal.

Debido a la gama de objetivos, todos concernientes al desarrollo de biotecnología y su aplicación en temáticas productivas, es que se ha decidido llevar a cabo las gestiones concernientes a una "Opción de Licencia" entre la UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN y la empresa Asociada al proyecto ECOMBIO LIMITADA. Esto, complementado a su vez, con un "ACUERDO DE TRANSFERENCIA DE MATERIAL", entre el PROVEEDOR: UNIVERSIDAD DE

CONCEPCIÓN y el RECEPTOR: VIDAL Y URRUTIA LIMITADA, donde se establecen las facultades para “Proporcionar al RECEPTOR “Fórmula del PROVEEDOR”, con el fin de fabricar un desinfectante ambiental para aplicaciones en contenedores de frutas, para lo cual, se autoriza su uso exclusivamente para el desarrollo y fabricación de estos productos, a partir extractos naturales, formulados por el PROVEEDOR”.

OXIQUIM S.A.

Oxiqum S.A. es una de las principales empresas del negocio químico integral de Chile. Participa activamente en la distribución y comercialización de productos químicos y petroquímicos, tanto en el mercado nacional como extranjero. Representa de manera exclusiva y en cada una de sus subsidiarias, a compañías internacionales de reconocido prestigio.

Como antecedente, OXIQUIM S.A. está dedicada a la fabricación de resinas para la industria de paneles de madera y resinas industriales, a la distribución de productos químicos para la industria y la minería, y a los servicios de almacenaje y carga/ descarga de naves de gráneles líquidos en sus terminales marítimos ubicados en la bahía de Quintero y en Coronel. Además, La Empresa se destaca por la comercialización de productos para las industrias de celulosa, piscicultura, pintura, alimentos, textil, curtiembres, farmacéutica, plásticos, agrícola y minera, entre otras.

MARITANO

- es una empresa familiar cuyo giro es la fabricación y comercialización de jabones y productos para el lavado de ropa. Actualmente es administrada por la tercera generación de la familia Maritano y cuenta con 130 colaboradores distribuidos en su casa matriz ubicada en Talcahuano (VIII región, Chile) y la oficina comercial en Santiago.

En 65 años, Miguel Maritano Industria de Jabones S.A. se ha forjado un nombre fuerte y goza del respeto, tanto de sus consumidoras y clientas, como de sus competidores en el exigente mercado de los detergentes. Sus ventas anuales superan los 20 millones de dólares.

Productos y medio ambiente

En el contexto económico-social y en busca de la sustentabilidad para satisfacer sus necesidades evitando perjudicar a generaciones futuras, es que Maritano Industria de Jabones S.A. se ha focalizado en desarrollar soluciones innovadoras para las personas cuidando el medio ambiente, haciendo un uso más eficiente de recursos como el plástico, el agua y la energía. Reduciendo el impacto negativo que producen las emisiones en términos de transporte y carga, logrando resultados considerables en términos de eficiencia, ahorro de recursos y almacenamiento.

En cuanto a sus productos, se encuentran en proceso de desarrollar nuevas áreas de producción con el objetivo de entregar productos que sean cada vez más amigables con el medio ambiente. Teniendo en carpeta hoy en día dos productos estrella en diversas modalidades, como lo son Jabón Popeye y Jabón Giselle.

14. Bibliografía Consultada

- Arunkumar, K., Sivakumar, S., and Rengasamy, R. (2010) Review on bioactive potential in seaweeds (marine macroalgae): a special emphasis on bioactive of seaweeds against plant pathogens. *Asian Journal of Plant Sciences* **9**: 227-240.
- Brosius, J., Dull, T., Sleeter, D., and Noller, H. (1981) Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **148**: 107-127.
- Callow, J.A., and Callow, M.E. (2011) Trends in the development of environmentally friendly fouling-resistant marine coatings. *Nat Commun* **2**: 244.
- Combrinck, S., Bosman, A.A., Botha, B.M., Du Plooy, W., McCrindle, R.I., and Retief, E. (2006) Effect of post-harvest drying on essential oil and glandular trichomes of *Lippia scaberrima* Sond. *J Essent Oil Res* **18**: 80-84.
- Cortés, Y., Hormazábal, E., Leal, H., Urzúa, A., Mutis, A., Parra, L., and Quiroz, A. (2014) Novel antimicrobial activity of a dichloromethane extract obtained from red seaweed *Ceramium rubrum* (Hudson) (Rhodophyta: Florideophyceae) against *Yersinia ruckeri* and *Saprolegnia parasitica*, agents that cause diseases in salmonids. *Electronic Journal of Biotechnology* **17**: 126-131
- Delen, N., Yıldız, M., and Maraite, H. (1984) Benzimidazole and Dithiocarbamate resistance of *Botrytis cinerea* on greenhouse crops in Turkey. *Mededelingen in Viticulture Ed Enologia Universita Torino* **9**: 278-279.
- du Plooy, W., Regnier, T., and Combrinck, S. (2009) Essential oil amended coatings as alternatives to synthetic fungicides in citrus postharvest management. *Postharvest Biology and Technology* **53**: 117-122.
- Ercolini, D., Storia, A., Villani, F., and Mauriello, G. (2006) Effect of a bacteriocin-activated polythene film on *Listeria monocytogenes* as evaluated by viable straining and epifluorescence microscopy. *Journal of Applied Microbiology*.
- Galal, H., Salem, W., and El-Deen, N. (2011) Biological control of some pathogenic fungi using marine algae extracts. *Research Journal of Microbiology* **6**: 645-657.
- García Breijo, F., Hinojosa, A., Real, M., and Santamaría, A., (2001) Estudio de la actividad bactericida y fungicida de los metabolitos del hongo *Penicillium oxalicum* Currie et Thom. 23° Jornadas de productos Fitosanitarios. *Phytoma, España* N°132.
- Glicksman, M. (1987) Utilization of seaweed hydrocolloids in the food industry. In *Twelfth International Seaweed Symposium*. Ragan, M., and Bird, C. (eds): Springer Netherlands, pp. 31-47.
- Guedes, E., dos Santos Araújo, M., Souza, A., de Souza, L., de Barros, L., de Albuquerque Maranhão, F., and Sant'Ana, A. (2012) Antifungal Activities of Different Extracts of Marine Macroalgae Against Dermatophytes and *Candida* Species. *Mycopathologia* **174**: 223-232.
- Jiménez, E., Dorta, F., Medina, C., Ramírez, A., Ramírez, I., and Peña-Cortés, H. (2011) Anti-Phytopathogenic Activities of Macro-Algae Extracts. *Marine Drugs* **9**: 739-756.
- Jopia, P., Urrutia, H., Sossa, K., and Nocker, A. (2011) Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *Journal of Microbiological Methods* **87**: 89-95.
- Jutsum, A.R. (1988) Commercial application of biological control: status and prospects. *Phil Trans R Soc Lond* **318**: 357-373.
- Koneman, E., Allen, S., Dowell, V., and Sommers, H. (1987) Diagnóstico microbiológico. *Philadelphia: Lippincott Company*.
- Lee, S., and Ahn, C. (2003) Modified ANOVA for Unequal Variances. *Communications in Statistics - Simulation and Computation* **32**.

- Lingk, W. (1991) Health risk evaluation of pesticide contaminations in drinking water. *Gesunde Pflangen* **43**: 21-25.
- Lorenzini, M., and Zapparoli, G. (2014) An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant Pathology*: n/a-n/a.
- Moigne, J.Y. (2002) Method of obtaining an antibacterial and/or antifungal extract from the algae, bonnemaisoniacea. In: Google Patents.
- Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S., Cárdenas-Ávila, M., Hernández-Piñero, J., and Núñez-González, M., (2012) Efecto antifúngico de capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annum* l. Var. Aviculare) sobre el crecimiento in vitro de *Aspergillus flavus*. *Polibotánica* **34**: 191-204.
- NationalResearchCouncil (1987) *Regulating Pesticides in Food: The Delaney Paradox*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Navarro, G.Z., Fonseca, A.R., and Tadic, M.C. (2009) Natural extract for the control of botrytis cinerea at pre- and post-harvest. In: Google Patents.
- ODEPA (2011) Boletín estadístico de hortalizas y tubérculos: superficie, precios y comercio exterior. *Ministerio de Agricultura, Chile*.
- Paiva de Almeida, A., and Leal, N. (2012) Advances in Yersinia Research. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **954**: 332.
- Peeters, E., Hans, J., and Coenye, T. (2008) Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* **72** 157–165.
- Peres, J.C.F., Carvalho, L.R.d., Gonçalves, E., Berian, L.O.S., and Felicio, J.D.a. (2012) Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. *Ciência e Agrotecnologia* **36**: 294-299.
- Piqueras, C., Latorre, B., and Torres, R., (2014) Effectiveness of isofetamid, a new succinate dehydrogenase inhibitor fungicide, in the control of grapevine gray mold. *Cien. Inv. Agr.* **41**:365-374
- Prabhakar, C., Saleshrani, K., Tharmaraj, K., and Saranraj, P., (2012) Investigation on antimicrobial activity of *Gracilaria crassa* extracts against pathogenic microorganisms. *International Journal of Recent Scientific Research* **3**: 166 -171.
- Pusey, P.L., and Wilson, C.L. (1988) Postharvest biological control of stone fruit brown rot by bacillus subtilis. In: Google Patents.
- Quintana-Obregón, E., Plascencia-Jatomea, M., González-Aguilar, G., and Cortez-Rocha M., (2010) Inhibición del crecimiento de *Penicillium chrysogenum* por presencia de aceites de *Cinnamomum zeylanicum*, *Allium cepa* y *Cymbopogon citratus*. *Revista Mexicana de Micología* **32**: 59-62.
- Ragsdale, N.N., and Sisler, H.D. (1994) Social and Political Implications of Managing Plant Diseases with Decreased Availability of Fungicides in the United States. *Annual Review of Phytopathology* **32**: 545-557.
- Riveros, A., (2005) Uso de Phyton 27 en el control de enfermedades en diferentes especies de cultivos frutales.. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile.
- Rodriguez, A., (2010) Efecto del aceite esencial de cinco especies nativas chilenas sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*. Memoria presentada a la Facultad de Agronomía de la Universidad de Concepción para optar al título de Ingeniero Agrónomo
- Russell, S.M., and Burwell, S. (2006) Methods and compositions for preventing biofilm formations, reducing existing biofilms, and for reducing existing biofilms, and for reducing populations of bacteria. In: Google Patents.
- Saidani, K., Bedjou, F., Benabdesselam, F., and Touati, N. (2012) Antifungal activity of methanolic extracts of four Algerian marine algae species. *African Journal of Biotechnology* **11**: 9496-9500.
- Sanfuentes, E., and Ferreira, F. (1997) Avaliação de fungos para biocontrole de *Botrytis cinerea* em viveiros suspensos de eucalipto *Revista Árvore* **21**: 147-153.
- Sharma, R.R., Singh, D., and Singh, R. (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* **50**: 205-221.

- Ström-Bestor, M., and Wiklund, T. (2011) Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, in vitro. *Journal of Fish Diseases* **34**: 255-264.
 - Troncoso, N., Saavedra, R., Olivares, A., Farías, J., San-Martín, S., Urrutia, H., and Agurto, C. (2015) Identificación de compuestos antibacterianos en macroalgas presentes en la Región del Biobío, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* **50**: 199-204
 - Tronsmo, A., and Dennis, C. (1977) The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **83**: 449-455.
 - Unnikrishnan, V., and Nath, B.S. (2000) Hazardous chemicals in foods. *Indian Journal of Dairy and Biosciences* **11**: 155-158.
 - Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., and Moenne, A. (2011) Seaweed Polysaccharides and Derived Oligosaccharides Stimulate Defense Responses and Protection Against Pathogens in Plants. *Marine Drugs* **9**: 2514-2525.
 - Vorstermans, B., Creemers, P., Bylemans, D., and Gamier, A. (2005) A new post-harvest fungicide to control fruit rot on apple and pear. *Commun Agric Appl Biol Sci* **70**: 79-89.
 - Wilson, C.L., Wisniewski, M.E., Biles, C.L., McLaughlin, R., Chalutz, E., and Droby, S. (1991) Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection* **10**: 172-177.
 - Wisniewski, M., Wilson, C., El Ghaouth, A., and Droby, S. (2001) Non-chemical approaches to postharvest disease control. *ISHS Acta Horticulturae* **553**: 407-412.
 - Yildiz, F. (2000) Studies on the Biological Control of Grey Mould Disease (*Botrytis cinerea* Pers.) of the Greenhouse Grown Tomatoes. *Turk Phytopath* **29**: 95-103.
 - Ying, H.S., Gottron, F.J., and Choi, D.W. (2001) Assessment of Cell Viability in Primary Neuronal Cultures. In *Current Protocols in Neuroscience*: John Wiley & Sons, Inc.
 - Yousif Al-Rekabi, H. (2011) Study the effect of some algae extracts against activity of some fungi. *Journal of Thi-Qar University* **4**: 35-42
-
- M.A. Abbassy, M.A. Marzouk, E.I. Rabea, A.D. Abd-Elnabil Insecticidal and fungicidal activity of *Ulvalactuca* Linnaeus (Chlorophyta) extracts and their fractions. *Annu. Res. Rev. Biol.*, **4** (13) (2014), pp. 2252-2262.
 - A. Abdel-Khalik, H.M. Hassan, M.E. Rateb, O. Hammouda Antimicrobial activity of three *Ulva* species collected from some Egyptian Mediterranean seashores. *Int. J. Eng. Res. Gen. Sci.*, **2** (5) (2014), pp. 648-669.
 - Abou-El-Wafa, M. Shaaban, K.A. Shaaban, M.E.E. El-Naggar, H. Laatsch Three new unsaturated fatty acids from the marine green alga *Ulva fasciata* Delile G. Z. *Naturforsch. B*, **64** (10) (2009), pp. 1199-1207.
 - Bergasson, H. Hilmarsson, H. Thormar Antibacterial, antiviral and antifungal activities of lipids. H. Thormar (Ed.), *Lipids and Essential Oils as Antimicrobial Agents*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, United Kingdom (2011), pp. 47-80.
 - Bhadury and Wright, 2004, C.P. Wright Exploitation of marine algae: biogenic compounds for potential antifouling application. *Planta*, **219** (2004), pp. 561-578.
 - Chakraborty, A.P. Lipton, R. Paulraj, R.D. Chakraborty Guaianes sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata* Delile and their antibacterial properties. *Eur. J. Med. Chem.*, **45** (2010), pp. 2237-2244.
 - Chowdhury, K. Kubra, M.B. Hossain, M.G. Mustafa, T. Jainab, M.R. Karim, M.E. Mehedy Screening of antibacterial and antifungal activity of fresh water and marine algae as a prominent natural antibiotic available in Bangladesh. *Int. J. Pharm.*, **11** (7) (2015), pp. 828-833.
 - El Ashry, Atta-ur-Rahman, M.I. Choudhary, S.H. Kandil, A. El Nemr, T. Gulzar, A.H. Shobier Studies on the constituents of the green alga *Ulvalactuca*. *Chem. Nat. Compd.*, **47** (3) (2011), pp. 335-338

- Takeuchi, T., Inuma, H., Kunimoto, K. et al.: A new antitumor antibiotic, Spergualin: Isolation and antitumor activity. *J. Antibiot.* 34, 1619 (1981)
- Sahil Kakkar and Sourabh Bais. *ISRN Pharmacology* Volume 2014 (2014), Article ID 952943, 9 pages. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential)
- Kontham Kulangara Varsha, Leena Devendra, Ganesan Shilpa, Sulochana Priya, Ashok Pandey, Kesavan Madhavan Nampoothiri. 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. *International Journal of Food Microbiology* Volume 211, 15 October 2015, Pages 44-50
- Jorge Giovanni Lopez-Reyes, David Spadaro, Maria Lodovica Gullino, Angelo Garibaldi Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungus in four cultivars of apples in vivo. *Flavour Fragr. J.* 2010, 25, 171–177
- G. Bergasson, H. Hilmarsson, H. Thormar. H. Thormar (Ed.), *Antibacterial, Antiviral and Antifungal Activities of Lipids*, John Wiley and Sons Limited, Chichester, United Kingdom (2011), pp. 47-80.
- Soad M. Mohy El-Din, Amani M.D. El-Ahwany. *Journal of Taibah University for Science* Volume 10, Issue 4, July 2016, Pages 471-484. Bioactivity and phytochemical constituents of marine red seaweeds (*Jania rubens*, *Corallina mediterranea* and *Pterocladia capillacea*).
- Al-Saif, N. Abdel-Raouf, H.A. El-Waznani, I.A. Aref Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red Sea, Saudi Arabia. *J. Biol. Sci.*, 18 (2013), pp. 2328-2357;
- M. Silva, L. Vieira, A.P. Almeida, A. Kijjoa. The marine macroalgae of the genus *Ulva*: chemistry, biological activities and potential applications *Oceanography*, 1 (2013), pp. 101-111)
- Rajab MS, Cantrell CL, Franzblau SG, Fischer NH (1998) Antimycobacterial activity of (E)-phytol and derivatives: a preliminary structure-activity study. *Planta Med* 64: 2–4 doi:10.1055/s-2006-957354;
- Saikia D, Parihar S, Chanda D, Ojha S, Kumar JK, et al. (2010) Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 508–512 doi:10.1016/j.bmcl.2009.11.107 PubMed;
- Inoue Y, Hada T, Shiraishi A, Hirose K, Hamashima H, et al. (2005) Biphasic effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 1770–1774 doi:10.1128/AAC.49.5.1770-1774.2005).
- Zhao ZD, Sun Z. Research progress on natural resources and application of the bioactive substance-squalene. *Chem Ind Fore Prod* 2004; 24 : 107-12. 9.
- Xu RB, Liu WW, Wang MY. Progress of preparation and application in squalene. *Shandong J Med* 2005; 45 : 69-70.)