



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



ESTRATEGIAS PARA MANTENER LA CALIDAD DE FRUTAS DURANTE EL ALMACENAMIENTO POSCOSECHA EN FRÍO

Ing. Alim. Eloísa Arrarte

Trabajo presentado para obtener el título de

DOCTOR EN QUÍMICA

PEDECIBA Química

Facultad de Química, Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Diciembre 2019



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Estrategias para mantener la calidad de frutas durante el almacenamiento poscosecha en frío

Ing. Alim. Eloísa Arrarte

Trabajo presentado al Programa de Posgrado de PEDECIBA y Facultad de Química de la Universidad de la República, como parte de los requisitos necesarios para la obtención del título de **Doctor en Química**.

Directores de tesis

Dra. Silvana Vero

Dr. Jorge Castiglioni

Tribunal evaluador

Dra. Karen Ovsejevi

Dra. Helena Pardo

Dra. Marisol Vargas

PEDECIBA Química
Área Microbiología – Área Físicoquímica
Facultad de Química – Universidad de la República

Montevideo – Uruguay

Diciembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A Silvana por abrirme incondicionalmente las puertas de su laboratorio y permitirme descubrir el mundo de la microbiología. Por las oportunidades dadas, que me han impulsado a ir por más y a sacar lo mejor de mí. Por su apoyo y energía en todo momento y por el tiempo incalculable dedicado al desarrollo de esta tesis.

A Jorge por su disposición de siempre, por depositar su plena confianza en mí y por permitirme crecer como investigadora en el tema de películas biodegradables.

A las Dras. Marisol Vargas, Karen Ovsejevi y Helena Pardo por su disposición a formar parte del Tribunal de esta tesis.

Al Dr. Michael Wisniewski (Appalachian Fruit Research Station, ARS-USDA) por recibirme en su laboratorio, por su sencillez y por hacer de mi estadía en EEUU una experiencia enormemente enriquecedora.

Al Dr. Robson di Piero (UFSC, Brasil) por recibirme en su laboratorio y apoyarme en el inicio de los trabajos con quitosano. A los Dres. Aníbal Slavutski y Alejandra Bertuzzi por recibirme en la Universidad Nacional de Salta (Argentina) y ayudarme con los ensayos de quitosano y tensoactivos.

A la Dra. Carmen Rossini del Laboratorio de Ecología Química de la Facultad de Química por su colaboración en la determinación de compuestos volátiles. A la Dra. Fernanda Zacchari de la Facultad de Agronomía por su colaboración en la medida de las propiedades fisicoquímicas de las frutas.

A las diferentes agencias financiadoras, CSIC por la financiación del proyecto en el cual se enmarcó mi tesis de doctorado y la financiación de la pasantía en EEUU. Al Instituto Antártico Uruguayo por permitirme viajar a la Base Científica Antártica Artigas. A la AUGM por la financiación de la pasantía en Brasil y a PEDECIBA, por brindarme la alícuota de estudiante y la financiación de la pasantía en Argentina.

A mis compañeros de Fisicoquímica, con los que comparto a veces más tiempo que mi propia familia. A los que siempre están, codo a codo, los que siempre me dicen ¡vamos!

A mis compañeras del Laboratorio 14 de Microbiología, que me permitieron ser parte de un grupo humano único, a las que están y a las que se fueron, gracias por tantos momentos compartidos, por las charlas, gracias por todo!

A mis amigos Pato, Sari, Ceci, Maru, Flor, Tania, Gonchi, Fabi y Humbert por su amistad única, por siempre estar, en los momentos buenos y en aquellos donde ustedes fueron fundamentales para salir adelante.

A mi familia, gracias por su amor y apoyarme siempre en todas las decisiones de mi vida. A mi madre, que siempre nos ha impulsado a mejorar, a no conformarnos con la realidad, a ir contra las estadísticas y salir adelante. A Patricio, mi hermano, por darme siempre su visión analítica del mundo y sus invaluable charlas de ciencia, que me hicieron amar ese mundo desde chica. A Pao por tantos años y momentos compartidos y por traer a Anto al mundo, mi sobrina divina.

A la otra familia que la vida me regaló, Joni, Vasco, Bernardo y Melanie, gracias por abrirme las puertas de su familia y de su corazón.

A mi amor, Juan, el que le da sentido a la palabra hogar. Agradezco a la vida que te pusiera en mi camino para ser mi compañero incondicional de aventuras.

A todos los que a lo largo de estos años han formado parte de mi vida y que han dejado su huella en mí. Gracias!

RESUMEN

La producción de manzanas es muy importante en Uruguay, con una producción anual de alrededor de 40.000 toneladas, las que son almacenadas en cámaras refrigeradas a 0 °C durante varios meses. Luego de períodos prolongados de almacenamiento se observan problemas de calidad relacionados con cambios fisiológicos, daños físicos y la aparición de enfermedades. El *Penicillium expansum* es uno de los principales patógenos fúngicos en la poscosecha de manzana y el uso de fungicidas químicos ha sido el método más empleado para su control. Las exigencias actuales de los consumidores han llevado a la búsqueda de alternativas a estos fungicidas que impliquen menores riesgos para la salud y el medio ambiente. El objetivo de este trabajo fue estudiar estrategias de control biológico y la aplicación del polímero natural quitosano para controlar el desarrollo de *P. expansum* y mantener la calidad de manzanas Red Delicious durante su almacenamiento en cámara fría. La búsqueda de microorganismos antagonistas se realizó a partir de una colección de 68 levaduras aisladas de la Antártida y la selección se basó en su capacidad de crecer en frío, de producir enzimas hidrolíticas y de controlar el patógeno en herida de fruta. En estos ensayos se encontraron 34 levaduras capaces de controlar el desarrollo del patógeno en manzanas Red Delicious. A su vez, estas levaduras fueron evaluadas en otras frutas contra el mismo patógeno y se encontraron cepas de la especie *Debaryomyces hansenii* con buena capacidad biocontroladora en diferentes patosistemas. El éxito de la estrategia empleada en este trabajo se debió a una selección basada en el conocimiento del patógeno y ciclo de la enfermedad y de las condiciones de almacenamiento en frío de las frutas. Mediante diferentes ensayos se comprobó que la selección de un agente de biocontrol no debe estar determinada por los resultados de los mecanismos de acción, ya que el único ensayo decisivo, es el biocontrol en el patosistema seleccionado. Finalmente se seleccionó la cepa *D. hansenii* F9D y se evaluó su interacción con el patógeno en herida de fruta mediante q-PCR y SEM. En estos ensayos se verificó que la presencia de la levadura en la herida inhibió la capacidad del patógeno de crecer y desarrollarse más allá de la herida inicial. A su vez, se estudió la capacidad antifúngica *in vitro* de quitosanos de bajo peso molecular (LMW) y peso molecular medio (MMW) y su capacidad de formar películas y recubrimientos sobre la fruta. El quitosano MMW mostró mayor capacidad de controlar *P. expansum in vitro* y las películas de este quitosano mostraron mejores características como menor permeabilidad al vapor de agua y menor capacidad de adsorción de agua que las películas de quitosano LMW. Para la aplicación del quitosano en fruta se evaluó la mojabilidad de las soluciones empleando Tween® 20 y Tween® 80. A partir de estos ensayos se decidió trabajar con quitosano MMW 1 % con el agregado de Tween® 80 (0,02 %). En los ensayos en fruta se observó la capacidad del quitosano MMW de controlar la enfermedad causada por *P. expansum* y la reducir la pérdida calidad de las frutas durante el almacenamiento poscosecha. El efecto en la fruta se debe a las propiedades de barrera al vapor de H₂O y a gases del recubrimiento de quitosano que influyen en el metabolismo de las frutas. La combinación de quitosano con la levadura *D. hansenii* F9D mostró un control de la enfermedad (77 %) menor al obtenido con la levadura sola (90 %). Sin embargo, podría plantearse la mejora de esta estrategia mediante la incorporación de otras sustancias naturales o la evaluación de otro tipo de quitosano que ayuden a mejorar el nivel de control del patógeno.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN GENERAL	- 1 -
I.1. Producción de frutas en Uruguay.....	- 2 -
I.2. Proceso de maduración de las frutas.....	- 2 -
I.3. Almacenamiento poscosecha de frutas.....	- 3 -
I.4. <i>Enfermedades fúngicas poscosecha</i>	- 4 -
I.5. Manejo de las enfermedades poscosecha.....	- 6 -
II. OBJETIVOS	- 11 -
III. ESTRATEGIAS DE CONTROL BIOLÓGICO	- 13 -
III.1. INTRODUCCIÓN.....	- 14 -
III.1.1. Control biológico.....	- 14 -
III.1.2. Control biológico en la poscosecha.....	- 15 -
III.1.3. Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol.....	- 21 -
III.1.4. Pasos a seguir en el desarrollo de una formulación de biocontrol.....	- 27 -
III.1.5. Mejoramiento de la estrategia de control biológico.....	- 29 -
III.1.6. Aplicación del agente de biocontrol.....	- 30 -
III.2. OBJETIVOS.....	- 33 -
III.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 33 -
III. 3.1. Frutas.....	- 33 -
III. 3.2. Patógeno.....	- 33 -
III. 3.3. Levaduras.....	- 33 -
III. 3.4. Selección primaria de las levaduras.....	- 35 -
III. 3.5. Selección de las levaduras mediante ensayos de control biológico en fruta.....	- 36 -
III. 3.6. Caracterización de levaduras con actividad biocontroladora.....	- 37 -
III. 3.7. Estudio de la interacción de la levadura seleccionada y el patógeno en herida de manzanas Red Delicious.....	- 42 -
III. 3.8. Análisis estadístico.....	- 45 -
III.4. RESULTADOS.....	- 46 -
III. 4.1. Selección primaria de las levaduras.....	- 46 -
III. 4.2. Selección de levaduras mediante ensayos de control biológico en fruta.....	- 47 -
III. 4.3. Caracterización de levaduras con actividad biocontroladora.....	- 48 -
III. 4.4. Selección final de una levadura biocontroladora.....	- 55 -
III. 4.5. Estudio de la interacción de la levadura F9D y el patógeno en heridas de manzana Red Delicious.....	- 58 -
III.5. DISCUSIÓN.....	- 65 -

IV. QUITOSANO	- 77 -
IV. 1. INTRODUCCIÓN	- 78 -
IV.1. Polímero quitosano	- 78 -
IV.2. Propiedades antimicrobianas del quitosano	- 79 -
IV.3. Películas y recubrimientos de quitosano para su uso en alimentos	- 80 -
IV.4. Aplicación de recubrimientos poliméricos sobre las frutas	- 81 -
IV.5. Conceptos teóricos de la termodinámica de adhesión.....	- 82 -
IV.2. OBJETIVOS	- 86 -
IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS	- 86 -
IV.3.1. Quitosano	- 86 -
IV.3.2. Determinación de la viscosidad de las soluciones de quitosano	- 86 -
IV.3.3. Determinación del peso molecular de los quitosanos	- 86 -
IV.3.4. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los quitosanos LMW y MMW	- 88 -
IV.3.5. Evaluación de la mojabilidad de las soluciones de quitosano LMW y MMW sobre manzanas Red Delicious	- 88 -
IV.3.6. Preparación y caracterización de películas de quitosano	- 90 -
IV.3.7. Efecto de la aplicación de quitosano en la calidad de las frutas.....	- 94 -
IV.3.8. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano seleccionado y su combinación con la levadura F9D para el control de <i>P. expansum</i> en manzanas Red Delicious	- 96 -
IV.3.9. Análisis estadístico.....	- 97 -
IV.4. RESULTADOS.....	- 99 -
IV.4.1. Soluciones de quitosano.....	- 99 -
IV.4.2. Evaluación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los quitosanos	- 99 -
IV.4.3. Elaboración de películas de quitosano LMW y MMW.....	- 101 -
IV.4.4. Evaluación de la mojabilidad de las soluciones de quitosano sobre manzanas Red Delicious	- 102 -
IV.4.5. Caracterización de las películas de quitosano	- 108 -
IV.4.6. Selección final del tipo de quitosano y tensoactivo	- 114 -
IV.4.7. Efecto de la aplicación de quitosano MMW con el agregado de 0,02 % de Tween® 80 en la calidad de manzanas Red Delicious.....	- 115 -
IV.4.8. Evaluación de la actividad antifúngica en manzanas Red Delicious de quitosano MMW y su combinación con la levadura F9D	- 117 -
IV.5. DISCUSIÓN	- 118 -
V. CONSIDERACIONES FINALES	- 128 -
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	- 131 -
APÉNDICE	- 153 -
ANEXOS	- 156 -
ANEXO 1 – MEDIOS DE CULTIVO.....	- 157 -
ANEXO 2 – PUBLICACIÓN	- 160 -

ÍNDICE DE TABLAS

III. Estrategias de Control Biológico

Tabla III.1 Levaduras empleadas como agentes de control biológico de patógenos fúngicos en la poscosecha de frutas.....	18 -
Tabla III.2 Colección de levaduras aisladas de muestras de la Isla Rey Jorge (Antártida) durante las campañas 2012-2013.....	34 -
Tabla III.3 Levaduras empleadas en los ensayos de control biológico en fruta.....	46 -
Tabla III.4 Compuestos volátiles producidos en Agar Jugo de Manzana por <i>C. sake</i> 41E.....	52 -
Tabla III.5 Caracterización de levaduras biocontroladoras.....	54 -
Tabla III.6 Valores de Ct obtenidos para ADN de <i>P. expansum</i> de concentración 0,01 ng μL^{-1} en agua y en diferentes diluciones del ADN de la matriz.....	61 -

IV. Quitosano

Tabla IV.1 Actividad de agua a 25 °C de soluciones acuosas de sales saturadas.....	91 -
Tabla IV.2 Tensión superficial, componentes polares y dispersas de la tensión superficial y ángulo de contacto entre los líquidos de referencia y la superficie de manzanas Red Delicious.....	102 -
Tabla IV.3 Valores de tensión superficial, θ , W_a , W_c y W_s para los quitosanos LMW y MMW con agregado de los tensoactivos Tween [®] 20 y Tween [®] 80.....	108 -
Tabla IV.4 Opacidad de las películas de quitosano LMW y MMW.....	109 -
Tabla IV.5 Solubilidad y PVA de películas de quitosano LMW y MMW.....	109 -
Tabla IV.6 Estimación de los parámetros de las isothermas de adsorción de agua de las películas de quitosano LMW y MMW usando el modelo de isothermas GAB.....	111 -
Tabla IV.7 pH, sólidos solubles, acidez titulable, pérdida de masa, y firmeza de manzanas Red Delicious tratadas con quitosano MMW.....	115 -
Tabla IV.8 Color de fondo, sobrecolor y ΔE de manzanas Red Delicious tratadas con quitosano MMW.....	116 -

ÍNDICE DE FIGURAS

I. Introducción

Figura I.1. Crecimiento de *P. expansum* en medio PDA y síntomas iniciales de la enfermedad causada en manzanas.....- 5 -

Figura I.2. Ciclo de la enfermedad causada por *P. expansum* en la poscosecha de manzanas.....- 6 -

III. Estrategias de Control Biológico

Figura III.1. Esquema del ensayo de producción de compuestos antifúngicos solubles.....- 38 -

Figura III.2. Esquema del ensayo de producción de compuestos antifúngicos volátiles.....- 39 -

Figura III.3. Esquema del ensayo de inhibición del crecimiento de *P. expansum* en manzanas por acción de los compuestos volátiles producidos por *Candida sake*.....- 40 -

Figura III.4. Levaduras empleadas en los ensayos de control biológico en fruta.....- 47 -

Figura III.5. Incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum* en manzanas Red Delicious inoculadas con levaduras.....- 47 -

Figura III.6. Curva de germinación de esporas de *P. expansum* en jugo de manzana en frío.....- 49 -

Figura III.7. Inhibición de la germinación de esporas de *P. expansum* en presencia de las levaduras biocontroladoras.....- 49 -

Figura III.8. Inhibición del crecimiento micelial in vitro de *P. expansum* debido a los VOCs producidos por las cepas 41E y F36A.....- 50 -

Figura III.9. Incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum* en la presencia de los VOCs producidos por la cepa 41E.....- 51 -

Figura III.10. Cromatograma de los VOCs extraídos mediante la técnica de SPME.....- 52 -

Figura III.11. Incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum* en manzanas Granny Smith inoculadas con levaduras.....- 55 -

Figura III.12. Severidad de la enfermedad causada por *P. expansum* en manzanas Granny Smith inoculadas con levaduras.....- 56 -

Figura III.13. Incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum* en peras Williams inoculadas con levaduras.....- 56 -

Figura III.14. Severidad de la enfermedad causada por *P. expansum* en peras Williams inoculadas con levaduras.....- 57 -

Figura III.15. Incidencia y severidad de la enfermedad provocada por *P. expansum* en manzanas Red Delicious, peras Williams y manzanas Granny Smith con la levadura *D. hansenii* F9D.....- 57 -

Figura III.16. Curva de crecimiento de *D. hansenii* F9D en manzanas Red Delicious.....- 58 -

Figura III.17. Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para la dilución de la concentración de ADN de *P. expansum*.....- 59 -

Figura III.18. Curva de melting para el producto de amplificación del ADN de <i>P. expansum</i> ..	59 -
Figura III.19. Curva de calibración de logaritmo de la concentración de ADN de <i>P. expansum</i> versus los valores de Ct obtenidos.....	60 -
Figura III.20. Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para diluciones de la concentración de ADN de <i>P. expansum</i> 0,01 ng L ⁻¹	60 -
Figura III.21. Crecimiento de <i>P. expansum</i> en heridas de manzanas Red Delicious almacenadas a (0 ± 1) °C.....	61 -
Figura III.22. Tamaño de las lesiones provocadas por <i>P. expansum</i> en manzanas Red Delicious almacenadas a (0 ± 1) °C.....	62 -
Figura III.23. SEM de cortes transversales de heridas de manzanas Red Delicious.....	62 -
Figura III.24. SEM de heridas de manzanas inoculadas con <i>D. hansenii</i> F9D.....	63 -
Figura III.25. SEM de heridas de manzanas inoculadas con <i>P. expansum</i>	63 -
Figura III.26. SEM de heridas de manzanas inoculadas con <i>D. hansenii</i> F9D y <i>P. expansum</i>	64 -
Figura III.27. SEM de heridas de manzanas inoculadas con <i>D. hansenii</i> F9D y <i>P. expansum</i>	64 -

IV. Quitosano

Figura IV.1. Estructura química de los polímeros quitina y quitosano.....	78 -
Figura IV.2. Estructura química de los polímeros quitosano y celulosa.....	78 -
Figura IV.3. Relación entre el ángulo de contacto y la mojabilidad de un líquido sobre una superficie.....	82 -
Figura IV.4. Equipo empleado para la medida del ángulo de contacto e imagen de una gota de líquido sobre la superficie de la fruta.....	89 -
Figura IV.5. Celda para determinar permeabilidad al vapor de agua.....	93 -
Figura IV.6. Espacio de color CIEL*a*b*.....	95 -
Figura IV.7. Medidas de color en manzanas Red Delicious.....	96 -
Figura IV.8. Inhibición del crecimiento micelial de <i>P. expansum</i> en medio PDA conteniendo quitosanos LMW y MMW.....	99 -
Figura IV.9. Inhibición de la germinación de esporas de <i>P. expansum</i> en presencia de los quitosanos LMW y MMW.....	100 -
Figura IV.10. Imagen de las películas de quitosano LMW y MMW.....	101 -
Figura IV.11. Microscopía SEM de películas de quitosano LMW y quitosano MMW.....	101 -
Figura IV.12. Representación gráfica de la ecuación de Fowkes para los líquidos de referencia agua, etilenglicol y dimetilsulfóxido en la superficie de manzanas Red Delicious.....	103 -
Figura IV.13. Gráfica de Zisman para las manzanas Red Delicious.....	103 -
Figura IV.14. Tensión superficial de las soluciones de quitosano LMW y MMW con el agregado de los tensoactivos Tween® 20 y Tween® 80.....	104 -

Figura IV.15. Ángulo de contacto de las soluciones de quitosano LMW y MMW con agregado de Tween® 20 y Tween® 80 en la superficie de manzanas Red Delicious.....	105 -
Figura IV.16. Coeficientes de adhesión (Wa), esparcimiento (Ws) y cohesión (Wc) para las soluciones de quitosano con agregado de Tween® 20 y Tween® 80.....	106 -
Figura IV.17. Isotermas de adsorción de agua para los quitosanos LMW y MMW.....	110 -
Figura IV.18. Isotermas de adsorción de agua para las películas de quitosano LMW y MMW con agregado de Tween® 20 y Tween® 80.....	111 -
Figura IV.19. Termogramas en N ₂ y aire para películas de quitosano LMW y MMW.....	112 -
Figura IV.20. Termogramas en N ₂ y aire para películas de quitosano LMW y MMW con agregado de Tween® 20 y Tween® 80.....	114 -
Figura IV.21. Coordenadas a* y b* del color de manzanas Red Delicious.....	116 -
Figura IV.22. Incidencia y severidad de la enfermedad causada por <i>Penicillium expansum</i> en manzanas Red Delicious tratadas con quitosano y la levadura F9D.....	117 -
Figura IV.23. Estructura química de los tensoactivos Tween® 20 y Tween® 80.....	121 -

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AJM	Agar Jugo de Manzana
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
ASTM	American Society of Testing Materials
a_w	Actividad de agua
CIEL* a^*b^*	Espacio de color de coordenadas L^* , a^* y b^*
CMC	Concentración Micelar Crítica
Ct	<i>Cycle Threshold</i> , Ciclo Umbral
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
ECM	Error cuadrático medio
GAB	Modelo de isotermas de adsorción
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masa
HR	Humedad Relativa (%)
LMW	Bajo peso molecular (<i>Low Molecular Weight</i>)
MMW	Peso molecular medio (<i>Medium Molecular Weight</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Potato Dextrose Agar
PDB	Potato Dextrose Broth
PVA	Permeabilidad al vapor de agua
qPCR	PCR cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
SEM	Scanning Electron Microscopy
SPME	Microextracción en fase sólida (<i>Solid Phase MicroExtraction</i>)
SST	Sólidos solubles totales
TGA	Análisis Termogravimétrico
T_m	Temperatura de melting
VOC	<i>Volatile Organic Compound</i> , Compuesto orgánico volátil
YES	Yeast Extract Sucrose
YNB	Yeast Nitrogen Base

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1. Producción de frutas en Uruguay

En Uruguay existen alrededor de 27.000 hectáreas destinadas a la producción frutícola, a partir de las cuales se cosechan aproximadamente 440.000 toneladas de frutas anualmente. En la cosecha 2016 la producción de cítricos (naranja, mandarina, limón, pomelo) fue de 271.000 toneladas, la correspondiente a uva alcanzó las 104.000 toneladas mientras que la producción de los cultivos de árboles de hoja caduca (manzana, pera, durazno, nectarino, ciruelo y membrillo) fue de 63.000 toneladas (Anuario Estadístico. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2017).

Dentro de los frutales de hoja caduca, la manzana es el principal con 2677 hectáreas cultivadas y una producción de 37.675 toneladas, representando un 59,8 % de la producción de estos frutales. En Uruguay se cultivan alrededor de 20 variedades de manzanas, siendo las principales Granny Smith, Red Chief, Red Delicious, Early Red One, Royal Gala, Cripps Pink y Fuji, las que representan el 70 % de la producción. El destino principal de esta fruta es el consumo interno como fruta fresca (85,2 % de la producción), el resto de la fruta se destina a la industria (8,6 %) y a exportación (6,2 %) (Anuario Estadístico. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2017).

La manzana presenta una oferta relativamente constante durante todo el año, presentando picos de oferta entre los meses de febrero a mayo, donde predomina el producto recién cosechado (Manual de Frutas y Hortalizas en el Uruguay. Observatorio Granjero). Debido a los grandes volúmenes de producción y a la necesidad de mantener una oferta constante, se vuelve imprescindible contar con sistemas de almacenamiento que prolonguen la vida útil de la manzana durante períodos de varios meses.

I.2. Proceso de maduración de las frutas

El almacenamiento poscosecha de una fruta dependerá de las características genéticas y metabólicas del producto, de los factores de precosecha, las técnicas de manejo, el momento de la cosecha, los tratamientos poscosecha y las condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad relativa, atmósfera, etc.) (Mondino y Vero, 2006).

Las frutas son organismos vivos y durante su vida pasan por una serie de etapas: crecimiento, maduración, ablandamiento y senescencia que están caracterizados por cambios bioquímicos

y fisiológicos. La etapa de maduración se puede dividir en maduración fisiológica y maduración organoléptica. El crecimiento y la maduración fisiológica solo se completan adecuadamente en el árbol, mientras que la maduración organoléptica se puede completar tanto en el árbol como una vez que la fruta se cosechó. La maduración organoléptica involucra una serie de procesos que mejoran la aceptabilidad para el consumo humano y se relaciona con el ablandamiento debido a alteraciones de la estructura de la pared celular, cambio de color debido a la alternación del contenido de clorofilas, carotenoides y flavonoides, cambios de acidez, incremento del contenido de azúcares y cambios en el sabor y olor debido al metabolismo (Giovannoni, 2004; Seymour et al., 2013; Toivonen, 2007).

Las características respiratorias de cada fruta afectan la velocidad de maduración y así se clasifican las frutas en climatéricas y no climatéricas. En las frutas climatéricas como la manzana, los procesos de maduración y senescencia están mediados y regulados por etileno. La fase climatérica hace referencia al periodo en el que aparecen una serie de cambios bioquímicos iniciados por la producción autocatalítica de etileno, provocando un aumento en la respiración y culminando con la maduración organoléptica de la fruta. En las frutas no climatéricas la exposición a etileno provoca una inhibición de la formación de etileno, por lo que estas frutas solo pueden ser cosechadas una vez alcanzada la maduración organoléptica en el árbol (Li y Yuan, 2008; Toivonen, 2007).

Debido a su intensa actividad metabólica las frutas son productos altamente perecederos y la aplicación de tecnologías adecuadas para mantener su calidad dependerá del conocimiento de la estructura, fisiología y transformaciones metabólicas de estas (Dos Santos et al., 2015; Pech et al., 2013). Algunas frutas puedan almacenarse por períodos muy cortos, mientras que otras como las manzanas, pueden ser almacenadas por varios meses e incluso hasta un año (Martínez-González et al., 2017).

I.3. Almacenamiento poscosecha de frutas

La calidad de una fruta está definida por parámetros sensoriales como la textura, sabor, olor, apariencia y por ausencia de enfermedades fisiológicas y microbianas. Para disminuir las pérdidas de calidad durante el almacenamiento, se han desarrollado diversas estrategias que permiten enlentecer los procesos fisiológicos de la fruta, así como el desarrollo de enfermedades. El almacenamiento a bajas temperaturas es el método más eficiente para aumentar el tiempo de almacenamiento debido a su efecto en la disminución de la velocidad

de los procesos fisiológicos (Pimenta et al., 2009). En el caso de las manzanas, la temperatura óptima de almacenamiento se encuentra entre 0 y 1 °C (Watkins et al., 2004).

Las tecnologías como las atmósferas modificadas o controladas se basan en el manejo de las concentraciones de los gases como oxígeno y dióxido de carbono. Una reducción en el nivel de O₂ y un aumento del CO₂ puede ayudar a disminuir la velocidad de respiración, reducir la síntesis de etileno y por lo tanto, retrasar los procesos metabólicos. Las concentraciones de oxígeno empleadas suelen ser inferiores al 3 %, pero no deben alcanzar límites muy bajos ya que se podrían generar procesos de fermentación en las frutas con cambios de calidad no deseados. Los valores óptimos para la conservación de manzanas dependen de la variedad y de la madurez al momento de la cosecha, pero oscilan entre 1 y 2,5 % de oxígeno y entre 0,5 y 2,5 % de dióxido de carbono (Watkins et al., 2004).

A pesar del empleo de estas tecnologías, se siguen observando grandes volúmenes de pérdidas en la etapa poscosecha. Un reporte de la FAO (Food and Agriculture Organization) en 2011 indicó que las pérdidas promedio en los países industrializados era de alrededor del 29 % mientras que en los países no industrializados este porcentaje alcanzaba el 38 %. Estas pérdidas están afectadas por factores propios de la fruta (velocidad de respiración, composición química, cambios morfológicos, envejecimiento, desordenes fisiológicos) y por factores externos como pueden ser factores ambientales (temperatura, humedad relativa del ambiente, composición de la atmósfera, luz, etc.) o ataques microbianos (principalmente patógenos fúngicos). Debido al alto contenido de nutrientes y agua, las frutas son muy susceptibles al ataque fúngico y estos son considerados los principales responsables de las pérdidas ocurridas durante el almacenamiento poscosecha de frutas y vegetales.

I.4. Enfermedades fúngicas poscosecha

La enfermedad de un vegetal involucra cambios morfológicos y fisiológicos en las células y tejidos que resultan en el desarrollo de síntomas característicos que pueden implicar daños parciales o la muerte (Mondino y Vero, 2006). Todos los vegetales pueden ser infectados por uno o más especies de patógenos fúngicos, algunos de los cuales, a su vez, pueden afectar varias especies de vegetales. Los patógenos fúngicos responsables de la mayoría de las enfermedades poscosecha pertenecen a los géneros *Penicillium*, *Botrytis*, *Monilinia*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Gloeosporium* y *Mucor*. En el

caso particular de la poscosecha de manzanas, los patógenos más frecuentemente reportados son *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Alternaria spp.* (Sharma et al., 2009).

El *Penicillium expansum*, principal patógeno poscosecha de manzanas, es causante de la enfermedad conocida como moho azul. El ataque de este hongo, al igual que otras especies de *Penicillium*, ocurre a través de aberturas naturales (lenticelas) o a través de heridas o daños que se dan durante la cosecha y posteriores etapas de poscosecha y almacenamiento. A partir de estas heridas el hongo comienza una rápida colonización de la fruta caracterizada por un reblandecimiento de los tejidos alrededor del punto de entrada, de color marrón y textura acuosa. En la etapa final del ciclo de la enfermedad el *P. expansum* produce esporas de color verde azulado que le dan el nombre a la enfermedad de moho azul (Figuras I.1).

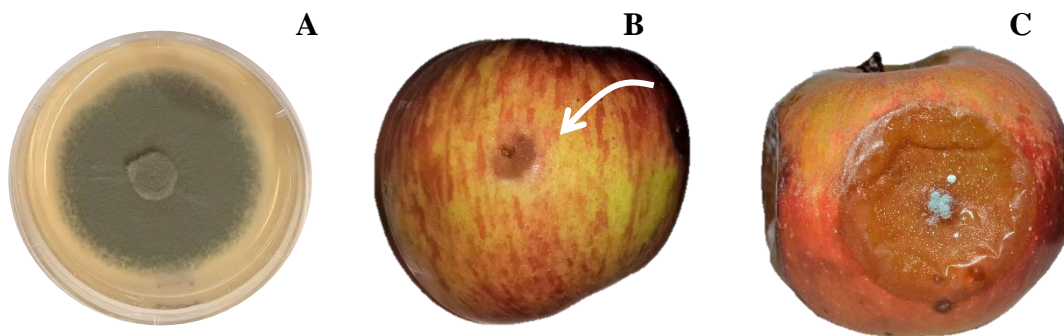


Figura I.1. A. Crecimiento de *P. expansum* en medio PDA (Potato Dextrose Agar), B. Síntomas iniciales de la enfermedad causada por *P. expansum* en manzanas, C. Características típicas de una infección por *P. expansum*.

Estas esporas pueden diseminarse de forma pasiva a través de corrientes de aire y alcanzar fruta sana e incluso pueden sobrevivir adheridos a los cajones o bins utilizados para guardar la fruta (Mondino y Vero, 2006). Así puede comenzar un nuevo ciclo de la enfermedad e incrementarse el nivel de daño, hasta lograr en algunos casos, la pérdida total de la fruta almacenada en la cámara (Figura I.2). Este tipo de enfermedad se define como policíclica ya que la fruta enferma es capaz de contagiar a otras durante el mismo período de almacenamiento, produciéndose un avance exponencial de la enfermedad (Mondino y Vero, 2006). Además de las pérdidas de fruta ocasionadas por este patógeno, este hongo puede representar un riesgo para la salud ya que es capaz de producir metabolitos secundarios tóxicos (micotoxinas) como la patulina y citrinina (Andersen et al., 2004).

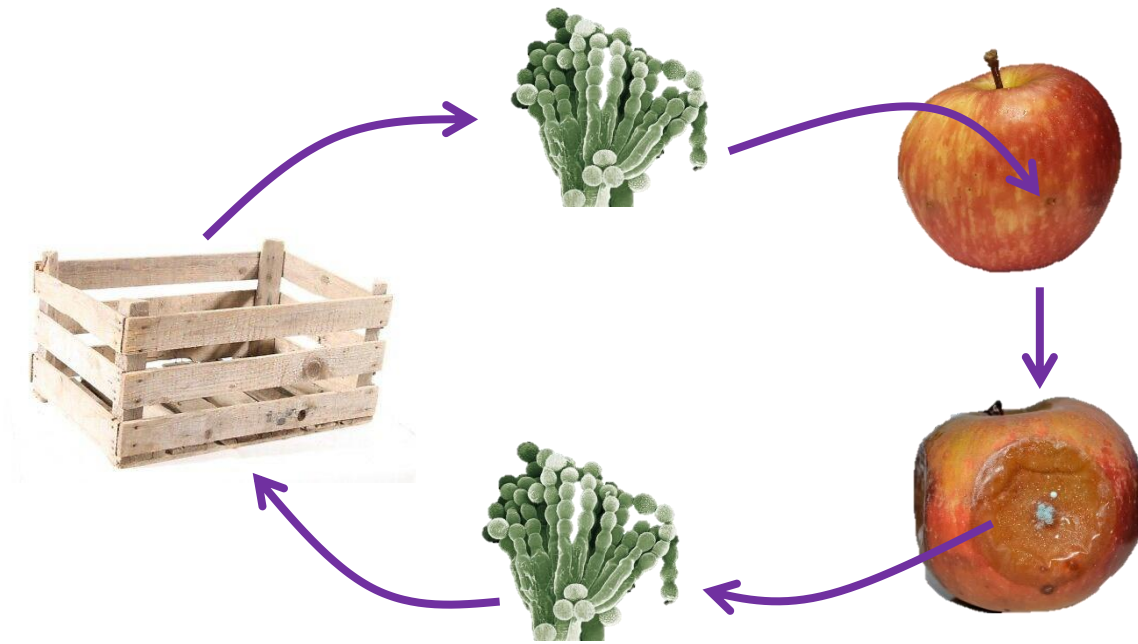


Figura I.2. Ciclo de la enfermedad causada por *P. expansum* en la poscosecha de manzanas.

I.5. Manejo de las enfermedades poscosecha

Debido a que la principal vía de infección de estos patógenos son las heridas en la superficie de la fruta, un mejor manejo de la fruta durante la cosecha, transporte y almacenamiento, tratando de disminuir la formación de heridas y machucamiento podría ayudar a disminuir las infecciones fúngicas. Por otra parte, una adecuada limpieza y sanitización de las plantas de empaque y envases permitiría reducir los niveles de inóculo del patógeno (Mondino y Vero, 2006). Mientras que muchas alternativas se han planteado para el manejo de las enfermedades poscosecha, el control químico es hoy en día el más ampliamente usado. Los fungicidas han sido eficientes en la reducción de las enfermedades poscosecha, sin embargo, su uso ha despertado preocupación debido a la toxicidad de los productos y a los posibles problemas de salud para consumidores y aplicadores. A su vez, se plantean problemas medioambientales vinculados a la disposición final de los residuos contaminados surgidos del tratamiento poscosecha de la fruta (Janisiewicz y Korsten, 2002). Desde hace varias décadas se han realizado estudios sobre los riesgos de los pesticidas en la salud humana. En los 60s comenzaron las preocupaciones con respecto al impacto de los insecticidas en el medioambiente, lo que llevó a que muchos productos se retiraran del mercado. El impacto de la aplicación de fungicidas en la poscosecha es aún mayor ya que estos se aplican

directamente sobre la fruta, por lo cual, el consumidor está directamente expuesto a estos productos más que a otros pesticidas que se pueden aplicar en el campo (Wilson et al., 1991). Es por ello muy importante conocer y acatar los tiempos de espera entre aplicación y consumo. Es así que las normas de producción integrada en Uruguay admiten el uso de los fungicidas imazalil, iprodione y captan en manzanas cosechada solamente si la fruta va a ser comercializada después de tres meses de aplicado el producto (Normas para la producción integrada de manzano, 2018).

Para poder establecer estos tiempos resulta muy importante conocer las curvas de degradación de los plaguicidas sobre la fruta. Estos datos también ayudarían a decidir los tratamientos y tiempos de espera del material que va a ser exportado de forma de impedir que surjan problemas de rechazo y desprestigio de la mercadería. Los tiempos de degradación son específicos del par fungicida-fruta, pero también dependen en gran medida de las condiciones (Bovi Mitre et al., 2004). En nuestro país se han realizado trabajos de curvas de degradación de fungicidas sobre fruta y se han analizado entre otros, la persistencia del imazali sobre mandarinas almacenadas a 4 °C (Besil et al., 2016). Este trabajo demostró que la vida media del fungicida en esas condiciones estaba entre 15 a 18 días. Sin embargo, no hemos encontrado datos sobre la degradación de los fungicidas usados en poscosecha de manzana sobre dicha fruta.

La existencia de los problemas mencionados asociados al uso de fungicidas en poscosecha ha estimulado la búsqueda de métodos alternativos para el control de las enfermedades de productos hortofrutícolas (Tripathi et al. 2004). En este contexto, el control biológico de patógenos ha sido una alternativa ampliamente estudiada y que parecería ser viable para sustituir total o parcialmente el empleo de fungicidas químicos ya que en contraste con los productos químicos, el uso de control biológico no deja residuos tóxicos sobre las frutas (Usall et al., 2016). El control biológico es un fenómeno que puede ocurrir naturalmente en el medioambiente y consiste en el control del crecimiento de una población debido a uno o más organismos antagonistas (Pimenta et al., 2009). Existen diferentes definiciones de control biológico, mientras que algunas se refieren estrictamente al uso de microorganismos antagonistas como medida de control, otras definiciones como la utilizada por la EPA (United States Environmental Protection Agency) incluye dentro de los biopesticidas al uso de sustancias naturales (EPA - Biopesticides, 2019). Entre los compuestos que se han estudiado y que actualmente están aceptados por la EPA se encuentran acetaldehídos, benzaldehídos, glucosilatos, ácido acético, bicarbonato de sodio, jasmonatos, propóleo,

aceites esenciales, extractos de plantas, quitosano, entre otros. La integración de los agentes de control biológico con algunas de estas sustancias ha permitido potenciar su acción (Droby et al., 2003; Mondino y Vero, 2006; Tripathi y Dubey, 2004).

Entre los compuestos naturales, el quitosano (polímero de origen natural obtenido a partir de la quitina) ha recibido especial atención debido a sus propiedades antifúngicas, su capacidad de formar películas, su biodegradabilidad e inocuidad (Badawy y Rabea, 2009; Hafdani y Sadeghinia, 2011). La capacidad del quitosano de formar películas o recubrimientos sobre la superficie de los alimentos es muy interesante ya que estos recubrimientos pueden actuar como barrera semipermeable a los gases, reduciendo así el intercambio relacionados al metabolismo de las frutas y, por lo tanto, retrasando los procesos de maduración y senescencia (Chien et al. 2007; Hernández-Muñoz et al. 2008).

Hipótesis y Estrategia general de la tesis

Este trabajo se basó en la siguiente hipótesis: Es factible el uso de control biológico y la aplicación de quitosano sobre fruta cosechada como una alternativa al uso de fungicidas sintéticos para el control de *Penicillium expansum* en manzanas. El uso de control biológico y la aplicación de quitosano son herramientas válidas para controlar el moho azul y mantener la calidad en manzanas Red Delicious almacenadas en frío (0-1 °C). Para demostrarla se planteó una estrategia de biocontrol basado en la selección y caracterización de microorganismos psicrotolerantes como antagonistas de *P. expansum* y se formularon películas de quitosano evaluando su actividad antifúngica y su capacidad para mantener la calidad de la fruta almacenada. Por último se realizó un tratamiento combinando ambas estrategias y se evaluó la capacidad de control del moho azul en comparación al control y a cada tratamiento por separado.

Descripción general de la tesis

La tesis se encuentra estructurada en una *Introducción General* y dos capítulos que abarcan las *Estrategias de Control Biológico* y el uso del polímero *Quitosano*.

En el capítulo de *Estrategias de Control Biológico* se presentan los diferentes ensayos llevados a cabo para la selección y caracterización de levaduras con capacidad biocontroladora del patógeno *Penicillium expansum* en manzanas Red Delicious. Para ellos se seleccionaron cepas de levaduras psicrótrofas provenientes de la Antártida y se evaluó su capacidad antagonista en ensayos de biocontrol en fruta. Las levaduras con actividad biocontroladora fueron caracterizados con respecto a diferentes mecanismos de acción de biocontrol. Tomando en consideración los diferentes ensayos se seleccionó una de las levaduras que mostró mayor capacidad antagonista y se evaluó su interacción con el patógeno en herida de fruta.

En el capítulo de *Quitosano* se estudió la actividad antifúngica contra *P. expansum in vitro* y la capacidad de formar películas de dos quitosanos de diferente peso molecular. A su vez, se evaluó la capacidad de las soluciones de quitosano con el agregado de tensoactivos para dispersarse en la superficie de las manzanas para su aplicación como recubrimiento. Una vez seleccionados los diferentes factores (concentración y tipo de quitosano y tensoactivo), se

evaluó la capacidad del quitosano de controlar *P. expansum* en manzanas Red Delicious solo y en combinación con la levadura seleccionada en los ensayos anteriores. A su vez, se evaluó el efecto del recubrimiento con quitosano en la calidad de las manzanas Red Delicious almacenadas en cámara fría.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Encontrar alternativas para controlar el desarrollo de patógenos fúngicos durante el almacenamiento en frío de frutas que a la vez retrasen los procesos fisiológicos de maduración y deterioro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ◆ Desarrollar estrategias de control biológico para evitar el desarrollo del patógeno *Penicillium expansum* en manzanas Red Delicious.
- ◆ Estudiar el efecto de películas de quitosano en la maduración de manzanas Red Delicious y aparición de enfermedades fúngicas.
- ◆ Estudiar la posibilidad de un efecto sinérgico entre el control biológico y la aplicación de películas de quitosano.

III.
ESTRATEGIAS DE
CONTROL
BIOLÓGICO

III.1. INTRODUCCIÓN

III.1.1. Control biológico

En sentido amplio, el control biológico se puede definir como el control del crecimiento de una población por acción de uno o más organismos antagonistas (Pimenta et al., 2009). En referencia al control de enfermedades vegetales, se denomina control biológico a la utilización de microorganismos beneficiosos con el fin de reducir los efectos indeseables de microorganismos patógenos. Los microorganismos utilizados como agentes de biocontrol pueden ejercer su acción directamente sobre el patógeno (efecto antagonista), sobre el hospedero (inducción de resistencia) o a través de cambios en la matriz donde ocurre la interacción con el patógeno. Según Spadaro et al. (2002) el concepto de control biológico es totalmente compatible con el de agricultura sostenible, ya que se basa en el uso de recursos naturales para lograr una producción agrícola con un reducido impacto ambiental. La idea principal detrás de los programas de control biológico es la reducción del uso de compuestos tóxicos para alcanzar estándares satisfactorios de calidad sin dejar de lado la seguridad alimentaria (Vivekananthan et al., 2004).

Comprender el ciclo de vida del patógeno y los eventos que llevan a la infección inicial, la colonización del hospedero, la expresión de factores de virulencia y la formación de estructuras reproductivas del patógeno es crucial para plantear con éxito estrategias de control de enfermedades y en particular el control biológico. En este tipo de control, además de las interacciones patógeno-hospedero-ambiente se debe considerar el rol del antagonista y las modificaciones que puedan surgir por su presencia. Los agentes de control biológico pueden actuar previniendo la infección, reduciendo la colonización de los tejidos del huésped, limitando la esporulación del patógeno, disminuyendo la supervivencia del mismo o impidiendo la expresión de factores de virulencia que llevan al desarrollo de la enfermedad (Sharma et al., 2013). Por ello, resulta fundamental conocer las variables que afectan cada proceso y las condiciones en que se producen para poder realizar una búsqueda dirigida hacia el tipo de antagonista seleccionado.

El control biológico fue usado por primera vez para controlar insectos y ácaros, pero luego su uso se amplió a otros invertebrados, vertebrados y microorganismos fitopatógenos (Cook y Baker, 1983). La primera publicación con un ejemplo exitoso de control biológico en poscosecha de frutillas fue publicado por Tronsmo y Dennis (1977) y se basaba en el uso de *Trichoderma* spp. para el control de *Botrytis cinerea* en frutillas. En 1985, Wilson y Pusey

publicaron un artículo en el cual presentaban sus ideas respecto al potencial del biocontrol en la poscosecha y discutían el uso de una cepa de *Bacillus subtilis* para controlar a *Monilinia fructicola* en durazno. Hoy en día, el control biológico es ampliamente usado como solución para diferentes problemas agronómicos incluyendo las enfermedades poscosecha. Las bases del desarrollo del control biológico en esta etapa se han sustentado en las ideas del trabajo inicial de Wilson y Pusey (1985), las cuales a lo largo de 30 años, han sido adoptadas por investigadores de todo el mundo para la búsqueda y desarrollo de productos destinados al control de patógenos en poscosecha (Wisniewski et al., 2007).

III.1.2. Control biológico en la poscosecha

La poscosecha presenta características favorables para la implementación de medidas de control biológico. En primer lugar, el ambiente de la poscosecha se caracteriza por ser confinado y controlado, lo cual facilita la aplicación de los productos biológicos y el mantenimiento de estos debido a condiciones ambientales fijas (Di Francesco et al., 2016). En segundo lugar, el alto valor agregado de los productos cosechados justifica la implementación de medidas de control que en otras circunstancias podrían no ser rentables. Además, en la mayoría de los casos, la aplicación de los agentes de control biológico puede realizarse utilizando equipos y tecnología iguales o similares a los usados para la aplicación de fungicidas, por lo cual el cambio en las instalaciones de las plantas de tratamiento poscosecha, no sería drástico ni económicamente excesivo. Varios autores (Droby et al., 2009; Sharma et al., 2009; Spadaro y Droby, 2016; Wilson y Wisniewski, 1989; Wisniewski et al., 2007) han planteado diversas características que un microorganismo debería tener para ser utilizado como agente de biocontrol en la poscosecha.

Entre ellas se encuentran:

- ◆ No ser patogénico para la fruta o afectar su calidad
- ◆ No producir metabolitos potencialmente tóxicos para el hombre y animales
- ◆ Ser estable genéticamente
- ◆ Ser capaz de sobrevivir a condiciones de stress ambiental, tales como las bajas temperaturas de almacenamiento poscosecha de ciertas frutas
- ◆ Ser efectivo a bajas concentraciones
- ◆ Ser efectivo contra varios patógenos en diferentes cultivos y condiciones ambientales

- ◆ No ser exigente en cuanto a requerimientos nutricionales y ser capaz de crecer en sustratos económicos
- ◆ Ser resistente a pesticidas, compatible con otros productos químicos y tratamientos físicos empleados en la poscosecha que permitan un control integrado

En general, los antagonistas empleados en el control biológico de enfermedades en la poscosecha han sido mayormente levaduras, seguido por bacterias y en menor medida hongos (Di Francesco et al., 2016; Droby et al., 2009; Liu et al., 2013; Nunes, 2012; Wisniewski et al., 2016). Entre ellos, las levaduras han sido las más ampliamente estudiadas y efectivas como agentes de biocontrol en la poscosecha de frutas (Droby et al., 2009). La habilidad de las levaduras de asimilar una amplia variedad de compuestos orgánicos les permite habitar diferentes nichos ecológicos terrestres (plantas, suelos) y acuáticos (lagos, ríos, mares). Si bien como grupo son menos tolerantes que las bacterias a diferentes tipos de stress, se ha constatado que algunas especies pueden prosperar en ambientes con bajas temperaturas, bajas concentraciones de oxígeno, fluctuaciones de pH o alta radiación UV (Spadaro y Droby, 2016). A su vez, las levaduras en general tienen requerimientos nutricionales simples, lo que les permite rápidamente colonizar la superficie de los vegetales y mantener la viabilidad por largos períodos de tiempo. Además, a diferencia de los hongos filamentosos, no producen esporas alérgicas o micotoxinas, lo cual hace factible su uso en alimentos (Janisiewicz et al., 2001; Lima et al., 1997; Pimenta et al., 2009; Spadaro y Droby, 2016). Otra ventaja del uso de levaduras como agentes de biocontrol es la aceptación de estas por parte del consumidor, lo que se debe a su amplio uso en la producción de alimentos y bebidas a lo largo de la historia (Wisniewski et al., 2016). Debido a esto, en los últimos 30 años ha habido una extensa investigación en la búsqueda y desarrollo de estrategias basadas en levaduras como antagonistas microbianos de patógenos poscosecha como *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum*, *Rhizopus stolonifer* y *Botrytis cinerea*, entre otros (Tabla III.1).

Tabla III.1. Levaduras empleadas como agentes biocontrol de patógenos fúngicos en la poscosecha de frutas.

Antagonista	Patógeno	Fruta	Referencia
<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Uva, ciruela, frutilla	Lima et al. (1997), Schena et al., (2003), Zhang et al. (2010) Mari et al. (2012)
	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Ciruela	Zhang et al. (2010), Mari et al. (2012)
	<i>Monilinia laxa</i>	Banana, uva, pera, manzana	Wittig et al. (1997), Zhang et al. (2010) Barkai-Golan (2001); Mari et al. (2012)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	Vero et al. (2009)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Frutilla	Lima et al. (1997)
<i>Candida ciferrii</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	Vero et al. (2002)
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Nectarino, Durazno, Tomate	Tian et al. (2002), Saligkarias et al. (2002),
	<i>Monilinia fruticola</i>	Durazno	Xu et al. (2008)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Pomelo	Droby et al. (1993)
<i>Candida intermedia</i>	<i>Rhizopus</i>	Durazno	Fan et al. (2000)
	<i>Botrytis cinerea</i>	Frutillas	Huang et al. (2011)
<i>Candida membranifaciens</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Mango	Kefialew y Ayalew (2008)
<i>Candida oleophila</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Durazno, tomate, manzana, frutilla	Karabulut y Baykal (2004), Saligkarias et al. (2002), Jijakli y Lepoivre (1998), Lima et al. (1997)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Papaya	Gamagae et al. (2003)
	<i>Colletotrichum musae</i>	Banana	Lassois et al. (2008)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Cítricos	El-Neshawy y El-Sheikh (1998), Lahlali et al. (2004, 2005)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	El-Neshawy y Wilson (1997), Mercier y Wilson (1995)
	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	El-Neshawy y El-Sheikh (1998), Lahlali et al. (2004, 2005)

Tabla III.1. (Continuación). Levaduras empleadas como agentes biocontrol de patógenos fúngicos en la poscosecha de frutas.

Antagonista	Patógeno	Fruta	Referencia
<i>Candida sake</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana, uva	Viñas et al. (1996), Morales et al. (2008) Cañamás et al. (2011), Wilson et al. (1993)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Cítricos	Droby et al. (1993)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana, Pera	Viñas et al. (1996), Morales et al. (2008), Wilson et al. (1993)
	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Arras et al. (1998)
	<i>Rhizopus nigricans</i>	Manzana	Viñas et al. (1996)
<i>Candida saitoana</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	El-Ghaouth et al. (1998)
<i>Cryptococcus albidus</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	Fan y Tian (2001)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	Fan y Tian (2001)
<i>Cryptococcus flavus</i>	<i>Mucor piriformis</i>	Pera	Roberts (1990)
<i>Cystofilobasidium infirmominiatu</i>	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Vero et al. (2011)
<i>Cryptococcus laurentii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Durazno, pera, tomate, frutilla, manzana	Zhang et al. (2007b), Zhang et al. (2005) Xi y Tian (2005), Filonow (1998)
	<i>Glomerella cingulata</i>	Manzana	Blum et al. (2004)
	<i>Monilinia fructicola</i>	Cereza, durazno	Karabulut y Baykal (2003), Tian et al. (2004) Qin et al. (2004), Yao y Tian (2005), Xu et al. (2008)
	<i>Mucor piriformis</i>	Pera	Roberts (1990)
	<i>Penicillium expansum</i>	Durazno, manzana	Zhang et al. (2007b), Janisiewicz et al. (2008)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Durazno, frutilla	Zhang et al. (2007a), Wei et al. (2014)
<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Colletotrichum</i>	Papaya	Hernández-Montiel et al. (2018)
	<i>Geotrichum candidum</i>	Cítricos	Chalutz y Wilson (1990)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Cítricos	Singh (2002), Karabulut y Baykal (2003), Hernández-Montiel et al. (2010), Droby et al. (1989)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Pera	Mandal et al. (2007), Singh (2004, 2005)

Tabla III.1. (Continuación). Levaduras empleadas como agentes biocontrol de patógenos fúngicos en la poscosecha de frutas.

Antagonista	Patógeno	Fruta	Referencia
<i>Kloeckera apiculata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Cerezas	Karabulut et al. (2004)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Cítricos	Long et al. (2006)
	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Long et al. (2006)
<i>Leucosporidium scottii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	Vero et al. (2013)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	Vero et al. (2013)
<i>Metschnikowia andauensis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	Manso y Nunes (2011)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Mandarina	Manso y Nunes (2011)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	Manso y Nunes (2011)
	<i>Penicillium italicum</i>	Mandarina	Manso y Nunes (2011)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Manzana	Manso y Nunes (2011)
<i>Metschnikowia fructicola</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Uva, manzana	Karabulut et al. (2003), Spadaro et al. (2002)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Pomelo	HersHKovitz et al. (2013)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	Liu et al. (2011), Spadaro et al. (2002)
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	Spadaro et al. (2002)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	Spadaro et al. (2002), Janisiewicz et al. (2001)
<i>Pichia anomala</i>	<i>Colletotrichum musae</i>	Banana	Lassois et al. (2008)
	<i>Fusarium moniliforme</i>	Banana	Lassois et al. (2008)
	<i>Penicillium spp.</i>	Cítricos	Lahlali et al. (2004)
<i>Pichia membranaefaciens</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	Jijakli y Lepoivre (1998)
	<i>Monilinia fruticola</i>	Durazno	Xu et al. (2008), Fan y Tian (2000)

Tabla III.1. (Continuación). Levaduras empleadas como agentes biocontrol de patógenos fúngicos en la poscosecha de frutas.

Antagonista	Patógeno	Fruta	Referencia
<i>Pichia guilliermondii</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana, uva, tomate, kiwi	Janisiewicz et al. (1998), McLaughlin et al. (1990), Chalutz et al. (1988), Wisniewski et al. (1991), Sui y Liu (2014)
	<i>Penicillium digitatum</i>	Cítricos	Wilson y Chalutz (1989)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana	McLaughlin et al. (1990)
	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Arras et al. (1998)
	<i>Rhizopus stolonifer</i>	Uva	Chalutz et al. (1988)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana	Zhang et al. (2009, 2008)
	<i>Monilinia fruticola</i>	Durazno	Xu et al. (2008)
	<i>Penicillium expansum</i>	Manzana, pera	Zhang et al. (2009, 2008), Calvo et al. (2007)
	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Arras et al. (1998)
<i>Rhodotorulo minuta</i>	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Arras et al. (1998)
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Frutilla	Zhang et al. (2013)
	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Arras et al. (1998)
<i>Rhodosporidium paludigenum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Manzana, pera, frutilla	Zhang et al. (2009, 2008, 2007)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Colletotrichum musae</i>	Banana	Suzzi et al. (1995), Zhimo et al. (2016)
<i>Saccharomycopsis schoenii</i>	<i>Penicillium italicum</i>	Cítricos	Pimenta et al. (2008)

El éxito de algunas levaduras antagonistas en estudios de laboratorio y en ensayos pilotos despertó el interés de compañías de agroquímicos por desarrollar y comercializar bioproductos con agentes microbianos. El primer producto comercializado para el control biológico de patógenos poscosecha basado en la levadura *Candida oleophila* cepa I-182 fue Aspire® (Ecogen, USA-Israel) en 1995 (Wisniewski y Wilson, 1994). Este producto ya no se encuentra disponible en el mercado, sin embargo, las compañías BioNext (Bélgica) y Lesaffre (Francia) han desarrollado otro producto llamado Nexy® que también se basa en una cepa de la misma especie (Lahlali et al., 2011; Liu et al., 2013). Otros productos con levaduras antagonistas que han sido patentados y comercializados son Shemer® (*Metschnikowia fructicola*, Bayer, Alemania), Candifruit® (*Candida sake*, Sipcam-Inagra, España, actualmente discontinuado), Boni-Protect® (*Aureobasidium pullulans*, Bio-protect, Alemania) y Yieldplus® (*Cryptococcus albidus*, Anchor Yeast, Sudáfrica).

La habilidad de controlar diferentes patógenos en diferentes cultivos es esencial para la viabilidad económica de un producto de biocontrol en la poscosecha. Por ejemplo, Shemer® ha sido reportado como efectivo contra *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* en diferentes cultivos como frutilla, duraznos, pimientos, uvas, boniatos, albaricoques, zanahoria y cítricos (Samir Droby et al., 2009; Karabulut et al., 2004; J. Liu et al., 2013).

En Uruguay no hay aún formulaciones registradas para el control biológico de patógenos poscosecha de frutas u hortalizas. A pesar de la existencia de productos comerciales en el mercado internacional el desarrollo de un producto nacional es de importancia para el mercado local. Dicho desarrollo impulsaría la industria nacional de insumos agrícolas, que ya cuenta con instalaciones y conocimientos para la producción microbiana a gran escala y el desarrollo de formulaciones estables. Es por ello que los esfuerzos en ese sentido son valorables más allá de los conocimientos generados.

III.1.3. Mecanismos de acción de los agentes de biocontrol

Los microorganismos antagonistas pueden controlar la aparición de una enfermedad por interferencia con el patógeno o sus factores de virulencia o por acción sobre el hospedero mediante la inducción de sus mecanismos de resistencia. A su vez, los mecanismos que involucran la relación antagonista-patógeno se pueden dividir en dos grupos, a) mecanismos mediante los cuales se limita el crecimiento del patógeno (amensalismo, parasitismo y

competencia) y b) mecanismos por los que se inhiben los factores de virulencia del patógeno limitando de esa forma las actividades productoras de enfermedad.

III.1.3.1. Mecanismos que involucran la relación antagonista-patógeno

Amensalismo

El amensalismo se define como la producción por parte de un organismo (antagonista) de sustancias inhibitorias o tóxicas para otro tipo de organismo. Estas sustancias son de variada naturaleza y tienen diferentes blancos de acción. Algunas de ellas son de naturaleza peptídica e incluso proteica. Existen microorganismos productores de enzimas extracelulares capaces de degradar las paredes de los patógenos que se busca controlar, mientras que otros microorganismos producen sustancias de bajo peso molecular y algunas incluso volátiles.

Dentro de las sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular se pueden encontrar metabolitos secundarios de variada naturaleza química con actividad antibacteriana y antifúngica, los cuales generalmente actúan a concentraciones muy bajas.

Este tipo de sustancias han sido frecuentemente asociados a bacterias biocontroladoras. Se han reportado a los géneros bacterianos *Bacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Streptomyces* como productores de antibióticos de diferente naturaleza química y espectro de acción (Köhl et al., 2019). Antifúngicos como el 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y fenazina se han detectado como productos del metabolismo de *Pseudomonas spp.* (Raaijmakers y Mazzola, 2012), mientras que lipopéptidos como iturina, surfactina y fengicina han sido asociados con *Bacillus spp.* Los compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular también son producidos por hongos antagonistas. Por ejemplo, compuestos antifúngicos tales como gliovirina, gliotoxina y viridina se han identificados como metabolitos de *Trichoderma spp.* y *Clonostachys spp.* La producción de compuestos antifúngicos de este tipo por parte de levaduras no es común. Son pocos los casos en los que el control biológico por levaduras se ha asociado a la producción de una sustancia antimicrobiana. Uno de esos casos es referido a la producción de aureobasidina por *Aureobasidium pullulans* (Zain et al. 2009). Sin embargo, una característica muy extendida en las levaduras es la capacidad de producir toxinas de naturaleza peptídica llamadas toxinas killer o micotoxinas. Santos y Marquina (2004) han descrito el rol de una toxina killer producida por una cepa de *Pichia membranifaciens* en el control del crecimiento de *Botrytis cinerea in vitro* y sobre plantas de vid. Weiler y Schmitt (2003) por su parte demostraron la acción *in vitro* de la zygotina, una toxina killer

producida por una cepa de levadura de la especie *Zygosaccharomyces bailii* contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum graminicola*. Compuestos antifúngicos volátiles también se han asociado a la acción de levaduras antagonistas. Dichos compuestos son de bajo peso molecular, en general, menor a 300 Da, que presentan baja solubilidad en agua y alta presión de vapor. Son de variada naturaleza química e incluyen hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y tioésteres, entre otros (Morath et al., 2012). Un microorganismo antagonista produce, en general, una mezcla de compuestos volátiles, denominado volatiloma (Parafati et al., 2017). Existen varios ejemplos que ponen en evidencia el rol del volatiloma producido por levaduras en el biocontrol de hongos patógenos. Por ejemplo, Di Francesco et al. (2014) demostraron el rol fundamental de los volátiles producidos por *Aureobasidium pullulans* en el control de *B. cinerea*, *C. acutatum*, *P. expansum*, *P. digitatum* y *P. italicum* *in vitro* y sobre fruta. A su vez, la actividad biocontroladora de *W. anomalus* y *M. pulcherrima* sobre *B. cinerea* fue atribuida a la producción de compuestos antifúngicos volátiles (Parafati et al., 2015).

Ciertas enzimas extracelulares también han jugado un rol fundamental en el biocontrol de fitopatógenos, en especial en el caso de levaduras. Se han descrito numerosos ejemplos de microorganismos productores de quitinasas, glucanasas y proteasas capaces de hidrolizar las paredes celulares de dichos hongos. Varios autores han reportado el incremento de la producción por parte de las levaduras biocontroladoras de enzimas β -1,3-glucanasa, quitinasas y proteasas extracelulares (Bar-Shimon et al., 2004; Saravanakumar et al., 2009; Wisniewski et al., 1991; Zhang et al., 2011). Muchas veces se ha visto la producción asociada al micoparasitismo, pero existen casos en que la producción se da aún en ausencia de una manifiesta interacción directa entre patógeno y antagonista. Por ejemplo, Castoria et al. (2001) describieron una cepa de *Aureobasidium pullulans* (LS-30) capaz de controlar los daños postcosecha causados por *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzana y *Botrytis cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Aspergillus niger* en uvas de mesa. En su trabajo demostraron que dicha cepa producía quitinasa y β -1,3 glucanasa *in vitro* y sobre las heridas de la fruta, sin interactuar físicamente con los patógenos, por lo cual postularon que el micoparasitismo no estaba involucrado en esa interacción.

Parasitismo

El parasitismo es un tipo de relación entre dos organismos de especies diferentes en la que uno de ellos sale beneficiado y el otro sale perjudicado de la relación. Un micoparásito en

particular, es un microorganismo que se desarrolla utilizando otro hongo como sustrato. Existen dos tipos de micoparásitos, los biótrofos que son los que viven en relación con su hospedero sin causarle daño y los necrótrofos que son aquellos que matan a las células vivas de su hospedero mediante la secreción de enzimas o toxinas que pueden degradar la pared del hospedero. Este último modo de acción es el que se ha demostrado en hongos biocontroladores tales como los pertenecientes a los géneros *Trichoderma* y *Gliocladium*. Sin embargo, el micoparasitismo no es un mecanismo de acción exclusivo de los hongos filamentosos. Wisniewski et al. (1991), demostraron que existía una fuerte unión de la levadura antagonista *Pichia guilliermondii* a hifas del patógeno *Botrytis cinerea*. Mediante microscopía electrónica de barrido, los autores pudieron observar la ruptura de la pared celular del patógeno en las zonas en las que las células del antagonista se habían unido previamente. Arras et al. (1998) observaron que *P. guilliermondii* causaba daños en las hifas del hongo *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum* (Arras et al., 1998). A su vez, los trabajos de De Boer et al. (2004) han demostrado la existencia de bacterias micófagas pertenecen a la especie *Collimonas fungivorans*. Se demostró que dichas bacterias se fijaban a las paredes y crecían a expensas de hifas vivas de los hongos filamentosos *Chaetomium globosum*, *Fusarium culmorum* y *Mucor hiemalis*.

Competencia

La competencia es un modo de acción indirecto, donde no hay contacto entre el antagonista y el patógeno. En este caso ambos compiten por algún factor imponiéndose uno de ellos por ser capaz de procurarlo de manera más rápida y eficiente. La competencia hace referencia al desigual comportamiento de dos o más microorganismos ante un mismo requerimiento, cuando la utilización de éste por uno de ellos reduce la cantidad disponible para otros. Un factor esencial para que haya competencia es la escasez de algún elemento esencial para el desarrollo de alguno de los microorganismos, si hay exceso no hay competencia (Vero, 2006). La competencia entre microorganismos puede darse por diferentes factores como el espacio físico, luz, oxígeno o nutrientes, siendo esta última la más estudiada. Se ha demostrado que la competencia por fuentes nitrogenadas era la causa del biocontrol de *P. expansum* ejercido por *C. ciferrii* en heridas de manzana (Vero et al., 2002). En este trabajo se agregó nitrato a heridas inoculadas con el antagonista y el patógeno y se observó que el biocontrol se suprimía. El nitrato podía ser utilizado como fuente de nitrógeno por el patógeno pero no por la levadura biocontroladora. Dado que el agregado de una fuente

nitrogenada impedía el biocontrol, se concluyó que el mismo ocurría por una competencia por nitrógeno en la herida de manzana. Más recientemente, Di Francesco et al. (2017) demostraron que el control causado por las cepas de *Aureobasidium pullulans* L1 y L8 frente a *Monilinia laxa* en duraznos era mediado por competencia por a fuente de nitrógeno y por espacio. En la competencia por espacio, la formación de biofilms por medio de los microorganismos antagonistas tiene un rol preponderante. Los biofilms son comunidades microbianas que viven y crecen embebidas en una matriz de polisacáridos, asociados a superficies. Pueden estar compuestos por individuos de una sola o de varias especies (Costa-Orlandi et al., 2017). La capacidad de formar estos biofilms ha sido asociada al biocontrol por levaduras en varios casos, como por ejemplo, en el control de la pudrición ácida de cítricos mediada por *A. pullulans* (Klein y Kupper, 2018) y en control de *B. cinerea* en peras por *Pichia kudriavzevii* (Chi et al., 2015).

Otro tipo de nutriente vinculado a los mecanismos de competencia es el hierro. En general el hierro disponible en suelos y sobre la superficie de las plantas es escaso (Compant et al., 2005). En condiciones de baja disponibilidad de hierro ciertos microorganismos pueden producir unas moléculas de bajo peso molecular, denominadas sideróforos, que son capaces de quelar el ion férrico y transportarlo al interior celular. Los microorganismos productores de sideróforos tienen a su vez receptores de membrana y sistemas de transporte específicos, que reconocen el complejo sideróforo-hierro formado y lo ingresan de esta forma, al interior celular. Algunos microorganismos son capaces de reconocer e incorporar sideróforos producidos por otros microorganismos, con lo cual logran una ventaja adicional en la lucha por el hierro (Loper y Henkels, 1999). Los distintos sideróforos tienen diferente afinidad por el hierro y dicha afinidad depende del microorganismo en cuestión. En general, los sideróforos de origen bacteriano tienen mayor afinidad por el hierro que los de origen fúngico. Es por ello que en situaciones de escasez de hierro ciertas bacterias son capaces de inhibir el desarrollo de patógenos fúngicos (Köhl et al., 2019). En estos casos el biocontrol deja de ser efectivo si se adiciona hierro en el sitio de competencia. La competencia por hierro también ha sido uno de los mecanismos involucrados en el biocontrol ejercido por hongos filamentosos como *Trichoderma spp.* En particular, se demostró el rol fundamental de los sideróforos producidos por *T. asperellum* en el control del marchitamiento en tomate causado por *Fusarium* (Segarra et al., 2010). Este tipo de competencia también ha sido demostrado en levaduras, en especial en el control biológico de patógenos poscosecha. En el ambiente ácido de las frutas, el Fe^{+2} es oxidado a Fe^{+3} para formar complejos de hierro

estables en la presencia de oxígeno y agua. La levadura podría beneficiarse del microambiente de la herida de la fruta, mediante la producción de sideróforos para competir por el hierro e interferir en la germinación, crecimiento y virulencia del patógeno. Muchos ejemplos de competencia por hierro mediante sideróforos han sido reportados (Calvente et al., 1999; Muccilli y Restuccia, 2015; Parafati et al., 2015; Saravanakumar et al. 2008). Por ejemplo, Vero et al. (2009) demostraron que *Aureobasidium pullulans* era capaz de producir un sideróforo que inhibía a *Botrytis cinerea* en presencia de bajos niveles de hierro. Un caso particular es el de la levadura *Metschnikowia pulcherrima*, la cual libera al medio un compuesto denominado ácido pulcherrimico, el cual quelata el hierro produciendo un pigmento rojo que se puede observar en los medios de cultivo. Gore-Lloyd et al. (2019) han demostrado que la capacidad biocontroladora de esta levadura está parcialmente basada en la producción de este compuesto quelante.

Inhibición o reducción de factores de virulencia del patógeno

Mediante la eliminación de factores de virulencia se puede controlar las actividades productoras de enfermedad sin eliminar o restringir al patógeno. Esto se ha podido lograr mediante la eliminación de señales de quórum que modulan la expresión de ciertos factores de virulencia en algunos patógenos. Varios tipos de microorganismos usan señales de quórum para regular diversas actividades tales como la producción de antibióticos, enzimas, sideróforos, e incluso de factores de virulencia. En el caso de la bacteria *Pectobacterium carotovorum* se ha demostrado que la producción de factores de virulencia tales como enzimas que degradan paredes vegetales, está mediada por sensores de quórum (Liu et al., 2008). La dependencia de las señales de quórum o autoinductores para la expresión de factores de virulencia también se ha demostrado en otras bacterias fitopatógenas tales como *Agrobacterium tumefaciens* (Tannières et al., 2017) y *Ralstonia solanacearum* (Mori et al., 2018). A su vez, se han encontrado bacterias biocontroladoras capaces de degradar las señales de quorum, bloqueando de esa forma la expresión de factores de virulencia de los fitopatógenos. Estos antagonistas tienen un gran potencial ya que pueden actuar aún en estrategias curativas es decir, después de establecida la infección. La investigación acerca de sensores de quórum en hongos aún no está muy desarrollada. Se ha descubierto el rol de varias moléculas como sensores de quórum para el desarrollo de varias actividades en levaduras. Por ejemplo, se ha demostrado que la levadura *Candida albicans* utiliza farnesol como autoinductor y que el mismo está involucrado en la formación de pseudomicelio y

biofilms (Nickerson et al., 2006). Seguramente el desarrollo del conocimiento acerca del rol de señales de quórum en la regulación de factores de virulencia en hongos fitopatógenos será el paso inicial para el desarrollo de agentes de biocontrol basados en la inhibición o degradación de dichas señales.

III.1.3.2. Mecanismos que involucran reacción del hospedero

Inducción de resistencia

Se denomina resistencia a la capacidad de un organismo a sobreponerse completamente o en cierto grado a la acción de un patógeno. Existen dos tipos de resistencia en vegetales: la resistencia constitutiva (propia de la planta, expresada en todo momento) y la resistencia inducida (expresada sólo ante la presencia de determinados estímulos). Son muy conocidos los casos de rizobacterias que inducen la resistencia en plantas (Köhl et al., 2019). Sin embargo, la inducción mediada por levaduras en productos cosechados se ha comprobado en pocos casos. Uno de esos casos es el trabajo de El-Ghaouth et al. (2003), en el cual se demostró que la aplicación de *Candida saitoana* en una herida de manzana inducía la protección frente a *Botrytis cinerea* en otra herida de la misma fruta no inoculada con la levadura. Demostraron además la inducción de la producción de quitinasas y glucanasas en la fruta asociadas al control. A su vez, Droby et al. (2002) demostraron que la inducción de resistencia frente a *P. digitatum* causada por la aplicación de *Candida oleophila* en heridas de pomelo dependía de la distancia al sitio de aplicación de la levadura y del tiempo transcurrido antes de la llegada del patógeno. Más recientemente, Lu et al. (2013) demostraron la inducción de resistencia a *P. digitatum* en mandarinas causada por la levadura *Rhodosporidium paludigenum* y mediada por fenilalaninamonioliase, quitinasa y β -1,3 glucanasa. A pesar de la existencia de trabajos que postulan la inducción de resistencia en el tejido de las frutas luego del tratamiento con los antagonistas, la evidencia directa de la habilidad de las sustancias inducidas de inhibir la infección o desarrollo del patógeno no ha sido aun claramente establecido (Sharma et al., 2013).

III.1.4. Pasos a seguir en el desarrollo de una formulación de biocontrol

Los pasos a seguir en la selección de un agente de biocontrol para un determinado patosistema, requieren bastantes estudios y en general el trabajo de un equipo

multidisciplinario. En general se siguen los siguientes pasos, aunque el orden de la secuencia puede ser diferente.

- ◆ Estudio del patosistema

En primer lugar se debe caracterizar el patosistema sobre el que se pretende actuar. Es fundamental conocer el patógeno que se quiere controlar y el sitio donde se espera que ocurra el biocontrol.

- ◆ Aislamiento y selección de cepas locales del patógeno

Es necesario aislar y caracterizar las cepas patógenas locales en busca de aquellas cepas que muestren mayor agresividad para utilizarlas como patógenos en los ensayos de biocontrol.

- ◆ Aislamiento y selección de posibles agentes de biocontrol

Todo programa de control biológico se sustenta en el apropiado aislamiento y selección de los microorganismos agentes de biocontrol de modo que esta fase determina las chances de éxito (Bettiol, 1991). Sabiendo que en cada ecosistema existe una gran diversidad de microorganismos, la definición de una adecuada estrategia de búsqueda y selección es fundamental. Si bien es posible encontrar efectivos agentes de biocontrol en forma azarosa, es recomendable establecer una estrategia de búsqueda que permita aumentar las probabilidades de éxito y simplifique el largo camino a recorrer hasta disponer de un producto comercial. Así es que, se considera mayor la probabilidad de hallar antagonistas, en aquellos lugares en donde coincidiendo la presencia del patógeno, la planta huésped y el ambiente favorable al desarrollo de la enfermedad, la misma no ocurre. Es posible que allí esté funcionando algún tipo de biocontrol natural.

- ◆ Identificación de los agentes de biocontrol seleccionados

La identificación precisa de los microorganismos seleccionados es fundamental. Se debe llegar a una identificación a nivel de especie o en algunos casos a nivel de subespecie. De esta forma, se podrán descartar aquellas cepas que pertenezcan a especies que hayan sido caracterizadas como patógenos humanos, animales o vegetales o con conocida acción antagonista sobre otros microorganismos benéficos.

- ◆ Determinación de los mecanismos de acción

Es necesario conocer los mecanismos por los cuales el microorganismo antagonista ejerce el biocontrol. De esta manera se podrán realizar estudios para potenciar la acción de este.

◆ Optimización de las condiciones de producción

Se deben establecer las condiciones óptimas de producción del agente de biocontrol en condiciones económicamente rentables. Esto implica el uso de sustratos baratos para la producción, tales como excedentes de otras industrias, por ejemplo la melaza de caña o suero de leche. Implica además la optimización de las condiciones de incubación de forma de optimizar el rendimiento y disminuir el tiempo de cultivo.

◆ Desarrollo de una formulación

Es importante llegar a una formulación de fácil aplicación y de estabilidad asegurada en condiciones de almacenamiento no exigentes.

◆ Registro de la formulación

La formulación debe ser registrada para poder ser utilizada en condiciones de uso. Los requerimientos para los registros varían según los distintos países pero en general se necesitan pruebas de efectividad, de toxicidad, de identificación y caracterización de la cepa utilizada, datos sobre los mecanismos de acción involucrados, de permanencia en el ambiente, y efecto sobre otro tipo de organismos diferentes al organismo blanco.

III.1.5. Mejoramiento de la estrategia de control biológico

La combinación de los agentes de control biológico con shocks térmicos, uso de sustancias GRAS u otros tratamientos de conservación pueden potenciar efectos sinérgicos e incrementar el control de los patógenos a niveles similares a los alcanzados por los tratamientos con fungicidas químicos (Droby et al., 2009; Janisiewicz et al., 2008; Sharma et al., 2013; Usall et al., 2016). Este concepto llevó al desarrollo de agentes de control biológico en la poscosecha que se basan en la combinación de un producto natural con la levadura antagonista. Por ejemplo, la incorporación de compuestos como L-asparagina, L-prolina, L-serina, L-aspartico, 2-desoxi-D-glucosa, entre otros ayudaron a mejorar el desempeño de los antagonistas en el control de enfermedades poscosecha de frutas (El-Ghaouth et al., 2000; Yao y Tian, 2005). Algunos autores han reportado que la combinación de las levaduras con ácido salicílico o jasmonato han mejorado la eficacia de los agentes de control biológico mediante la inducción de resistencia en la fruta (Ebrahimi et al., 2012; Farahani y Etebarian, 2012; Jiang y Li, 2001; Qin et al., 2003; Yu et al., 2007; Zhang et al., 2009). La eficiencia de *Rhodotorula glutinis* contra *Penicillium expansum* fue mejorada por

la incorporación de sideróforos. La incorporación de sideróforos redujo la enfermedad debido al efecto secuestrante del hierro necesario para la germinación de algunos patógenos (Calvente, Benuzzi, & Tosetti, 1999). Una estrategia posible es combinar antagonistas microbianos con fungicidas, para lo cual es necesario previamente determinar su compatibilidad. La aplicación de *Pichia guilliermondii* a cítricos con la combinación de reducidas concentraciones de tiabendazol redujo el desarrollo de *Penicillium digitatum* a niveles similares a los alcanzados con las concentraciones recomendadas de tiabendazol (Wisniewski y Wilson, 1994), lo cual ayudaría a mantener bajos niveles de residuos en la fruta. Resultados similares con *Candida oleophila* + tiabendazol fueron observados por Droby et al. (1998) y *Cryptococcus laurentii* + imazalil (Tian et al., 2004). El agregado de sales también ha mejorado la eficacia de algunos antagonistas. Diferentes sales como cloruro de calcio, propionato de calcio, carbonato de calcio, bicarbonato de calcio, metabisulfito de sodio, molibdato de amonio han sido exitosamente usados en combinación con levaduras antagonistas para controlar patógenos poscosecha de frutas más eficientemente (An et al., 2012; Conway et al., 2005; Droby et al., 2003; Gholamnejad y Etebarian, 2009; Janisiewicz et al., 2008; Liu et al., 2013). A su vez, se ha planteado la combinación de antagonistas con productos naturales con acción protectora. El quitosano, derivado de la quitina encontrada en los caparazones de moluscos o en paredes de hongos, así como sus derivados han sido reportados por su eficacia en el control de enfermedades poscosecha y su habilidad de inducir resistencia en la planta (Bautista-Baños et al., 2006; Ma et al., 2013). La combinación de quitosano con agentes de biocontrol ha potenciado la acción de los mismos frente a diversos patógenos (Fan et al., 2009; Meng et al., 2010; Yu et al., 2007).

III.1.6. Aplicación del agente de biocontrol

Una vez que un potencial agente de control biológico es identificado y seleccionado, es necesario buscar el método de aplicación que sea efectivo para controlar o suprimir al patógeno. Las heridas son la principal vía de entrada de los patógenos poscosecha y una vez que el patógeno ingresó al interior de la fruta es casi inalcanzable para el control químico o biológico. Por lo tanto, varios estudios han indicado que el agente de control biológico debe ser introducido en la herida en forma preventiva antes de cualquier posibilidad de heridas o de infección fúngica (Sharma et al., 2009). En algunos casos, la infección de las frutas ocurre en el campo y esas infecciones latentes pueden volverse un gran problema durante el

almacenamiento poscosecha. Es por esta razón, que la aplicación de los agentes antagonistas previos a la cosecha puede resultar efectivo en el control de enfermedades poscosecha. El objetivo de la aplicación precosecha es la precolonización de la superficie de la fruta por parte del antagonista para evitar así que el patógeno colonice. Los productos comerciales ProYeast-ST y ProYeast-ORG (AgroGreen, Israel) basados en una cepa de *Metschnikowia fructicola* han tomado el desafío de prevenir las enfermedades poscosecha mediante la aplicación de la levadura en las flores y frutas en el campo, en diferentes oportunidades durante el proceso de desarrollo de las frutas, y ha sido efectivo en el control de *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Aspergillus* en frutillas, uvas y cítricos (Karabulut et al., 2004; Sharma et al., 2013). A pesar de este ejemplo, generalmente este método es inviable debido a la baja supervivencia de los antagonistas en las condiciones de campo (Sharma et al., 2009). De acuerdo con diversas investigaciones, parecería que la aplicación poscosecha del antagonista es la más adecuada, práctica y útil para controlar las enfermedades poscosecha de frutas. La aplicación del biocontrolador debe realizarse después de la cosecha pero antes del almacenamiento, para prevenir que el patógeno infecte las heridas inmediatamente luego de la cosecha. En este método los antagonistas son aplicados mediante spray o inmersión en una dispersión del antagonista (Irtwange, 2006) con equipos y tecnología similares a los usados para la aplicación de fungicidas (Sharma et al., 2013; Spadaro et al., 2002).

Esquema general del capítulo

Debido a las condiciones de almacenamiento en frío de las manzanas, se propuso la búsqueda de microorganismos antagonistas psicrótrofos y resistentes a condiciones de stress. Teniendo en cuenta que los antagonistas más ampliamente utilizados en la etapa poscosecha han sido las levaduras, se decidió trabajar con levaduras aisladas de muestras de suelo y aguas antárticas.

En este capítulo se desarrollará la metodología empleada para la selección y caracterización de los antagonistas, la cual se divide en las siguientes etapas:

- ◆ Selección y caracterización de las levaduras antagonistas
- ◆ Evaluación de los mecanismos de acción de las levaduras seleccionadas
- ◆ Evaluación de la interacción de la levadura seleccionada y el patógeno en herida de fruta.

III.2. OBJETIVOS

- ◆ Seleccionar levaduras psicotolerantes capaces de controlar el desarrollo de moho azul causado por *Penicillium expansum* en frutas durante el almacenamiento en frío.
- ◆ Caracterizar el comportamiento del antagonista seleccionado en el patosistema en estudio.

III.3. MATERIALES Y MÉTODOS

III. 3.1. Frutas

Las frutas empleadas en este trabajo (manzanas Red Delicious, manzanas Granny Smith y peras Williams) fueron adquiridas en Granja Moizo (Montevideo, Uruguay) hasta un mes después de la cosecha. Las frutas fueron seleccionadas por su uniformidad, tamaño, color, forma y ausencia de daños o ataque fúngico.

III. 3.2. Patógeno

Para los ensayos se empleó una cepa nativa de *Penicillium expansum* previamente aislada de manzanas con pudrición e identificada fenotípicamente y genotípicamente (Pianzola et al. 2004).

III. 3.3. Levaduras

La selección se realizó a partir de una colección de 68 levaduras (Tabla III.2) aisladas de muestras de agua y suelo de la Isla Rey Jorge (Islas Shetland del Sur, Antártida). Estas muestras fueron tomadas durante las campañas realizadas a la Base Científica Antártica Artigas (62°02'S58°21'W) en los años 2012 y 2013 (Martinez et al., 2016).

Tabla III.2. Colección de levaduras aisladas de muestras de agua y suelo de la Isla Rey Jorge (Antártida) durante las campañas 2012-2013.

Código	Identificación	Código	Identificación
4BE	<i>Cryptococcus keelungensis</i>	F3B	<i>Rhodotorula laryngis</i>
4CE	<i>Cryptococcus aerius</i>	F3C	<i>Candida davisiana</i>
4E	<i>Cryptococcus aerius</i>	F3E	<i>Rhodotorula minuta</i>
5E	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	F4A	<i>Rhodotorula laryngis</i>
7AE	<i>Rhodotorula laryngis</i>	F6E	<i>Debaryomyces hansenii</i>
7BE	<i>Candida davisiana</i>	F7A	<i>Debaryomyces hansenii</i>
8E	<i>Guehomyces pullulans</i>	F7D	<i>Debaryomyces hansenii</i>
10E	<i>Cryptococcus victoriae</i>	F9C	<i>Debaryomyces hansenii</i>
12D	<i>Candida glabosa</i>	F9D	<i>Debaryomyces hansenii</i>
12R	<i>Candida glabosa</i>	F9E	<i>Debaryomyces hansenii</i>
13R	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	F9F	<i>Debaryomyces hansenii</i>
14BE	<i>Candida glabosa</i>	F9H	<i>Debaryomyces hansenii</i>
14E	<i>Cryptococcus victoriae</i>	F12A	<i>Debaryomyces hansenii</i>
15E	<i>Candida glabosa</i>	F12B	<i>Debaryomyces hansenii</i>
17E	<i>Candida glabosa</i>	F12C	<i>Leucosporidiella fragaria</i>
19DA	<i>Cryptococcus victoriae</i>	F12D	<i>Rhodotorula laryngis</i>
19DB	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	F13D	<i>Debaryomyces hansenii</i>
19R	<i>Cryptococcus victoriae</i>	F13E	<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>
20E	<i>Metschnikowia australis</i>	F18A	<i>Debaryomyces hansenii</i>
21R	<i>Candida glabosa</i>	F18B	<i>Debaryomyces hansenii</i>
22AE	<i>Cryptococcus gastricus</i>	F20A	<i>Leucosporidiella muscorum</i>
22BE	<i>Cryptococcus gilvescens</i>	F22B	<i>Candida zeylanoides</i>
24E	<i>Candida glabosa</i>	F24A	<i>Debaryomyces macquariensis</i>
29AE	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	F26A	<i>Rhodotorula laryngis</i>
29BE	<i>Debaryomyces hansenii</i>	F26D	<i>Cryptococcus victoriae</i>
32R	<i>Metschnikowia australis</i>	F26E	<i>Rhodotorula laryngis</i>
33AE	<i>Rhodotorula laryngis</i>	F27A	<i>Metschnikowia australis</i>
35E	<i>Debaryomyces hansenii</i>	F32A	<i>Debaryomyces hansenii</i>
36E	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	F32B	<i>Debaryomyces hansenii</i>
37E	<i>Cryptococcus tephrensensis</i>	F32C	<i>Debaryomyces hansenii</i>
37BE	<i>Metschnikowia australis</i>	F32D	<i>Debaryomyces hansenii</i>
39E	<i>Metschnikowia australis</i>	F33B	<i>Rhodotorula laryngis</i>
41E	<i>Candida sake</i>	F36A	<i>Candida sake</i>
F3A	<i>Candida davisiana</i>	F39A	<i>Debaryomyces hansenii</i>

III. 3.4. Selección primaria de las levaduras

III. 3.4.1 Producción de pectinasas

Se evaluó la capacidad de las levaduras de producir enzimas pectinolíticas usando el método descrito por Merín et al. (2011) con modificaciones. Para este ensayo se empleó medio YNB (Yeast Nitrogen Base) suplementado con 1 % de pectina (Sigma-Aldrich) como única fuente de carbono. Las levaduras se sembraron en estrías en placas de Petri y se incubaron a 25 °C durante 48-72 h. Luego de este período, las placas se incubaron con Lugol durante 1 h a temperatura ambiente. La actividad pectinolítica se detectó por la formación de un halo incoloro alrededor de la colonia. Las levaduras capaces de producir pectinasas fueron descartadas ya que son capaces de degradar las pectinas presentes en la fruta y por lo tanto, no son aptas para su uso como controladores biológicos.

III. 3.4.2. Capacidad de las levaduras de crecer en jugo de manzana en frío

Para las cepas que no tuvieron actividad pectinolítica se determinó su capacidad de crecer en jugo de manzana (Conaprole) a (0 ± 1) °C. El ensayo se llevó a cabo en matraces de 250 mL con 50 mL de jugo de manzana los cuales fueron esterilizados en autoclave. Cada matraz fue inoculado con 50 μ L de una suspensión de concentración 1×10^7 células mL⁻¹ de la levadura a ensayar. Para la preparación de las suspensiones se emplearon cultivos frescos de 24 h en PDA (Potato Dextrose Agar) y las concentraciones de dichas suspensiones se ajustaron mediante conteo en cámara de Neubauer. Los matraces fueron almacenados en cámara fría a (0 ± 1) °C y 150 rpm durante 10 días. El crecimiento de las levaduras se determinó mediante medidas de absorbancia a 600 nm luego de 10 días de incubación.

III. 3.4.3. Capacidad de las levaduras de crecer a 37 °C

Para las levaduras seleccionadas en los ensayos anteriores se evaluó su capacidad de crecer a 37 °C. Para ello se prepararon viales de 20 mL conteniendo 5 mL de medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth). Los matraces fueron inoculados con una suspensión de concentración 1×10^7 células mL⁻¹ de la levadura a ensayar e incubados a 37 °C con agitación orbital a 150 rpm durante 4 días. El crecimiento de las levaduras se evaluó mediante medidas de absorbancia a 600 nm luego de 4 días de incubación. Las levaduras capaces de crecer a esta temperatura se descartaron.

III. 3.5. Selección de las levaduras mediante ensayos de control biológico en fruta

Luego de la preselección realizada con los ensayos anteriores, se realizaron ensayos de control biológico de *Penicillium expansum* en fruta. Las frutas se desinfectaron superficialmente con etanol 70 % y se les realizó cinco heridas mediante punción (sección 2 mm, profundidad 4 mm) en la zona ecuatorial de cada fruta. Cada herida se inoculó con 10 µL de una suspensión de 1×10^7 células mL⁻¹ de la levadura a ensayar. Las heridas control se inocularon con 10 µL de agua destilada estéril. La fruta inoculada se mantuvo en cabina de flujo laminar a temperatura ambiente hasta que las heridas se secaron. A continuación, se inoculó cada herida con 10 µL de una suspensión de esporas de *P. expansum* de concentración 1×10^4 esporas mL⁻¹ obtenida a partir de un cultivo de *P. expansum* en medio PDA (incubado por 24 h a 28 °C). La concentración de la suspensión se ajustó mediante conteo en cámara de Neubauer.

Se emplearon seis frutas por tratamiento, por lo que el ensayo contó con 30 repeticiones (n = 30) de cada tratamiento. Luego de la inoculación, las frutas se almacenaron en cámara fría (0 ± 1) °C durante 3 meses.

A la salida de la cámara se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad, calculándose los porcentajes correspondientes a través de las siguientes expresiones matemáticas:

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{N^{\circ} \text{ heridas afectadas}}{N^{\circ} \text{ heridas totales}} \cdot 100$$

Donde:

N° heridas afectadas: cantidad de heridas con síntomas de desarrollo de *P. expansum*

N° heridas totales: cantidad de heridas por tratamiento, n = 30 heridas

$$\% \text{ Severidad} = \frac{\text{Diámetro herida con tratamiento}}{\text{Diámetro herida control}} \cdot 100$$

Donde:

Diámetro herida con tratamiento: diámetro de la lesión causada por *P. expansum* en las heridas tratadas con las levaduras (mm)

Diámetro herida control: diámetro promedio de las lesiones causadas por *P. expansum* en las heridas no tratadas con levaduras (mm)

Se consideró como criterio para la selección de las levaduras antagonistas su capacidad de inhibir la aparición de enfermedad en más del 75 % de los casos (Vero et al. 2002).

III. 3.6. Caracterización de levaduras con actividad biocontroladora

A las levaduras que mostraron actividad biocontroladora en fruta se les evaluaron diferentes mecanismos de acción de manera de caracterizar su acción biocontroladora.

III. 3.6.1. Producción de sideróforos *in vitro*

La producción de sideróforos por parte de las levaduras se evaluó en medio sólido conteniendo CAS (Chrome Azurol S) (Schwyn et al. 1987). Para ello se prepararon placas de Petri donde se sembró una estría de la levadura a ensayar y se incubó a 25 °C durante 48 h. La producción de sideróforos se visualizó como un halo naranja alrededor de la colonia de la levadura.

III. 3.6.2. Producción de quitinasas *in vitro*

La producción de quitinasas se evaluó en medio YNB (Yeast Nitrogen Broth) conteniendo 0,5 % de quitina (Sigma-Aldrich) y 2 % de agar. Se prepararon placas de Petri con el medio anterior, se sembraron las levaduras en forma de estría y se incubaron las placas a 25 °C durante 48 h. La producción de quitinasas se visualizó como un halo claro alrededor de la colonia de la levadura.

III. 3.6.3. Producción de biofilm *in vitro*

La capacidad de las levaduras de formar biofilms se evaluó de acuerdo al ensayo de adherencia descrito por Ruzicka et al. (2007). Para este ensayo se emplearon microplacas de 96 pocillos donde se colocó en cada pocillo 180 µL de jugo de manzana estéril y 20 µL de una suspensión de la levadura de concentración 1×10^7 células mL⁻¹. Como controles negativos se emplearon pocillos donde se agregó únicamente 200 µL de jugo de manzana estéril. Las placas se incubaron a 25 °C durante 2 días. Luego de la incubación los pocillos se vaciaron, se lavaron con agua destilada y se dejaron secar. Una vez secos se agregó a cada pocillo 200 µL de cristal violeta al 1 % y luego de 1 h se enjuagó con agua y se dejó secar. El colorante adherido a la placa se eluyó con una mezcla etanol:acetona (80:20) y se midió la absorbancia a 590 nm (Pedrido et al., 2013). Cada condición se realizó por triplicado y todo el experimento se realizó por duplicado.

III. 3.6.4. Inhibición de la germinación de esporas de *P. expansum* *in vitro*

En primer lugar, se determinó la curva de germinación de *P. expansum* en jugo de manzana en frío y se determinó el tiempo de incubación en el cual se dio el 100 % de germinación de

las esporas. El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos a los que se les agregó 100 μL de jugo de manzana estéril y 10 μL de una suspensión de esporas de *P. expansum* en agua estéril de concentración 1×10^6 esporas mL^{-1} . Las placas se incubaron a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$. A diferentes tiempos se tomaron muestras, se observaron 200 esporas al microscopio y se determinó el porcentaje de germinación. Se consideró a una espora germinada cuando el largo del tubo germinal fue superior al diámetro de la espora (Plascencia-Jatomea et al., 2003). Para evaluar el efecto de las levaduras en la germinación de las esporas del hongo, se realizó un ensayo similar al descrito anteriormente, pero con el agregado adicional de 10 μL de una suspensión de la levadura a ensayar de concentración 1×10^7 células mL^{-1} . En el control se agregó 10 μL de agua estéril en lugar de la suspensión de la levadura. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las placas se incubaron a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ y a los 10 días de incubación se evaluó el porcentaje de germinación.

III.3.6.5. Producción de metabolitos antifúngicos solubles *in vitro*

La producción por parte de las levaduras de metabolitos solubles antifúngicos realizó en ensayos de cultivos duales *in vitro* según la técnica descrita por Spadaro et al. (2002) con modificaciones. Para este ensayo se prepararon placas de Petri con medio Agar Jugo de Manzana (AJM). En cada placa de Petri se colocó un disco de micelio no esporulado de 5 mm de diámetro proveniente de un cultivo en AJM de *P. expansum* de 24 h. En la misma placa se sembró una estría de la levadura a ensayar (Figura III.1) y las placas se incubaron a $25 ^\circ\text{C}$ durante 72 h. Luego del período de incubación se comparó el crecimiento radial del hongo hacia el antagonista con el crecimiento hacia el lado opuesto.

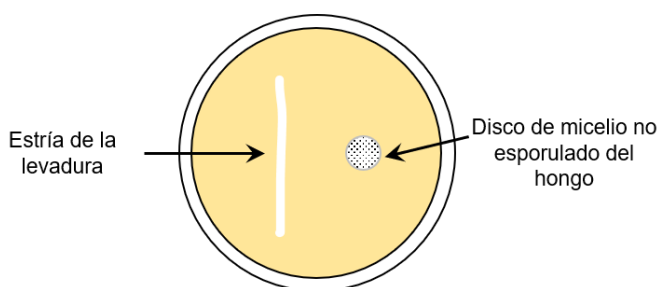


Figura III.1. Esquema del ensayo de producción de compuestos antifúngicos solubles.

III.3.6.6. Producción de metabolitos antifúngicos volátiles

Inhibición del crecimiento micelial *in vitro*

La producción de compuestos antifúngicos volátiles contra *P. expansum* se realizó según Huang et al. (2011) con modificaciones. Para ello se prepararon placas conteniendo AJM y en el centro de la placa se colocó un disco de micelio no esporulado del hongo (cultivo incorporado en medio PDA de 24 h). Al mismo tiempo otra placa de Petri conteniendo AJM se sembró con la levadura a ensayar. Las tapas de las placas se removieron y las bases se unieron y sellaron con Parafilm® (Figura III.2). El control se realizó al unir dos bases de placas, una conteniendo el disco de micelio del hongo y la otra conteniendo únicamente el medio AJM sin levadura inoculada. Los ensayos se realizaron por triplicado.

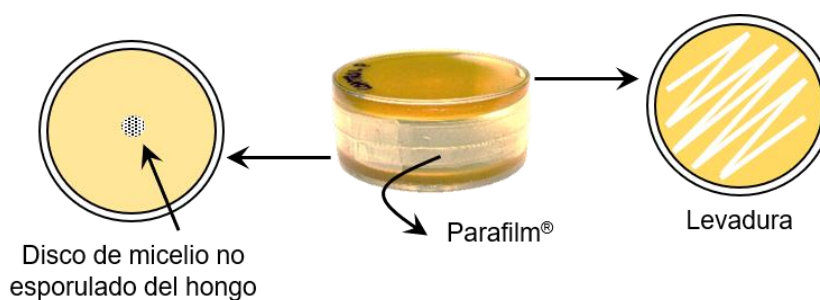


Figura III.2. Esquema del ensayo de inhibición del crecimiento micelial de *P. expansum* debido a los volátiles producidos por las levaduras biocontroladoras.

Estos sets se incubaron a 25 °C por 3 días y luego de la incubación se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo:

$$\text{Inhibición crecimiento micelial (\%)} = \frac{\bar{d}_{control} - d_{tratamiento}}{\bar{d}_{control}} \cdot 100$$

Donde:

$\bar{d}_{control}$: diámetro promedio del crecimiento micelial de *P. expansum* en el control (cm)

$d_{tratamiento}$: diámetro del crecimiento micelial de *P. expansum* en el tratamiento (cm)

Inhibición del desarrollo de *P. expansum* en heridas de manzanas Red Delicious mediante compuestos volátiles (VOCs) producidos por las levaduras

A las levaduras que fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial de *P. expansum in vitro* mediante la producción de compuestos antifúngicos volátiles se les evaluó la capacidad de inhibir el desarrollo de *P. expansum* en heridas de manzanas Red Delicious debido a los

volátiles producidos. El ensayo se llevó a cabo en cajas plásticas estériles (13 × 10 × 9,5 cm, 1,2 L de volumen) donde las tapas fueron llenadas con medio AJM y se inocularon superficialmente con 200 µL de una suspensión de la levadura a ensayar (1×10^7 células mL⁻¹) (Figura III.3).

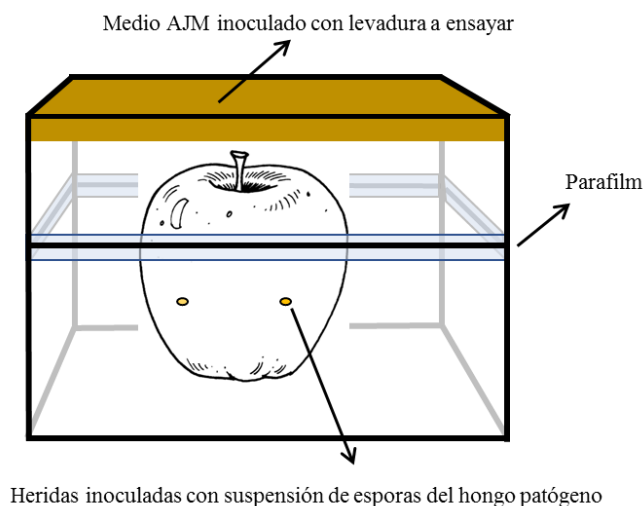


Figura III.3. Esquema del ensayo de inhibición del crecimiento de *P. expansum* en heridas de manzanas Red Delicious por acción de los compuestos volátiles producidos por las levaduras.

Las manzanas fueron desinfectadas superficialmente con etanol 70 % y posteriormente se les realizó 5 heridas en la zona ecuatorial de cada fruta. Las heridas fueron inoculadas con 10 µL de una suspensión de esporas de *P. expansum* de concentración 1×10^4 esporas mL⁻¹. Las manzanas fueron colocadas en las cajas (una fruta por caja), se sellaron con Parafilm® y se incubaron a 25 °C o 0 °C por 7 o 30 días, respectivamente. Los controles consistieron en manzanas inoculadas con el patógeno colocadas en cajas cubiertas con tapas en las cuales no fue inoculada la levadura. Al final del ensayo se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad. Cada tratamiento contó con tres réplicas (n = 15).

Identificación de los compuestos volátiles producidos por las levaduras

Los compuestos volátiles producidos por las levaduras fueron identificados mediante GC-MS. Para ello se realizaron sets de dobles placas conteniendo AJM como se describió en el ensayo de inhibición del crecimiento micelial *in vitro*. Según el objetivo, las placas de los sets fueron inoculadas según el siguiente esquema:

- i) Determinación de los compuestos producidos por la levadura: en una placa se sembró la levadura en medio AJM mientras que la segunda placa contenía únicamente medio AJM.

- ii) Determinación si los compuestos producidos por la levadura estaban afectados por la presencia de *P. expansum*: en una de las placas se sembró la levadura en medio AJM y en la otra placa un disco de micelio no esporulado de *P. expansum*.
- iii) Determinación de los compuestos volátiles producidos por *P. expansum*: en una placa se colocó un disco de micelio no esporulado de *P. expansum* en medio AJM mientras que la otra placa contenía únicamente medio AJM.
- iv) Determinación de los compuestos volátiles liberados por el medio: se emplearon sets de placas conteniendo únicamente medio AJM sin inocular.

Los compuestos volátiles presentes en el espacio entre las placas se adsorbieron en una fibra para microextracción en fase sólida (SPME) de 100 µm de polimetilsiloxano (Supelco). La fibra fue acondicionada previamente a su uso de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Luego del acondicionamiento, la fibra fue insertada entre las placas durante 40 min a 25 °C para adsorber los compuestos volátiles. Los compuestos adsorbidos en la fibra se desorbieron en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases Shimadzu QP2010 Plus (Japón) equipado con una columna DB-5MS acoplado a un espectrómetro de masas (MS). La identificación de los compuestos fue realizada mediante comparación de los espectros de masas y el índice de retención aritmético de los compuestos individuales con aquellos de los estándares presentes en las bases de datos del *National Institute of Standards and Technology* (NIST)/EPA/NIH librería (NIST084) y Adams (2007).

III. 3.7. Estudio de la interacción de la levadura seleccionada y el patógeno en herida de manzanas Red Delicious

En función de los diferentes ensayos llevados a cabo se seleccionó la mejor antagonista para continuar con los ensayos y evaluar la interacción con el patógeno en heridas de manzanas almacenadas en frío.

III. 3.7.1. Ensayos de crecimiento en heridas de manzanas

Se realizaron curvas de crecimiento de la levadura seleccionada y del patógeno, en forma individual y en conjunto, en heridas de fruta almacenadas en cámara fría (0 ± 1) °C.

En primer lugar, las frutas fueron desinfectadas superficialmente con etanol 70 % y se dejaron secar en cabina de flujo laminar. Sobre cada fruta se realizaron tres heridas mediante punción (sección 2 mm, profundidad 4 mm) en la zona ecuatorial y dependiendo del objetivo, las heridas fueron inoculadas con la levadura seleccionada, *P. expansum* o ambos como se describe a continuación:

- i) Cuantificación del crecimiento de la levadura seleccionada: las heridas fueron inoculadas con 10 μ L de una suspensión de la levadura conteniendo 1×10^7 células mL^{-1} .
- ii) Cuantificación del crecimiento de *P. expansum*: las heridas fueron inoculadas con 10 μ L de una suspensión de esporas del hongo de concentración 1×10^4 esporas mL^{-1} .
- iii) Evaluación de la interacción entre la levadura seleccionada y *P. expansum*: las heridas fueron inoculadas con 10 μ L de una suspensión (1×10^7 células mL^{-1}) de la levadura, se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se inocularon con 10 μ L de una suspensión de esporas del hongo de concentración 1×10^4 esporas mL^{-1} .

Luego de la inoculación, las heridas se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se almacenaron las frutas en cámara fría (0 ± 1) °C durante 60 días. A diferentes tiempos de incubación se tomaron frutas y se cuantificó el crecimiento de la levadura y/o del patógeno en las heridas de la fruta. Cada tiempo de muestreo contó con 3 repeticiones.

III. 3.7.2. Cuantificación del crecimiento de la levadura seleccionada en heridas de manzana

El crecimiento de la levadura se siguió por recuento en placa de las levaduras viables en cada herida. Para ello, cada herida retirada de la manzana se colocó en un tubo eppendorf de 2 mL conteniendo 1 mL de suero fisiológico con Tween[®] 80 (agua + 0,9 % peso NaCl + 0,1 % Tween[®] 80). Los tubos se agitaron en vórtex durante 5 minutos. De la suspensión resultante se realizaron diluciones seriadas y 100 µL de estas se sembraron en placas de PDA. Las placas se incubaron a 25 °C durante 48 h. Luego de la incubación se contó el número de colonias por placa correspondientes a la levadura inoculada. Cada tiempo de muestreo contó con 3 repeticiones.

III. 3.7.3. Cuantificación del crecimiento de *Penicillium expansum* en heridas de manzana empleando qPCR

Extracción de ADN de *P. expansum* de heridas de manzanas

Para la extracción de ADN de *P. expansum* se retiraron las heridas de las manzanas y dependiendo de la masa del tejido afectado se siguieron dos procedimientos. Si la masa de las heridas fue inferior a 0,3 g se empleó la totalidad de la herida para la extracción de ADN, la cual se llevó a cabo empleando el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research). En el caso de heridas con pudrición, donde la masa de tejido afectado fue de entre 5 y 25 g, la extracción de ADN se realizó a partir de una fracción del tejido afectado. Para ello, la totalidad del tejido afectado (herida) se pesó, se agregó agua estéril de forma de lograr una dilución 1 en 5 y se homogeneizó en Stomacher (Seward, Reino Unido) a máxima velocidad durante 2 min. Un volumen de 1 mL de la suspensión obtenida se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y del pellet obtenido se realizó la extracción de ADN empleando el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research). Este ensayo se realizó por triplicado.

Condiciones de amplificación de la qPCR

A partir de las soluciones de ADN obtenidas se realizó la qPCR empleando los primers correspondientes a la amplificación del gen patF (GenBank Acc No. AIG62137) asociado a la biosíntesis de patulina en *P. expansum* (Tannous et al., 2015). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador RotorGene Q (Qiagen, Hilden, Alemania) contando con una

etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 3 min, 40 ciclos de una etapa a 95 °C durante 20 s y otra etapa de hibridación-extensión a 65 °C durante 20 s siendo en esta etapa donde se tomó la lectura de la fluorescencia. Siguiendo el último ciclo de amplificación, se realizó una curva de disociación mediante la medida continua de la fluorescencia variando la temperatura de 55 a 95 °C a una velocidad de calentamiento de 0,5 °C s⁻¹ de forma de confirmar la especificidad de la amplificación. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen total de 10 µL los cuales consistieron en 5 µL de la mezcla Rotor-Gene™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Venlo, Holanda), 0,5 µL de cada primer (25 µM), 3 µL de agua MiliQ estéril y 1 µL de ADN.

Curva de calibración de ADN de *Penicillium expansum*

Para la cuantificación del ADN de *P. expansum* presente en las heridas de las frutas se realizó una curva de calibración con ADN extraído de micelio de *P. expansum*. La extracción de ADN se realizó a partir de micelio obtenido de un cultivo de *P. expansum* en medio líquido YES (Yeast Extract Sucrose) incubado a 28 °C durante 7 días. El micelio obtenido se secó con papel estéril y se colocaron aproximadamente 200 mg de micelio en el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research). La concentración de ADN extraído se determinó con un kit de fluorescencia Quant-iT ds DNA (Invitrogen, USA) en un fluorímetro Qubit (Invitrogen, USA). Para la realización de la curva estándar se realizaron diluciones seriadas de entre 1 y 0,0001 ng µL⁻¹ de ADN y se realizaron las reacciones de PCR en las condiciones descritas anteriormente. La curva de calibración se construyó a partir de los valores de Ct de cada dilución versus el logaritmo de la concentración de ADN. Cada amplificación se realizó por duplicado.

Evaluación del efecto matriz en la cuantificación del ADN de *Penicillium expansum* en heridas de manzanas

Previo a la cuantificación del crecimiento del hongo en la herida se evaluó el efecto de la matriz (fruta) en la cuantificación del ADN de *P. expansum*. Para ello se realizó la reacción de PCR con una concentración de ADN de *P. expansum* de 0,01 ng µL⁻¹ en agua y en diferentes diluciones (0, 1/2, 1/5 y 1/10) de la extracción de ADN de la matriz. La extracción de ADN de la matriz se realizó a partir de pulpa de fruta sana (aprox. 0,3 g) utilizando el kit Quick-DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research).

III. 3.7.4. Visualización del crecimiento de la levadura seleccionada y *P. expansum* en heridas de manzanas mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

Mediante esta técnica se evaluó la interacción entre las levaduras, el hongo patógeno y la fruta. Para ello se procedió en forma similar a los ensayos anteriores, donde las heridas de manzanas Red Delicious fueron inoculadas con la levadura, el patógeno o ambos y posteriormente fueron almacenadas en cámara fría (0 ± 1) °C durante 45 días.

Para la observación en el microscopio se realizaron cortes alrededor de la herida (aproximadamente 1 cm de diámetro), se sacaron las heridas de la fruta y se realizó un corte transversal de modo de dejar expuesto el interior de la herida. Las muestras se fijaron empleando glutaraldehído al 2 % (v/v) durante 5 min. Luego de esto las muestras se enjuagaron con agua destilada y fueron parcialmente deshidratadas mediante un gradiente de etanol (30, 50, 70, 80, 95 y 100 %) durante 20 min (Hernandez-Montiel et al., 2018). Las muestras fueron sometidas a secado por punto crítico de CO₂ y posterior recubrimiento con oro. Estos ensayos fueron llevados a cabo por la Unidad de Microscopía Electrónica de la Facultad de Ciencias (Udelar) empleando un equipo Jeol JSM-5900 LV.

III. 3.8. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de un análisis de varianza de una vía, utilizando la prueba de Tukey para comparar las medias de los tratamientos considerando un nivel de significancia de 0,05. El análisis estadístico de la incidencia en los ensayos de control biológico se realizó a través del modelo lineal generalizado asumiendo una distribución binomial y utilizando la función logit. Los tratamientos fueron comparados utilizando el test DGC (Di Rienzo et al. 2002) con un nivel de significancia de 0,05. Para estos análisis se empleó el software InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009).

III.4. RESULTADOS

III. 4.1. Selección primaria de las levaduras

La selección primaria de las levaduras se basó en la producción de pectinasas, capacidad de crecer en jugo de manzana en frío y en medio PDB a 37 °C. Esta selección previa se empleó para reducir el número de levaduras a evaluar en los ensayos de control biológico en fruta. En el ensayo de producción de pectinasas se descartaron 32 levaduras debido a que se evidenció su capacidad de producir estas enzimas. Las pectinasas son capaces de degradar las pectinas presentes en las frutas, por lo que, el empleo de estas levaduras podría incidir negativamente en la fruta a tratar. Para el resto de los ensayos se continuó con 36 levaduras (Tabla III.3 y Figura III.4), las que pertenecen a los géneros *Cryptococcus*, *Leucosporidiella*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Debaryomyces* y *Metschnikowia*, predominando la especie *Debaryomyces hansenii* con 19 cepas.

Tabla III.3. Levaduras empleadas en los ensayos de control biológico en fruta.

Código	Identificación	Código	Identificación
4BE	<i>Cryptococcus keelungensis</i>	F9D	<i>Debaryomyces hansenii</i>
5E	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	F9E	<i>Debaryomyces hansenii</i>
7AE	<i>Rhodotorula laryngis</i>	F9F	<i>Debaryomyces hansenii</i>
12R	<i>Candida glabosa</i>	F9H	<i>Debaryomyces hansenii</i>
12D	<i>Candida glabosa</i>	F12A	<i>Debaryomyces hansenii</i>
13R	<i>Leucosporidiella fragaria</i>	F12B	<i>Debaryomyces hansenii</i>
15E	<i>Candida glabosa</i>	F12C	<i>Leucosporidiella fragaria</i>
17E	<i>Candida glabosa</i>	F13D	<i>Debaryomyces hansenii</i>
29BE	<i>Debaryomyces hansenii</i>	F18A	<i>Debaryomyces hansenii</i>
32R	<i>Metschnikowia australis</i>	F18B	<i>Debaryomyces hansenii</i>
35E	<i>Debaryomyces hansenii</i>	F26E	<i>Rhodotorula laryngis</i>
36E	<i>Cryptococcus albidosimilis</i>	F27A	<i>Metschnikowia australis</i>
39E	<i>Metschnikowia australis</i>	F32A	<i>Debaryomyces hansenii</i>
41E	<i>Candida Sake</i>	F32B	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F3B	<i>Rhodotorula laryngis</i>	F32C	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F7A	<i>Debaryomyces hansenii</i>	F32D	<i>Debaryomyces hansenii</i>
F7D	<i>Debaryomyces hansenii</i>	F36A	<i>Candida sake</i>
F9C	<i>Debaryomyces hansenii</i>	F39A	<i>Debaryomyces hansenii</i>

III – ESTRATEGIAS DE CONTROL BIOLÓGICO

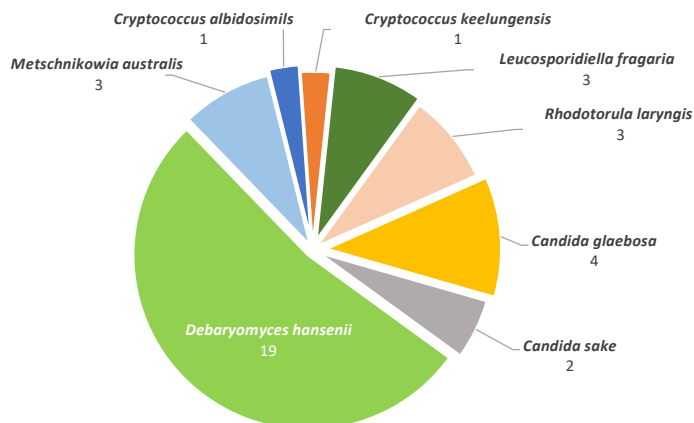


Figura III.4. Levaduras empleadas en los ensayos de control biológico en fruta.

Estas 36 levaduras fueron capaces de crecer en jugo de manzana almacenado a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ y no fueron capaces de crecer en medio PDB a $37 ^\circ\text{C}$ y por lo tanto se emplearon en los ensayos de control biológico en fruta. El crecimiento en jugo de manzana en frío nos permitió seleccionar levaduras con potencial capacidad de crecer en las heridas de las frutas almacenadas en cámara fría. El crecimiento a $37 ^\circ\text{C}$ se consideró para descartar levaduras que sean capaces de crecer a temperatura corporal humana y, por lo tanto, podrían ser potenciales patógenos.

III. 4.2. Selección de levaduras mediante ensayos de control biológico en fruta

Esta etapa de selección se basó en la capacidad de las levaduras de inhibir el desarrollo del *P. expansum* en heridas de manzanas Red Delicious almacenadas en frío. En la Figura III.5 se muestran los resultados de incidencia de la enfermedad en los distintos tratamientos con las levaduras.

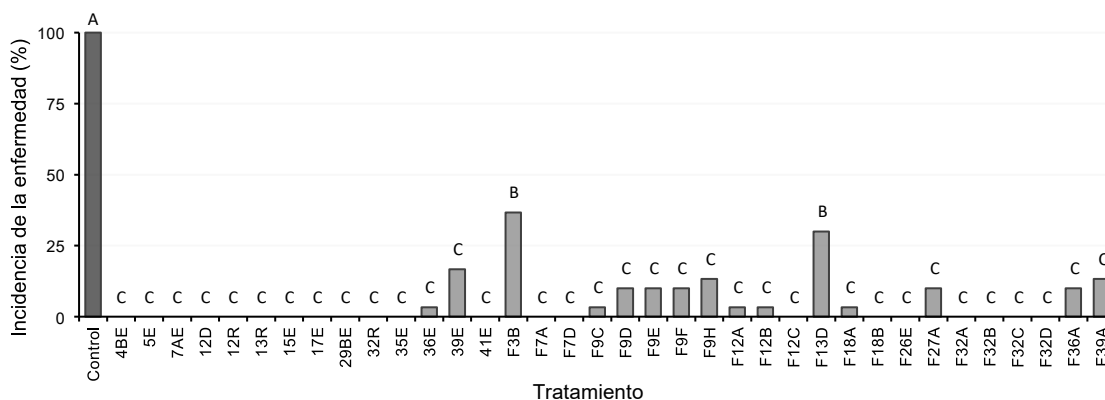


Figura III.5. Incidencia de la enfermedad causada por *Penicillium expansum* en manzanas Red Delicious inoculadas con levaduras. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), el control corresponde al tratamiento sin agregado de levaduras.

El tratamiento con las levaduras mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en la incidencia de la enfermedad comparadas con las heridas control (heridas inoculadas con agua estéril en lugar de la levadura). Se puede observar que 34 de las 36 levaduras fueron capaces de reducir la incidencia de la enfermedad por debajo del 25 %. Tomando en cuenta el criterio planteado por Vero et al. (2002) se puede considerar que estas 34 levaduras cumplieron con este criterio y, por lo tanto, podrían ser potenciales antagonistas de *P. expansum* en manzanas Red Delicious. A su vez, hay que destacar que 21 de estas levaduras protegieron en un 100 % la aparición de la enfermedad.

III. 4.3. Caracterización de levaduras con actividad biocontroladora

Para las 34 levaduras seleccionadas en la etapa anterior se estudiaron diferentes mecanismos de acción con la intención de dilucidar la actividad biocontroladora y contribuir así a la selección final de la levadura.

III. 4.3.1. Producción de sideróforos, quitinasas y formación de biofilm *in vitro*

En los ensayos de producción de sideróforos se detectaron seis levaduras capaces de producir estos compuestos. Estas cepas pertenecen a las especies *Rhodotorula laryngis* (7AE), *Candida glabrosa* (12D, 15E y 17E), *Debaryomyces hansenii* (F12B) y *Candida sake* (F36A).

En el ensayo en medio con quitina como fuente de carbono, ninguna de las levaduras fue capaz de producir quitinasas, mientras que 9 levaduras pertenecientes a las especies *Metschnikowia australis* (32R, 39E), *Debaryomyces hansenii* (35E, F7D, F18B, F32A, F32C y F39A) y *Cryptococcus albidosimilis* (36E) fueron capaces de producir biofilm en las condiciones del ensayo.

III.4.3.2. Inhibición de la germinación de esporas de *P. expansum* *in vitro*

La inhibición de la germinación de esporas de *P. expansum* en la presencia de las levaduras a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ se evaluó luego de 10 días de incubación. Este tiempo se definió en un primer ensayo donde se determinó la curva de germinación de las esporas en jugo de manzana en frío (Figura III.6). En este ensayo se observó que las esporas tardaron 5 días en comenzar a germinar, alcanzándose el 100 % de la germinación a los 10 días de incubación.

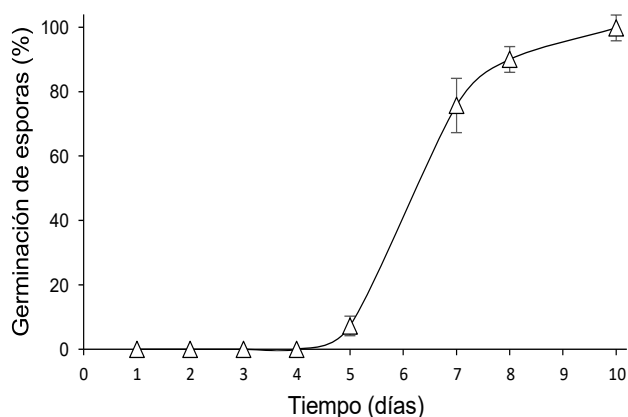


Figura III.6. Curva de germinación de esporas de *P. expansum* en jugo de manzana almacenado a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Las barras de error representan el intervalo de confianza (IC).

A partir de estos resultados se evaluó la capacidad de las levaduras de inhibir la germinación de las esporas de *P. expansum* en jugo de manzana a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ luego de 10 días de incubación. Todas las levaduras presentaron cierto grado de inhibición de la germinación de esporas del hongo con valores de inhibición entre 4 y 54 % (Figura III.7).

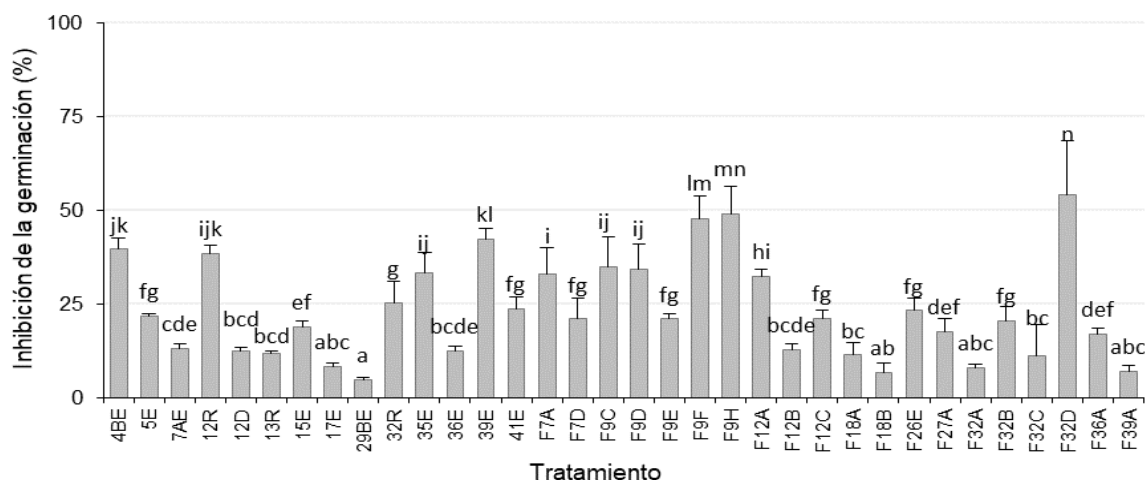


Figura III.7. Inhibición de la germinación de esporas de *P. expansum* en presencia de las levaduras biocontroladoras. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,5$). Las barras de error representa el IC.

III. 4.3.3. Producción de compuestos antifúngicos solubles

En el ensayo de cultivos duales *in vitro*, donde se colocó un disco de micelio del hongo y se sembró una estría de la levadura en la misma placa, se observó, en todos los casos, que el hongo fue capaz de crecer en toda la placa. La presencia de las levaduras no provocó halos de inhibición ni afectó el crecimiento del hongo, por lo que se puede afirmar que las

levaduras no fueron capaces de producir compuestos solubles que inhibieran el crecimiento de *P. expansum*.

III. 4.3.4. Producción de compuestos antifúngicos volátiles

Inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium expansum* *in vitro*

En este ensayo solo dos levaduras pertenecientes a la especie *Candida sake* fueron capaces de inhibir el crecimiento de *P. expansum* mediante la producción de compuestos volátiles a 25 °C. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial fue de $(60,3 \pm 1,3)$ % y $(45, \pm 1,4)$ % para las levaduras *C. sake* 41E y *C. sake* F36A, respectivamente. La inhibición lograda por la cepa 41E fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la mostrada por la cepa F36A (Figura III.8). La inhibición también se observó cuando el ensayo se llevó a cabo a 0 °C, con porcentajes de inhibición de $(68,4 \pm 4,7)$ % y $(28,7 \pm 2,4)$ % con las cepas 41E y F36A, respectivamente.

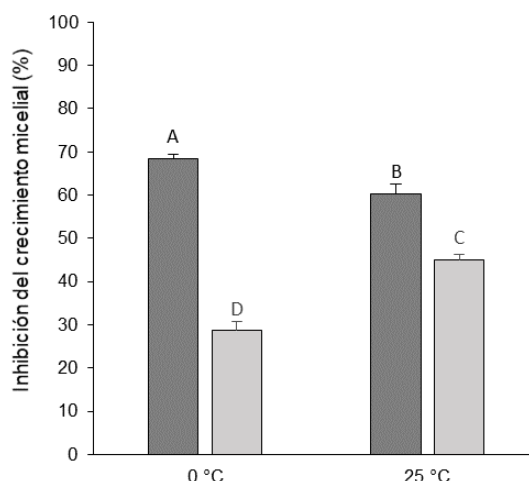


Figura III.8. Inhibición del crecimiento micelial de *P. expansum* mediante los compuestos volátiles producidos por *C. sake* 41E (■) y *C. sake* F36A (□) a 0 y 25 °C. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,5$). Las barras de error representan el IC.

Debido a los buenos resultados obtenidos en la inhibición de *P. expansum* mediante los volátiles producidos por *C. sake* 41E y *C. sake* F36A, se decidió evaluar la capacidad de estas levaduras de inhibir a los patógenos *Botrytis cinerea*, *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata* y *Alternaria arborescens* a 0 y 25 °C.

Los resultados de estos ensayos se publicaron en el trabajo: Arrarte, E., Garmendia, G., Rossini, C., Wisniewski, M., Vero, S. (2017) Volatile organic compounds produced by

Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control* 109:14-20 (Anexo 2).

En esos ensayos, se observó que en todos los casos el nivel de inhibición resultante de los compuestos volátiles producidos por la cepa 41E fueron significativamente mayores que el nivel obtenido para la cepa F36A. Por tal razón, se decidió continuar con el estudio de los volátiles producidos por la levadura 41E.

Inhibición del desarrollo de *P. expansum* en heridas de manzanas Red Delicious mediante los VOCs producidos por *C. sake* 41E

La incidencia de la enfermedad en manzanas Red Delicious almacenadas durante 7 días a 25 ° en presencia de los compuestos volátiles producidos por *C. sake* 41E fue del 100 %. Sin embargo, la severidad se redujo al 62 % comparado con el control (Figura III.9).

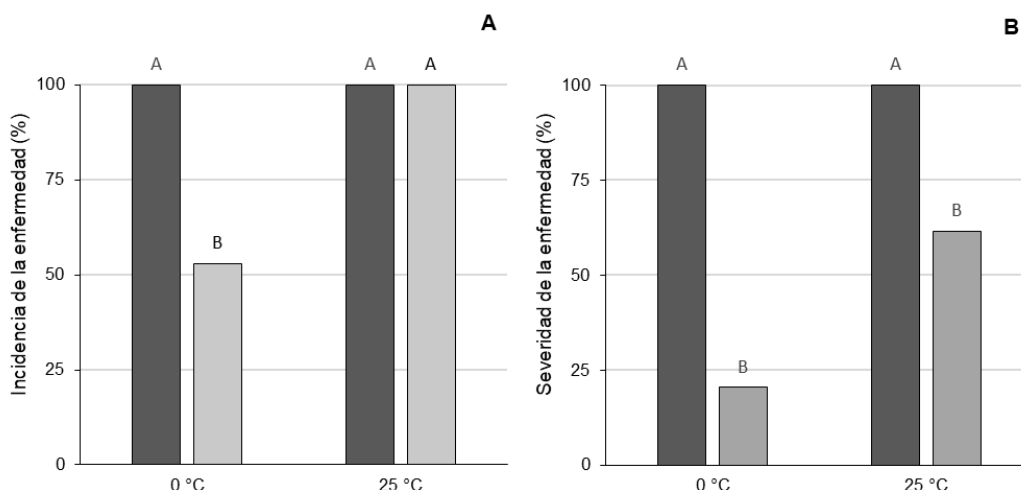


Figura III.9. Incidencia (A) y severidad (B) de la enfermedad causada por *P. expansum* en manzanas Red Delicious en ausencia (■) y presencia (■) de la levadura 41E a 0 °C y 25 °C. Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Cuando el ensayo se llevó a cabo a 0 °C, la incidencia de la enfermedad luego de 30 días de incubación se redujo a 53 % debido a la presencia de los volátiles producidos por la levadura, mientras que la severidad fue de 20 % con respecto al control.

Identificación de los compuestos volátiles producidos por *C. sake* 41E

Los compuestos volátiles (VOCs) producidos por la cepa 41E en medio AJM fueron identificados mediante GC-MS. En la Figura III.10 se muestran los cromatogramas obtenidos para los diferentes ensayos realizados.

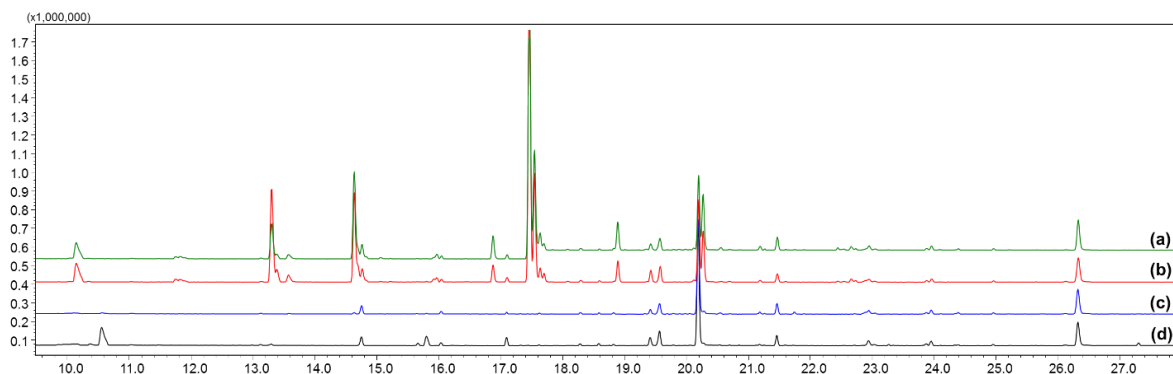


Figura III.10. Cromatograma de los VOCs extraídos en la técnica de SPME. (a) set conteniendo *C. sake* 41E y *P. expansum*, (b) Set conteniendo únicamente *C. sake* 41 E, (c) Set conteniendo únicamente *P. expansum*, (d) Set conteniendo solo el medio de cultivo (AJM).

En este ensayo no se detectó la producción de VOCs por parte del *P. expansum*, ya que el cromatograma del set conteniendo únicamente medio AJM (Figura III.10 (d)) fue similar al cromatograma obtenido cuando el set fue inoculado con *P. expansum* en el medio AJM (Figura III.10 (c)). A su vez, se observó que los VOCs liberados por la levadura fueron similares en ausencia y presencia del patógeno (Figura III.10 (a) y (b)).

Para identificar los volátiles producidos por *C. sake* 41E no se consideraron los VOCs liberados por el medio AJM (Figura III.10 (d)). Mediante los espectros de masa y la comparación de los índices de retención aritméticos, calculados a partir de los cromatogramas, con las bases de datos NIST y Adams (2007) se identificaron 11 compuestos (Tabla III.4).

Tabla III.4. Compuestos volátiles producidos en Agar Jugo de Manzana por *C. sake* 41E

TR (min) ^a	IR ^b	% Similitud ^c	Possible compuesto	AR (%) ^d	PM ^e
10,153	1001	90	Etil hexanoato	3,45	144
13,304	1108	94	3-metilbutil pentanoato	29,05	172
13,575	1117	92	2-Feniletanol	2,09	122
14,640	1153	96	2-metilpropil hexanoato	11,16	172
16,878	1231	88	3,7-Dimetil-6-octen-1-ol	1,16	156
17,464	1252	96	3-metilbutil hexanoato	37,08	186
17,547	1256	95	Pentilhexanoato	9,68	186
17,704	1261	86	2-feniletil acetato	0,47	228
18,894	1305	81	3-metilbutil Ciclopentanocarboxilato	1,24	184
20,270	1356	91	6-Octen-1-ol,3,7-dimetil-, propionato	3,80	212
22,660	1449	87	3-metilbutil octanoato	0,82	214

^aTiempo de retención en el GC, ^b Tiempo de Retención Aritmético (calculado siguiendo Adams (2007)), ^c % similitud NIST, ^d Área de Pico Relativa (%) basado en los 11 compuestos identificados, ^e Peso Molecular.

Los compuestos identificados son principalmente ésteres de ácidos de cadena corta donde los compuestos más abundantes fueron 3-metilbutil hexanoato, 3-metilbutil pentanoato, 2-metilpropil hexanoato y el pentilhexanoato.

Actualmente me encuentro desarrollando un proyecto CSIC-Iniciación que continua con el estudio de estos volátiles. En el cual se están estudiando los volátiles producidos ambas cepas.

III. 4.3.5. Mecanismos de acción de las levaduras con actividad biocontroladora

En la Tabla III.5 se presenta un resumen de los diferentes mecanismos de acción de las 34 levaduras que mostraron una buena capacidad antagonista de *P. expansum* en manzanas Red Delicious almacenadas a (0 ± 1) °C. Como se puede observar no existe un único mecanismo por el cual las levaduras podrían estar ejerciendo su actividad biocontroladora.

III – ESTRATEGIAS DE CONTROL BIOLÓGICO

Tabla III.5. Caracterización de las levaduras biocontroladoras

Levadura	Compuestos antifúngicos volátiles	Compuestos antifúngicos solubles	Sideróforos	Quitinasas	Biofilm	Inhibición germinación de esporas (%)
4BE	-	-	-	-	-	39,6 ± 3,2 jk
5E	-	-	-	-	-	21,7 ± 0,8 fg
7AE	-	-	+	-	-	13,2 ± 1,1 cde
12R	-	-	-	-	-	38,4 ± 2,4 ijk
12D	-	-	+	-	-	12,5 ± 0,9 bcd
13R	-	-	-	-	-	11,9 ± 0,5 bcd
15E	-	-	+	-	-	18,9 ± 1,5 ef
17E	-	-	+	-	-	8,3 ± 1,0 abc
29BE	-	-	-	-	-	4,7 ± 0,6 a
32R	-	-	-	-	+	25,3 ± 5,8 g
35E	-	-	-	-	+	33,3 ± 5,4 ij
36E	-	-	-	-	+	12,6 ± 1,0 bcde
39E	-	-	-	-	+	42,2 ± 3,1 kl
41E	+	-	-	-	-	23,6 ± 3,2 fg
F7A	-	-	-	-	-	33,1 ± 9,5 i
F7D	-	-	-	-	+	21,2 ± 7,1 fg
F9C	-	-	-	-	-	34,9 ± 10,7 ij
F9D	-	-	-	-	-	34,2 ± 4,3 ij
F9E	-	-	-	-	-	21,0 ± 1,9 fg
F9F	-	-	-	-	-	47,9 ± 7,9 lm
F9H	-	-	-	-	-	49,0 ± 9,9 mn
F12A	-	-	-	-	-	32,3 ± 2,6 hi
F12B	-	-	+	-	-	12,8 ± 2,3 bcde
F12C	-	-	-	-	-	21,2 ± 7,3 fg
F18A	-	-	-	-	-	11,3 ± 4,4 bc
F18B	-	-	-	-	+	6,7 ± 3,5 ab
F26E	-	-	-	-	-	23,2 ± 3,3 fg
F27A	-	-	-	-	-	17,6 ± 3,4 def
F32A	-	-	-	-	+	8,1 ± 0,9 abc
F32B	-	-	-	-	-	20,5 ± 3,7 fg
F32C	-	-	-	-	+	11,3 ± 8,1 bc
F32D	-	-	-	-	-	54,2 ± 14,3 n
F36A	+	-	+	-	-	16,9 ± 1,8 def
F39A	-	-	-	-	+	7,1 ± 1,6 abc

(-) resultado negativo, (+) resultado positivo.

Valores con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,5$).

III. 4.4. Selección final de una levadura biocontroladora

Debido a que ninguna de las levaduras presentó una ventaja evidente con respecto a las demás como para ser seleccionada, se decidió evaluar a las 34 levaduras en otras frutas. La selección final de una levadura antagonista se basó en la capacidad de la levadura de controlar el desarrollo de *P. expansum* en otras frutas durante el almacenamiento poscosecha en frío (0 ± 1) °C. Se decidió trabajar con la variedad de manzana Granny Smith que es una de las variedades más cultivadas en Uruguay y peras de la variedad Williams, por ser las peras el segundo cultivo de árboles de hoja caduca de mayor importancia en Uruguay (Anuario Estadístico. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, 2017).

Los ensayos de control biológico se realizaron en forma similar a los planteados para manzanas Red Delicious. Cuando se realizaron ensayos con manzanas Granny Smith se observaron 12 levaduras que lograron que la incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum* fuera significativamente inferior ($p < 0,05$) a la alcanzada en el control (Figura III.11). Estas levaduras pertenecen a las especies *Rhodotorula laryngis* (7AE), *Candida glabrata* (12D), *Debaryomyces hansenii* (29BE, F7A, F7D, F9C, F9D, F9E, F12B y F32B), *Candida sake* (41E) y *Leucosporidiella fragaria* (F12C). Las cepas F7A y F9E de *Debaryomyces hansenii* fueron capaces de proteger en un 100 % la aparición de pudrición.

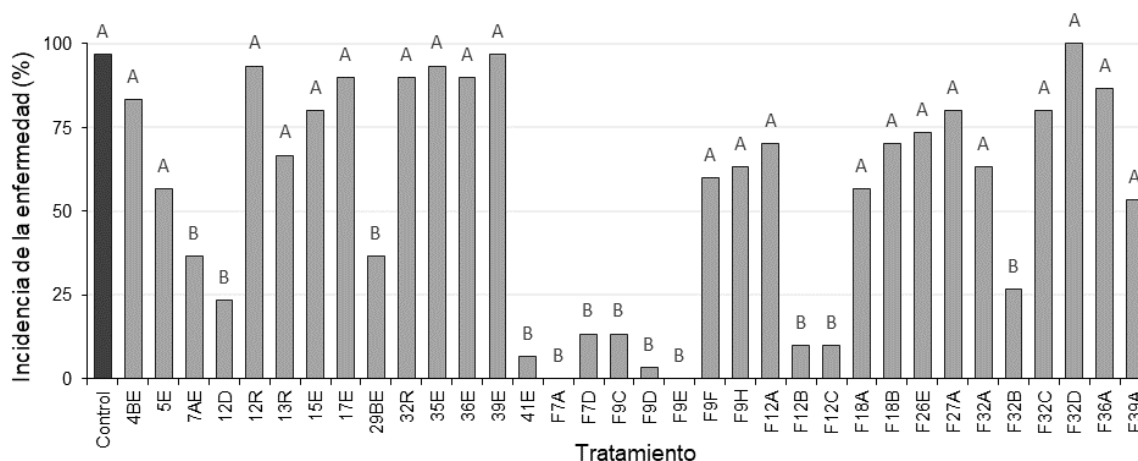


Figura III.11. Incidencia de la enfermedad causada por *Penicillium expansum* en manzanas Granny Smith inoculadas con levaduras. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), el control corresponde al tratamiento sin el agregado de las levaduras.

En el caso de las 12 levaduras mencionadas anteriormente, la severidad de las lesiones en heridas no protegidas fue significativamente menor que la registrada en las heridas control (Figura III.12), confirmando su potencial como microorganismos biocontroladores.

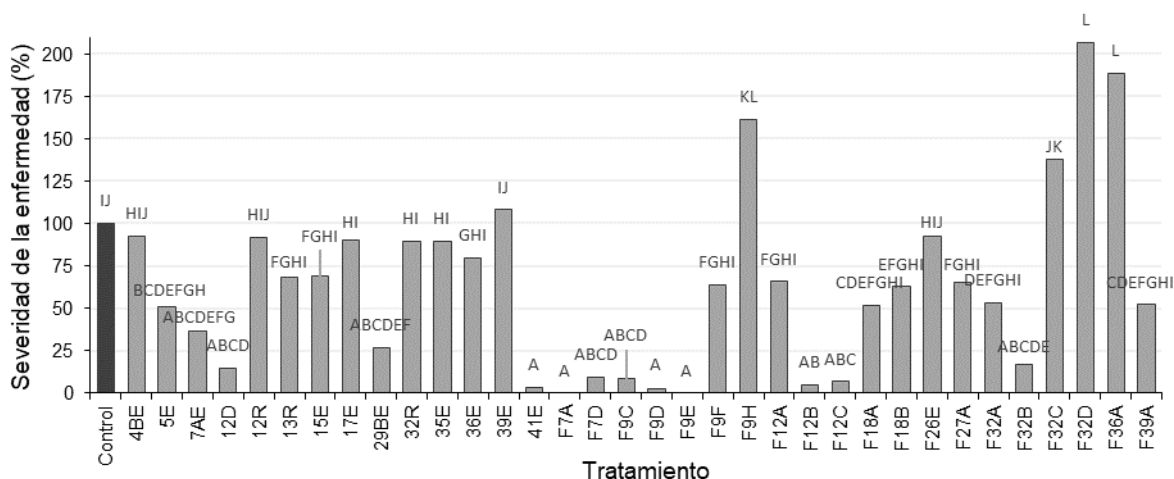


Figura III.12. Severidad de la enfermedad causada por *Penicillium expansum* en manzanas Granny Smith inoculadas con levaduras. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), el control corresponde al tratamiento sin el agregado de las levaduras.

En el ensayo de biocontrol de *P. expansum* en pera Williams se observó que 4 levaduras lograron incidencias de la enfermedad cercanas al 25 % (Figura III.13) y que fueron significativamente inferiores al control ($p < 0,05$). Estas levaduras pertenecen a las especies *Leucosporidiella fragaria* (5E) y *Debaryomyces hanseni* (F9D, F12A y F12B).

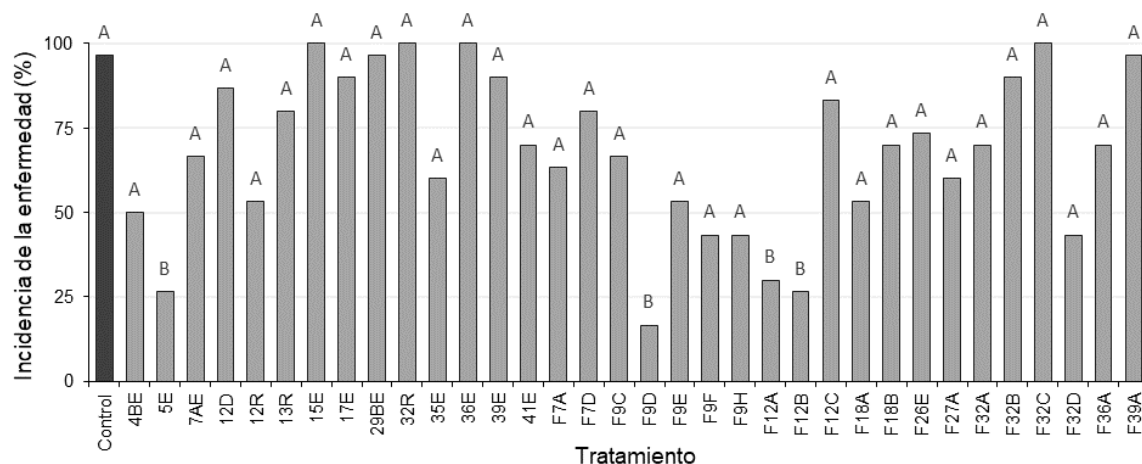


Figura III.13. Incidencia de la enfermedad causada por *Penicillium expansum* en peras Williams inoculadas con levaduras. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), el control corresponde al tratamiento sin el agregado de las levaduras.

El ensayo con peras resultó ser el más exigente, debido a que, por la naturaleza de la fruta, ésta es más susceptible a desarrollar pudrición por *P. expansum*. A pesar de observar que la incidencia de la enfermedad fue alta, la severidad en una gran mayoría de las levaduras fue significativamente menor que en el control (Figura III.14).

III – ESTRATEGIAS DE CONTROL BIOLÓGICO

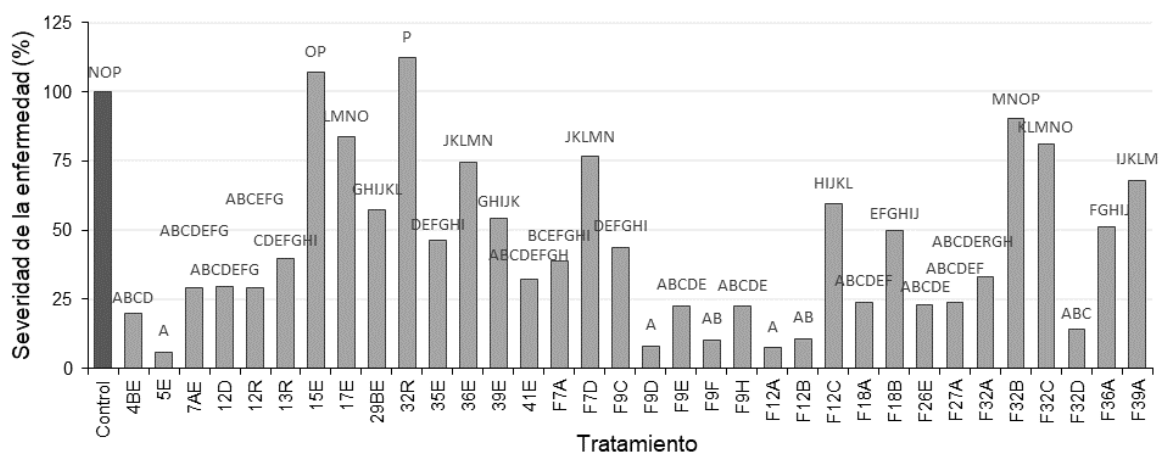


Figura III.14. Severidad de la enfermedad causada por *Penicillium expansum* en peras Williams inoculadas con levaduras. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$), el control corresponde al tratamiento sin el agregado de las levaduras.

Mediante los ensayos de control biológico realizados logramos encontrar levaduras como potenciales agentes de control biológico en diferentes patosistemas. Si se observa el desempeño de las levaduras en los tres patosistemas, se destacan dos levaduras de la especie *Debaryomyces hansenii* codificadas como F12B y F9D que fueron capaces de reducir significativamente la incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum* en todos los casos. Debido a que ambas cepas pertenecen a la misma especie y mostraron desempeños muy similares, se decidió continuar los ensayos con una de ellas, la cepa F9D.

Para confirmar la consistencia de los resultados de biocontrol en fruta, se decidió repetir estos ensayos con la levadura F9D (Figura III.15).

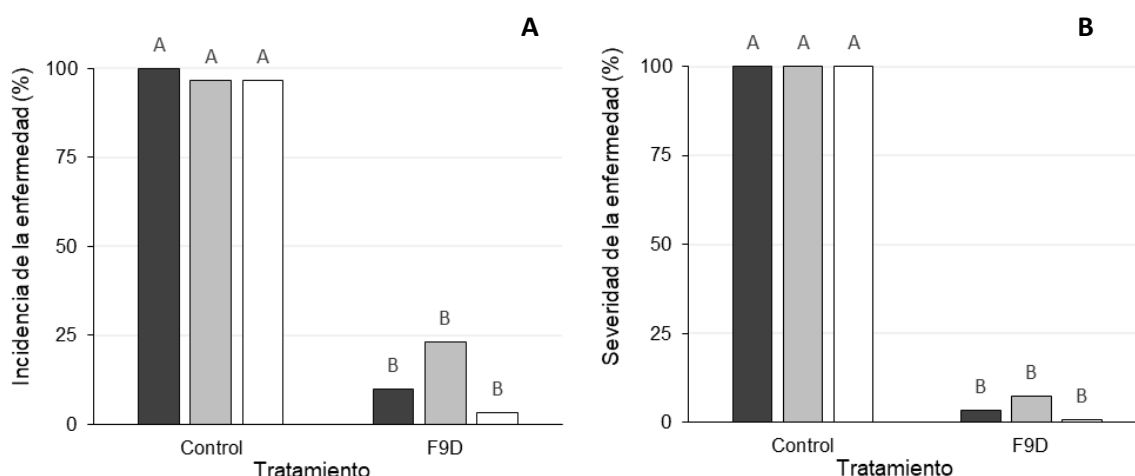


Figura III.15. Incidencia (A) y severidad (B) de la enfermedad causada por *P. expansum* en manzanas Red Delicious (■), peras Williams (■) y manzanas Granny Smith (□) tratadas con la levadura F9D. El control no fue tratado con levaduras. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

III. 4.5. Estudio de la interacción de la levadura F9D y el patógeno en heridas de manzana Red Delicious

Cuantificación del crecimiento de la levadura F9D en heridas de manzanas

El crecimiento de la levadura se siguió mediante recuento de viables y en la Figura III.16 se muestran las curvas de crecimiento de la levadura F9D en heridas de manzana almacenadas a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ en presencia (\blacktriangle) y ausencia del patógeno (\square).

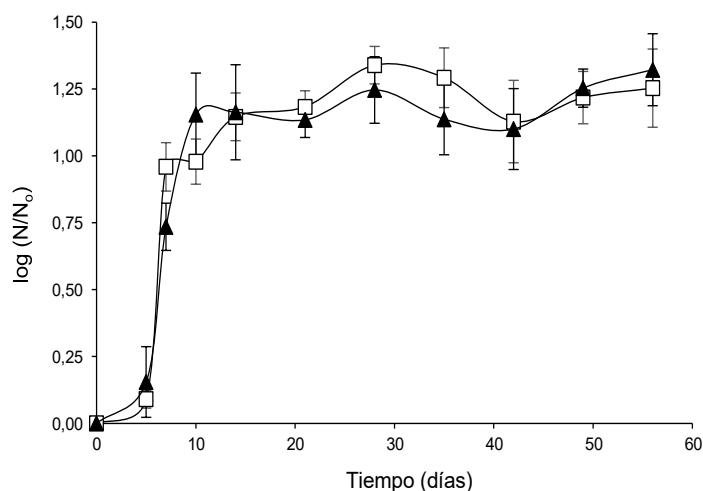


Figura III.16. Curva de crecimiento de la levadura F9D en heridas de manzanas Red Delicious. (\square) Levadura creciendo en presencia de *P. expansum*, (\blacktriangle) Levadura creciendo en ausencia de *P. expansum*. Las barras de error representan el IC.

La levadura mostró una fase lag de alrededor de 5 días y alcanzó la fase estacionaria entre los 10-15 días de incubación donde se mantuvo viable durante todo el período del ensayo. En la fase estacionaria el crecimiento celular fue de aproximadamente un orden (1×10^6). A su vez, se observó que no hay diferencia significativa en el crecimiento de la levadura cuando el patógeno se ha inoculado conjuntamente en la herida.

Cuantificación del crecimiento de *P. expansum* en heridas de manzana Red Delicious

Las curvas de fluorescencia versus los ciclos de amplificación de las diluciones seriadas de ADN de *P. expansum* se muestran en la Figura III.17.

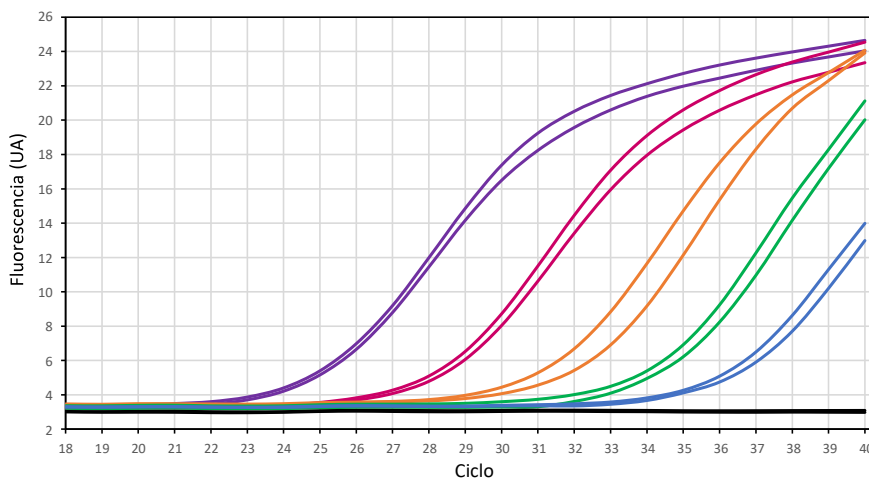


Figura III.17. Curva de fluorescencia vs. ciclos de amplificación para diferentes concentraciones de ADN de *P. expansum*: (—) 1 ng μL^{-1} , (—) 0,1 ng μL^{-1} , (—) 0,01 ng μL^{-1} , (—) 0,001 ng μL^{-1} , (—) 0,0001 ng μL^{-1} y el blanco (—).

Al realizar la curva de melting se observó un único pico, lo que indica que se amplificó un solo fragmento durante la reacción de PCR y que no hubo productos de amplificación secundarios (Figura III.18). La temperatura de melting de este fragmento se encontró en torno a los 82,5 °C lo que concuerda con lo reportado por Tannous et al. (2015).

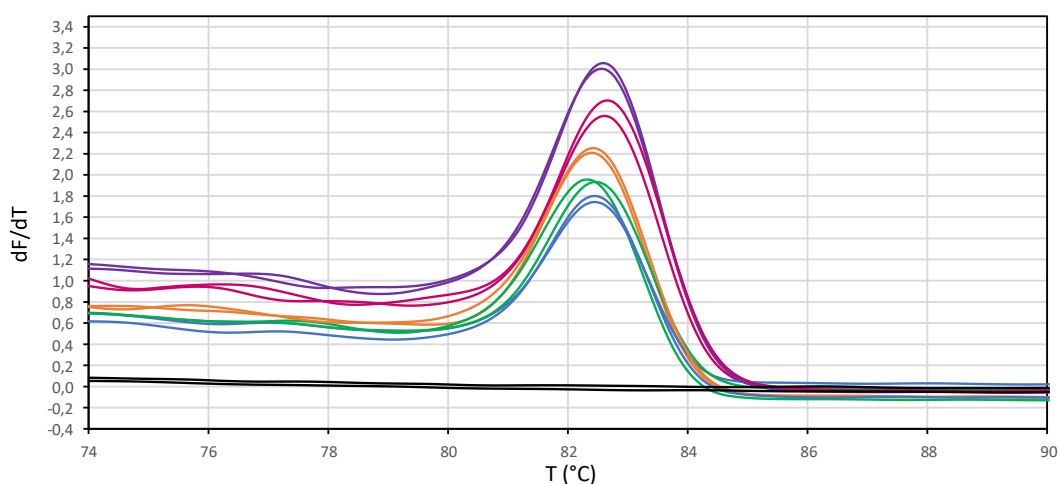


Figura III.18. Curva de melting para el producto de amplificación del ADN de *P. expansum* (—) 1 ng μL^{-1} , (—) 0,1 ng μL^{-1} , (—) 0,01 ng μL^{-1} , (—) 0,001 ng μL^{-1} , (—) 0,0001 ng μL^{-1} y el blanco (—).

Al realizar la curva estándar entre el logaritmo de la concentración de ADN de *P. expansum* versus los valores de Ct obtenidos se observó una correlación lineal (Figura III.19). A partir de esta se calculó la eficiencia del método, la cual fue de 1,07 dentro del rango de concentraciones analizadas (0,001 a 1 ng μL^{-1}).

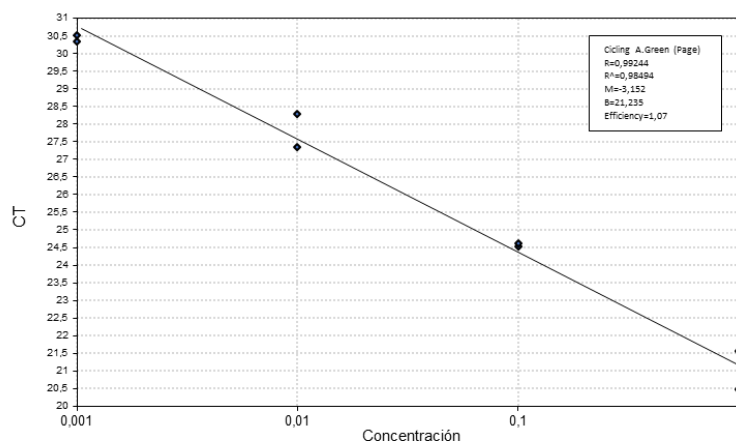


Figura III.19. Curva de calibración de logaritmo de la concentración de ADN de *P. expansum* versus los valores de Ct obtenidos.

Al estudiar el efecto de la matriz en la amplificación del fragmento de ADN de *P. expansum* se hicieron amplificaciones del ADN de *P. expansum* colocado en diferentes diluciones de la extracción de ADN de la matriz. Las curvas de fluorescencia obtenidas en este ensayo se muestran en la Figura III.20.

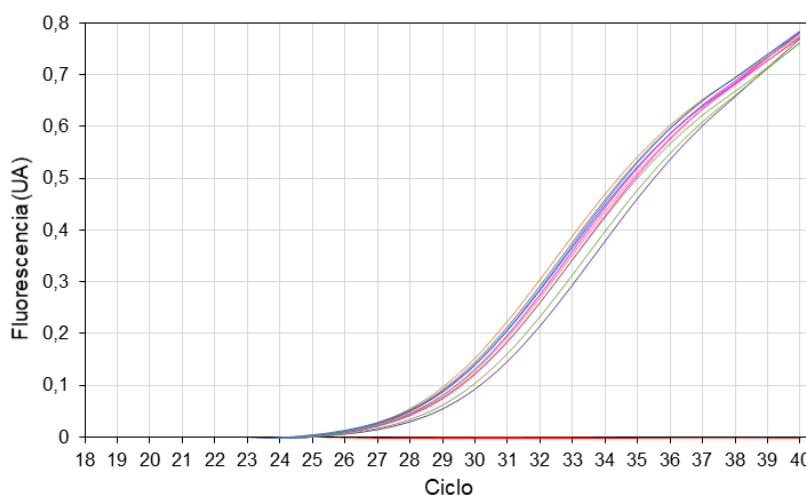


Figura III.20. Curva de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación para la dilución de la concentración de ADN de *P. expansum* 0,01 ng μL^{-1} : (—) agua, (—) matriz, (—) dilución 1/2 de la matriz, (—) dilución 1/5 de la matriz, (—) dilución 1/10 de la matriz, (—) blanco agua, (—) blanco matriz.

En la Tabla III.6 se muestran los valores de Ct obtenidos en las distintas condiciones del ensayo anterior. Las diferencias entre los valores de Ct (ΔCt) obtenidos para el ADN de *P. expansum* en agua y en las diferentes diluciones de la matriz fueron menores a 0,5. De estos resultados se concluye que la matriz no interfiere en la cuantificación del ADN fúngico para la concentración estudiada (Cankar et al., 2006).

Tabla III.6. Valores de Ct obtenidos para ADN de *P. expansum* de concentración 0,01 ng/ μ L en agua y en diferentes diluciones del ADN de la matriz

	Ct	ΔCt
Agua	25,66	-
Matriz	25,57	0,09
Matriz/2	25,42	0,24
Matriz/5	25,66	0,00
Matriz/10	25,23	0,43

Con la metodología de cuantificación de ADN por q-PCR ajustada, se realizó la cuantificación del crecimiento del patógeno en heridas de manzanas Red Delicious almacenadas en frío (Figura III.21). En estas curvas se observó que a partir de los 42 días el *P. expansum* fue capaz de crecer en forma muy marcada en ausencia de la levadura.

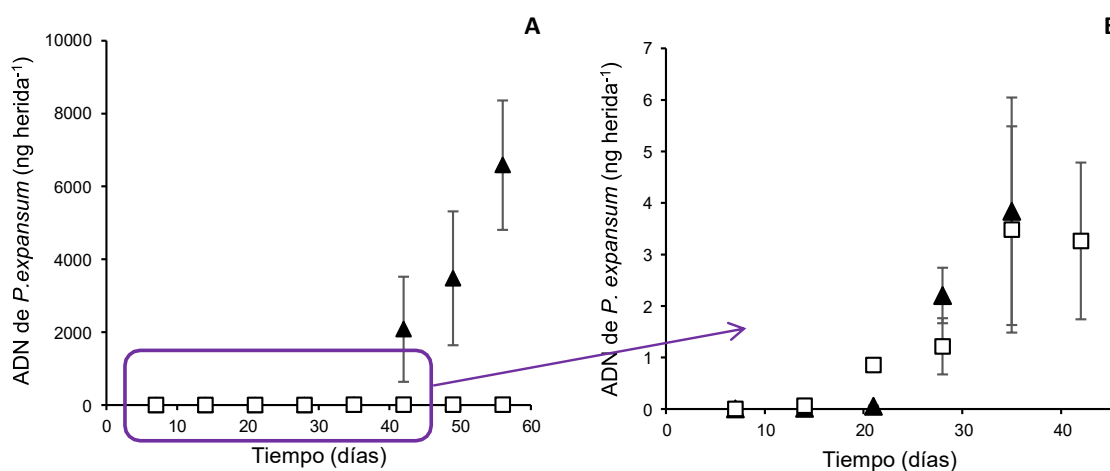


Figura III.21. Crecimiento de *P. expansum* en heridas de manzanas Red Delicious almacenadas a $(0 \pm 1) ^\circ C$ en ausencia (▲) y presencia (□) de la levadura F9D. **A.** Crecimiento de *P. expansum* en todo el período de almacenamiento. **B.** Ampliación de la gráfica de crecimiento de *P. expansum* previo al día 42. Las barras de error representan el IC.

En presencia de la levadura, la cantidad de ADN de *P. expansum* presente en las heridas fue significativamente menor luego de los 42 días de incubación. Sin embargo, previo al día 42, se observó que el hongo fue capaz de crecer en presencia de la levadura (Figura III.21.B),

pero no fue capaz de degradar y expandirse más allá de la herida inicial, lo cual puede observarse en el tamaño de la herida (Figura III.22). El tamaño de la herida se cuantificó como la masa de fruta que mostró síntomas típicos de infección por el patógeno. Estos resultados de la cuantificación de la cantidad de ADN de *P. expansum* presente en las heridas se correlacionó con el aumento del tamaño de la herida de la fruta.

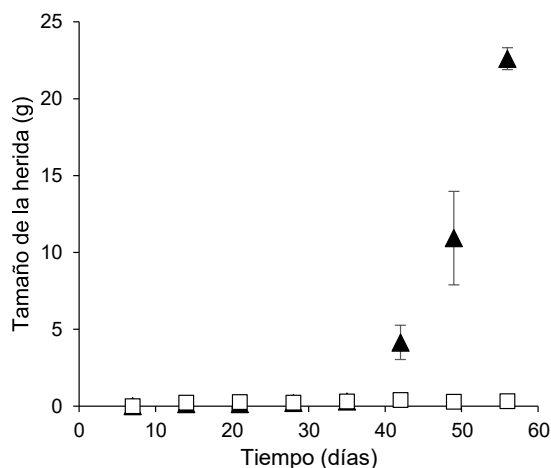


Figura III.22. Tamaño de las lesiones (heridas) causadas por *P. expansum* en manzanas Red Delicious almacenadas a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ creciendo en ausencia (▲) y presencia (□) de la levadura F9D. Las barras de error representan el IC.

Visualización del crecimiento de la levadura F9D y el patógeno en heridas de manzana Red Delicious mediante SEM

Para caracterizar mejor la interacción de la levadura y el patógeno en las heridas de manzanas Red Delicious, se realizaron microscopías electrónicas de barrido (SEM) a cortes transversales de las heridas de las manzanas (Figura III.23).

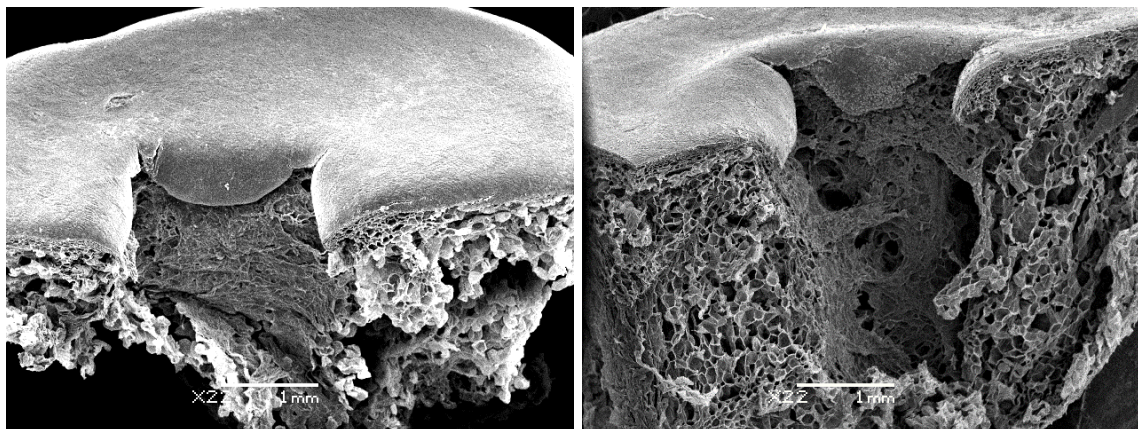


Figura III.23. SEM de cortes transversales de heridas de manzanas Red Delicious.

En la Figura III.24 se puede observar el interior de la herida, donde la levadura fue capaz de crecer y colonizar el tejido de la fruta.

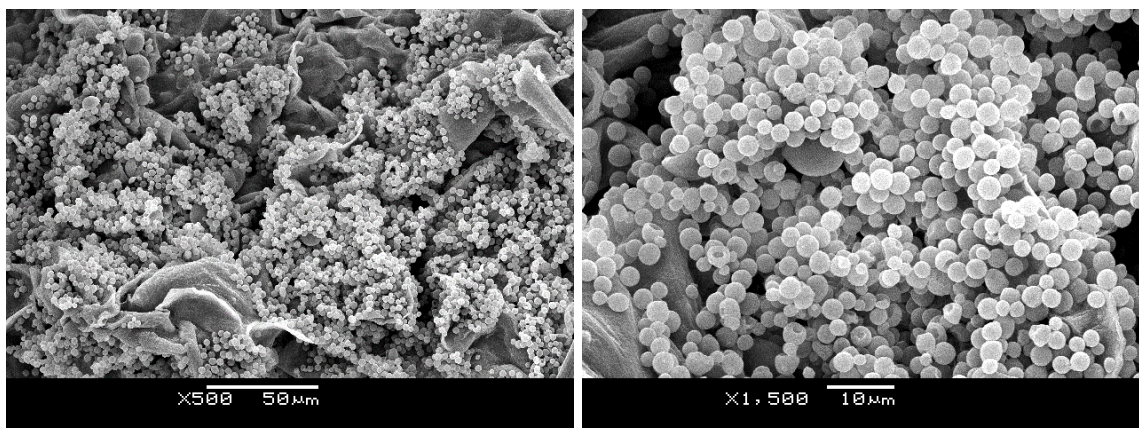


Figura III.24. SEM de heridas de manzanas Red Delicious inoculadas con la levadura *D. hansenii* F9D e incubadas a (0 ± 1) °C durante 45 días.

En la Figura III.25 se muestra el interior de las heridas inoculadas únicamente con *P. expansum*. En estas microscopías se puede observar una colonización masiva de las heridas con gran presencia de micelio del hongo.

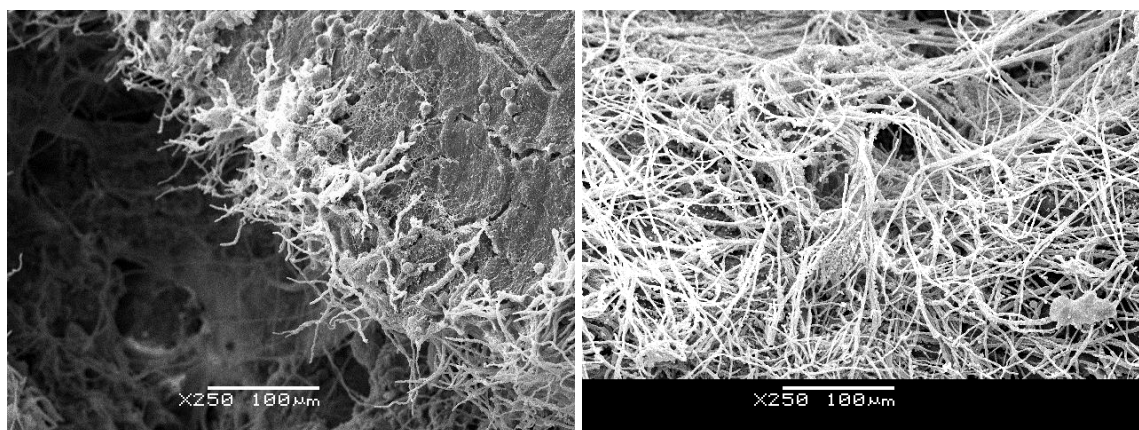


Figura III.25. SEM de heridas de manzanas Red Delicious inoculadas únicamente con *P. expansum* e incubadas a (0 ± 1) °C durante 45 días.

En las Figuras III.26 y III.27 se muestra el interior de las heridas de manzanas inoculadas con la levadura *D. hansenii* F9D y *P. expansum*. En estas microscopías se puede observar que el patógeno fue capaz de germinar y crecer en la presencia de la levadura (Figura III.25). Sin embargo, la presencia de hifas del hongo en las heridas fue menor que cuando el hongo se inoculó en ausencia de la levadura. Estos resultados están en concordancia con los

resultados de la cuantificación del crecimiento de la levadura y el hongo presentados anteriormente.

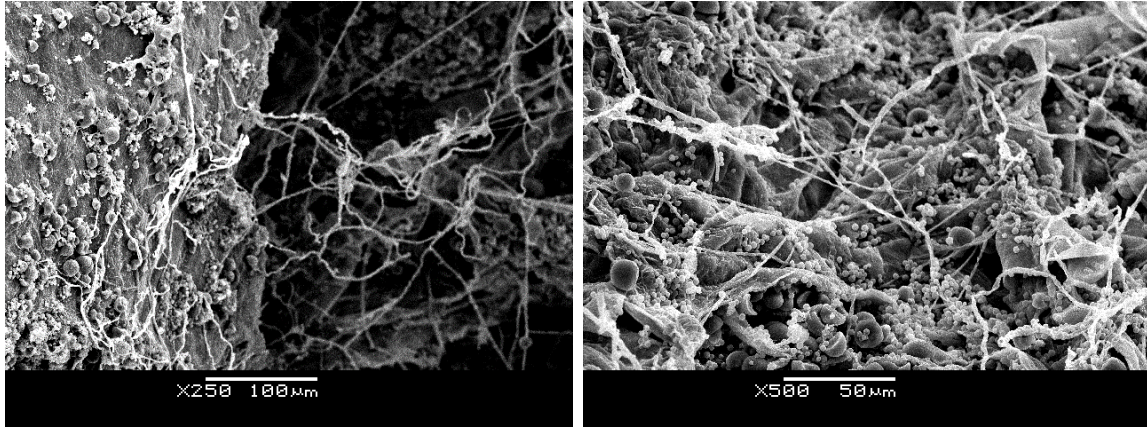


Figura III.26. SEM de heridas de manzanas Red Delicious inoculadas con la levadura *D. hansenii* F9D y *P. expansum* e incubadas a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante 45 días.

En la Figura III.27 se puede observar a la levadura colonizando los tejidos de la herida, cubriendo la superficie allí donde se observan las hifas del patógeno. Sin embargo, no se observó interacción directa entre la levadura y las hifas de *P. expansum*. Las hifas del patógeno no mostraron ningún cambio morfológico debido a la presencia de la levadura.

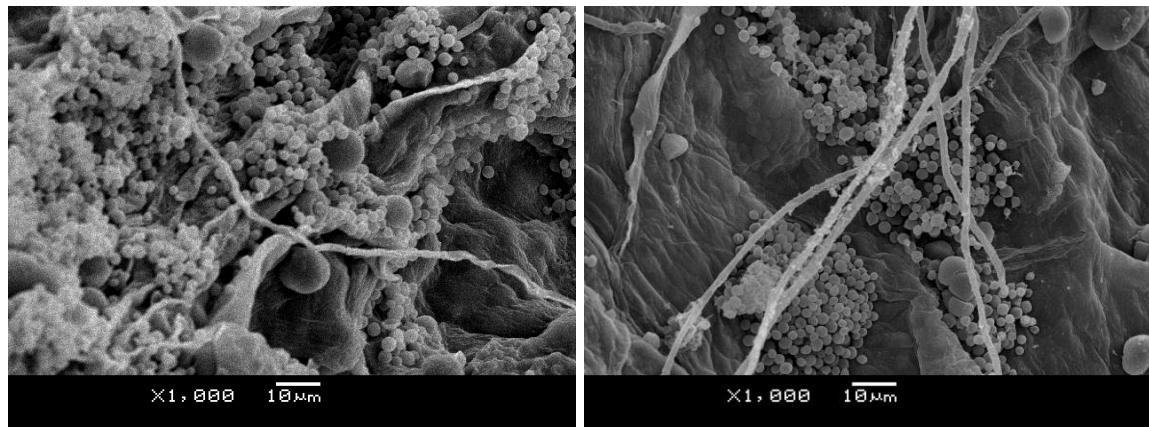


Figura III.27. SEM de heridas de manzanas Red Delicious inoculadas con *D. hansenii* F9D y *P. expansum* e incubadas a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante 45 días.

III.5. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la búsqueda y selección de levaduras antagonistas para ser utilizadas en el control biológico de *Penicillium expansum* en manzanas Red Delicious durante el almacenamiento poscosecha de la fruta a (0 ± 1) °C.

Una estrategia de control biológico exitosa se basa en el conocimiento del ciclo del patógeno, del hospedero y de las condiciones necesarias para que ocurra el desarrollo de la enfermedad. En este caso particular se trató de evitar el desarrollo de un hongo que penetra a la fruta por heridas o lenticelas causando una pudrición blanda por la acción de enzimas pectinolíticas que destruyen el tejido. Dado que la actividad biocontroladora de un antagonista depende en gran medida de su capacidad de colonizar el sitio de acción del patógeno (Di Francesco et al., 2016; Pimenta et al., 2009), la estrategia de biocontrol se centró en la búsqueda de antagonistas capaces de colonizar las heridas de las frutas a la temperatura de almacenamiento, pero que no fueran capaces de producir enzimas que degradaran los tejidos colonizados. Es por ello que, en este trabajo, los potenciales antagonistas se seleccionaron a partir de una colección de levaduras psicrótrofas, provenientes de la Antártida, capaces de crecer a bajas temperaturas. En el mismo sentido, la selección primaria se realizó en base a la incapacidad de producir pectinasas y a la habilidad de desarrollarse en heridas de fruta. En el caso de la manzana, las heridas son sitios ricos en azúcares y bajo pH (Fredlund et al., 2004; Spadaro y Droby, 2016) que pueden resultar inhóspitos para algunos microorganismos. Por ello, se determinó la capacidad de las levaduras no pectinolíticas, de crecer en jugo de manzana, el cual tiene una composición de nutrientes y pH similar a los presentes en la herida, estrategia utilizada con éxito por Vero et al. (2013). Como resultado de la selección se obtuvieron 36 cepas candidatas de un total de 68. En los ensayos de control biológico en manzanas Red Delicious almacenadas a 0 ± 1 °C, 34 levaduras fueron capaces de reducir significativamente la incidencia de la enfermedad causada por *P. expansum*, lo cual demostró el éxito de la estrategia de selección de antagonistas.

Desde los inicios de las investigaciones en control biológico el planteamiento de la estrategia de selección de antagonistas ha llevado a definir dos enfoques. Uno de ellos se basa en el uso de microorganismos aislados del entorno del cultivo de interés donde se encuentran creciendo naturalmente y el otro se enfoca en el uso de microorganismos aislados de otros sustratos e introducidos artificialmente en el sistema (Abano y Sam-Amoah, 2012; Sharma

et al., 2009). El primer enfoque tiene en cuenta las interacciones ecológicas que ya existen en la naturaleza, incluida la interacción entre los microorganismos y el vegetal. Esta estrategia tiene su lógica cuando se trata del control biológico en condiciones de campo. En esos casos, la búsqueda de antagonistas entre los microorganismos naturalmente presentes y adaptados al lugar parece ser la más acertada. Sin embargo, cuando se plantea el control biológico en la poscosecha, más allá del cultivo de interés hay que tener en cuenta las condiciones de almacenamiento. La gran mayoría de los estudios en control biológico en poscosecha se han basado en el primer enfoque y es así que muchos investigadores han centrado la búsqueda de antagonistas en el entorno del cultivo de interés (superficie de hojas y frutas, flores y suelo) (Manso y Nunes, 2011; Xu et al., 2008; Zhang et al., 2008). Aunque esta estrategia ha tenido su éxito, ha sido en muchos casos ineficiente con respecto al esfuerzo, tiempo y dinero requeridos para la selección de los antagonistas. Tal es el caso de lo reportado por Viñas et al. (1998) en la búsqueda de antagonistas para evitar el desarrollo del moho azul en manzanas Golden Delicious. Un total de 933 microorganismos aislados de frutos, flores y hojas de manzano fueron ensayados como antagonistas de *P. expansum* en heridas de manzanas. Esta selección se realizó a 20 °C resultando efectivos solo 33 microorganismos. De igual forma, Manso y Nunes (2011), realizaron el aislamiento de más de 1800 levaduras principalmente de hojas, pepitas y superficie de cítricos durante la temporada de cultivo y solo 4 levaduras fueron capaces de controlar a los patógenos *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en manzanas, peras y naranjas durante el almacenamiento poscosecha en cámaras frías. Este ha sido el problema de muchos estudios, en los que el aislamiento y los ensayos de control biológico se llevan a cabo a temperatura ambiente sin una estrategia de selección bien definida y que posteriormente no se correlaciona con los resultados en las condiciones poscosecha.

Tomando como premisa que un agente de biocontrol debe estar adaptado a las condiciones de frío de las cámaras refrigeradas, Vero et al. (2009, 2011) aislaron levaduras de la microflora presente en la superficie de manzanas sanas almacenadas a 0 °C y cítricos almacenados a 10 °C por varios meses. Este enfoque se basó en la búsqueda de posibles antagonistas contra un determinado patógeno en los lugares donde la enfermedad podía desarrollarse, pero no ocurre (Baker y Cook, 1974). Las levaduras aisladas estaban adaptadas a las condiciones de frío de las cámaras refrigeradas y mostraron capacidad de controlar el desarrollo de *P. italicum* y *P. digitatum* en cítricos almacenados 10 °C y *P. expansum* y *B. cinerea* en manzanas almacenadas a 0 °C. Posteriormente, basados en esta estrategia,

Robiglio et al. (2011) y Lutz et al., (2012), aislaron levaduras de la superficie de peras almacenadas a 0 °C y fueron evaluadas en el control de *P. expansum* y *B. cinerea*. Los autores reportaron que la microbiota asociada con las frutas en cámaras frías mostraron mejor desempeño contra los patógenos poscosecha que una levadura comercial *Cryptococcus albidus* aislada del producto comercial YieldPlus® (Robiglio et al., 2011).

Más allá de las condiciones de bajas temperaturas, las levaduras empleadas en control biológico poscosecha también se encuentran frente a una variedad de condiciones de stress, incluyendo baja humedad, stress oxidativo, falta de nutrientes y pH adverso, que pueden afectar su viabilidad y actividad biocontroladora (Liu et al., 2013). Algunos autores han reportado que el mejoramiento de la resistencia al stress de las levaduras antagonistas, mediante diferentes métodos, puede ser una estrategia útil para mejorar el desempeño de los agentes de biocontrol en la poscosecha (Castoria et al., 2003; Ikner y Shiozaki, 2005; J. Liu et al., 2011; Macarisin et al., 2010; Wang et al., 2010).

La Antártida es el continente que presenta el clima más seco y frío del planeta y por tal razón, las levaduras antárticas deben enfrentar diferentes tipos de stress simultáneamente. Estos incluyen bajas temperaturas, repetidos ciclos de congelación y descongelación, baja disponibilidad de agua, stress osmótico, desecación, baja disponibilidad de nutrientes y alta radiación UV (Ruisi et al., 2007). Por esta razón, el éxito en nuestros ensayos con levaduras antárticas podría estar relacionado con su adaptación a condiciones ambientales extremas que las vuelven buenas antagonistas en la poscosecha. Nuestros resultados podrían servir de base para futuros estudios que exploren la utilidad de las levaduras antárticas en estrategias de control biológico en poscosecha de frutas u hortalizas durante el almacenamiento en frío. El uso exitoso de microorganismos aislados de otros ambientes fríos, como el Tíbet, para el control de enfermedades poscosecha en peras almacenadas en frío ha sido recientemente reportado (Hu et al., 2017; Hu et al. 2015).

Las 34 levaduras antárticas que resultaron efectivas en el control de *P. expansum* en manzanas Red Delicious pertenecen a 8 especies diferentes: *Debaryomyces hansenii* (18¹), *Candida glabrosa* (4), *Metschnikowia australis* (3), *Leucosporidiella fragaria* (3), *Rhodotorula laryngis* (2), *Candida sake* (2), *Cryptococcus albidosimilis* (1), *Cryptococcus keelungensis* (1).

¹ El número entre paréntesis hace referencia al número de cepas de esa especie.

Algunas de estas especies han sido reportadas previamente como agentes de biocontrol en la poscosecha de frutas. Diferentes cepas de *D. hansenii* (especie más abundante de nuestra colección), resultaron efectivos agentes de biocontrol de *P. digitatum*, *P. italicum*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum* en diferentes cultivos (Tabla III.1). Una cepa antártica identificada como *R. laryngis* fue reportada buen antagonista de *P. expansum* en manzanas Red Delicious, pero no resultó efectiva en manzanas Pink Lady (Vero et al., 2013). A su vez, una cepa de *Candida sake* aislada de la superficie de frutas fue reportada como agente de biocontrol de *P. expansum*, *B. cinerea* y *Rhizopus nigricans* en manzana. En base a dicha cepa se desarrolló un producto comercial denominado Candifruit® registrado en España (Spadaro y Droby, 2016). Por otro lado, nuestros resultados son los primeros en reportar a las especies *C. glabrosa*, *M. australis*, *L. fragaria*, *C. albidosimilis* y *C. keelungensis* como agentes de biocontrol de *P. expansum* en manzanas almacenadas en frío.

El conocer como está ocurriendo el biocontrol es un tema que luego de 30 años de estudios en la temática no se ha logrado dilucidar. Diferentes mecanismos de acción tales como la antibiosis, competencia por espacio y nutrientes, parasitismo o inducción de resistencia han sido propuestos como responsables de la actividad biocontroladora de patógenos de fruta en poscosecha (Di Francesco et al. 2016; Liu et al. 2013; Sharma et al. 2009; Spadaro y Droby 2016). A las levaduras seleccionadas en este trabajo se les evaluó la capacidad de producir sideróforos y de formar biofilm, asociados a la competencia por hierro y espacio, respectivamente (Calvente et al., 2001; Spadaro y Droby, 2016). A su vez se determinó la capacidad de inhibir la germinación de esporas del patógeno en jugo de manzana a la temperatura de almacenamiento de la fruta, de producir metabolitos antifúngicos activos contra *P. expansum* y la capacidad de producir enzimas hidrolíticas (quitinasas), estando las últimas dos características involucradas en mecanismos de micoparasitismo (Droby et al., 2009).

La capacidad de producir sideróforos no fue una capacidad muy difundida en las levaduras seleccionadas en este trabajo. Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular, sintetizados por microorganismos y también por algunas plantas capaces de quelar hierro del ambiente para ser transportado al interior celular (Aguado-Santacruz et al., 2012). La concentración de hierro en la manzana es menor a 1 mg cada 100 g de fruta (Bhuvanewari, 2015), por lo cual, la competencia por hierro podría ser un mecanismo de biocontrol de patógenos en manzanas. Esto ha sido previamente sugerido por Sansone et al. (2005) donde

demonstraron que el ácido rodotorúlico (un sideróforo producido por levaduras del género *Rhodotorula*) tenía un rol importante en el control del desarrollo de *Botrytis cinerea* en manzanas y uvas. Además, Saravanakumar et al. (2008) demostraron que la disminución de la concentración de hierro causado por una cepa seleccionada de *Metschnikowia pulcherrima* inhibía el crecimiento de *B. cinerea* y *Alternaria alternata* en heridas de manzana. Sin embargo, en el presente trabajo, la producción de sideróforos por parte de las levaduras no se pudo correlacionar con la capacidad de biocontrol ya que sólo 6 levaduras fueron capaces de producir este tipo de compuestos.

Nueve levaduras tuvieron la capacidad de formar biofilms en las condiciones del ensayo. Los biofilms son agregados microbianos formados por uno o varios tipos de microorganismos embebidos en una matriz extracelular que los mantiene adheridos a una superficie y aumenta su resistencia frente a diferentes tipos de stress (Freimoser et al., 2019). Según Pu et al. (2014) la levadura *Kloeckera apiculata* 34-9 es capaz de formar biofilms en heridas de frutos cítricos creando una barrera que se interpone entre la superficie de la herida y el patógeno, impidiendo la colonización y el posterior deterioro. A su vez, la relación entre la formación de biofilms y la capacidad biocontroladora se ha postulado para varias levaduras tales como *Pichia kudriavzevii* y *Aureobasidium pullulans* en peras y cítricos respectivamente (Chi et al., 2015; Klein y Kupper, 2018). En nuestro caso, la capacidad de formación de biofilms y la aptitud biocontroladora no pudieron correlacionarse ya que sólo la cuarta parte de las levaduras seleccionadas fue capaz de adherirse y formar biofilm en las condiciones del ensayo. Se ha demostrado para algunas levaduras que la formación de biofilms es una actividad mediada por señales de quórum. Por ejemplo, se postuló al compuesto tirosol como señal de quórum involucrada en la formación de biofilms en *Candida albicans* (Alem et al., 2006). En el caso de *D. hansenii* se concluyó que la capacidad de formar biofilms también estaba regulada por la concentración de señales de quórum como el farnesol y el tirosol (Gori et al., 2011). La elucidación en profundidad de estos mecanismos y el conocimiento de los factores que los controlan podrían contribuir en gran medida a la comprensión de su rol en el biocontrol y colaborar en el desarrollo de estrategias de potenciación.

Todas las levaduras antárticas seleccionadas en este trabajo inhibieron en diferente grado la germinación de las conidias de *P. expansum* en las condiciones del ensayo. La germinación de conidias de un patógeno es el paso preliminar a la penetración o colonización del

hospedero. Este evento depende en gran medida de la temperatura, de la humedad del ambiente o de la cantidad de agua disponible y de la presencia de compuestos liberados por el hospedero (Barkai-Golan, 2001). La temperatura es un factor fundamental que limita o retarda la germinación de esporas y por lo tanto, el comienzo de la enfermedad. La presencia de agua disponible es esencial (Nanguy et al., 2010), aunque ciertas conidias necesitan muy bajos niveles de agua para germinar (Roberts y Boothroyd, 1984). En algunos casos las conidias o esporas de hongos son capaces de germinar en agua destilada, pero, generalmente se necesita de algunos nutrientes o compuestos señal para desencadenar la germinación. Por ejemplo, se ha demostrado que esporas de *P. digitatum* no son capaces de germinar en agar agua o en la superficie intacta de frutos cítricos. Sin embargo, su germinación es estimulada en presencia de compuestos volátiles presentes en las capas externas de frutos cítricos, los cuales se desprenden cuando se produce una herida (Droby et al., 2010). También se demostró que la germinación de este hongo era estimulada en presencia de jugo de fruta y que la glucosa y el ácido ascórbico eran en parte los responsables de dicha estimulación (Pelser y Eckert, 1977). En el caso de *P. expansum* se ha demostrado que el pH del ambiente afecta la germinación de las conidias produciendo un cambio en el pH intracelular, el cual influye en la regulación de la expresión de proteínas involucradas en el proceso (Li et al., 2009). A su vez, la presencia de ciertos compuestos puede inhibir la germinación de conidias. Por ejemplo, algunos de los compuestos volátiles provenientes de la cáscara de cítricos que estimulan la germinación de *P. digitatum* inhiben la germinación de conidias de *P. expansum* o *B. cinerea*, que no son patógenos de cítricos. De acuerdo con las consideraciones realizadas anteriormente, para determinar la capacidad de un agente de biocontrol de inhibir la germinación de conidias de un patógeno es de suma importancia realizar los ensayos en condiciones similares a las que existen en el lugar donde se dará la interacción con el patógeno. Por ello, en este trabajo el ensayo de inhibición se realizó en jugo de manzana a baja temperatura. A pesar de los buenos resultados obtenidos en este ensayo, la inhibición de germinación de esporas del patógeno no surgió como un mecanismo importante cuando se estudió la interacción entre levaduras y patógeno en heridas de fruta, ya que el crecimiento del patógeno fue similar en presencia y ausencia de la levadura hasta justo antes de aparecer los síntomas de pudrición. Por ello, la elucidación de los mecanismos involucrados en la inhibición de la germinación registrada *in vitro* resultaría de suma importancia para explorar la posibilidad de potenciar esta acción en las heridas de fruta.

De las 34 levaduras evaluadas, ninguna fue capaz de producir quitinasas o sustancias inhibitorias solubles. La incapacidad de producir compuestos antifúngicos no debe considerarse una característica negativa ya que la ausencia de este tipo de metabolitos facilitaría el registro de un producto de biocontrol basado en estas cepas. Con respecto a la formación de compuestos antifúngicos volátiles, dos levaduras de la especie *Candida sake* produjeron sustancias volátiles capaces de inhibir el desarrollo de *P. expansum*. La producción de antifúngicos volátiles no ha sido una característica frecuentemente explorada en levaduras de uso en control biológico en poscosecha. Por ejemplo, no hemos encontrado registros acerca de dicho estudio en *C. sake* CPA-1, de probada acción como controlador biológico de patógenos poscosecha.

En nuestros ensayos, el grado de inhibición del patógeno fue mayor para la cepa 41E que para la cepa F36A. Diferencias en la inhibición del crecimiento de hongos mediante los VOCs producidos por diferentes cepas de la misma especie ha sido previamente reportado. Di Francesco et al. (2015) reportaron la capacidad de dos cepas de *Aureobasidium pullulans* de inhibir el crecimiento *in vitro* de *P. expansum* mediante la producción de VOCs. Masoud et al., (2005) reportaron diferencias en el grado de inhibición de *Aspergillus ochraceus* mediante los VOCs producidos por diferentes cepas de *Pichia anomala*.

La temperatura se evidenció como un factor clave en este tipo de interacciones. Huang et al. (2011) reportaron que el grado de inhibición de *B. cinerea* por los VOCs producidos por una cepa de *Candida intermedia* era mayor a 20 °C que a 4 °C. Estos resultados demuestran la importancia de evaluar la producción de los VOCs en las condiciones ambientales similares a las que el agente de control biológico o los VOCs pretenden ser empleados. En los ensayos realizados en frutas se comprobó que los VOCs producidos por *C. sake* 41E eran capaces de inhibir a *P. expansum* en manzanas Red Delicious en cámara fría. Estos resultados sugieren que los volátiles producidos por las cepas de *C. sake* podrían ser empleados para el control de *P. expansum* en la poscosecha de manzanas. El uso de compuestos volátiles de origen fúngico para el control de enfermedades en poscosecha ya ha sido previamente explorado y ha dado origen a la formulación comercial Arabesque® (AgraQuest Inc., EE.UU.) en base al hongo *Muscodor albus* (Gehlot y Singh, 2018). Se demostró que este hongo producía alcoholes, ésteres, cetonas y ácidos volátiles capaces de inhibir individualmente el desarrollo de varios hongos y bacterias sin efecto letal. Se determinó un efecto sinérgico entre sus componentes, siendo el 1-butanol-3-metil-acetato el de mayor actividad. Varios ejemplos

demonstraron efectividad de la formulación sin entrar en contacto con el producto a proteger, por ejemplo, en uvas en almacenamiento poscosecha (Mercier et al., 2010).

Los compuestos volátiles son antimicrobianos interesantes debido a que su actividad antimicrobiana puede ocurrir a distancia debido a su difusión en el aire (Spadaro et al. 2016). En este sentido, sin embargo, la seguridad del uso de dichos compuestos debe ser evaluada y por lo tanto, los compuestos volátiles deben ser identificados. Los VOCs producidos por *C. sake* 41E fueron mayormente ésteres. Entre ellos, el etilhexanoato y 2-feniletacetato han sido previamente reportados como parte de los VOCs antifúngicos producidos por levaduras (Di Francesco et al., 2015; Huang et al., 2011; Masoud et al., 2005). El principal componente de la mezcla fue también un éster, identificado como 3-metil-butil hexanoato, compuesto que se encuentra registrado como saborizante permitido para su uso como aditivo alimentario por la FDA (Food and Drug Administration, USA). Dos alcoholes, 3,7-Dimetil-6-octen-1-ol (citronelol) y 2-feniletanol también fueron detectados. Ambos alcoholes han sido previamente reportados por su capacidad antifúngica. El citronelol ha sido reportado como uno de los componentes de los aceites esenciales de las plantas *Myrtaceae*, los cuales inhibieron diversos hongos (Kim y Park, 2012; Park et al., 2007). El 2-feniletanol ha sido caracterizado como un compuesto volátil antifúngico producido por diversas levaduras (Contarino et al., 2019; Hua, Beck, Sarreal, & Gee, 2014; P. Liu et al., 2014; Masoud et al., 2005) y hongos, incluyendo *Muscodor albus* (Spadoni et al., 2015). Se han descrito muchos de estos compuestos pero en casi todos los casos ha estado presente el 2-feniletanol. Además, su rol individual sobre la inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* y *A. ochraceus* ha sido demostrado (Farbo, 2018; Fiori et al., 2008; Tilocca et al., 2019).

Con respecto a los otros compuestos, no hay información publicada con respecto a la actividad inhibitoria. En este sentido, se ha continuado trabajando con los volátiles de estas levaduras para evaluar la contribución de cada compuesto en la mezcla de VOCs a la inhibición de patógenos fúngicos.

A pesar de que algunas de las levaduras mostraron algún tipo de actividad que podría estar involucrada en el biocontrol del patógeno, no se observó una característica que fuera común a todas las cepas que habían demostrado capacidad biocontroladora en fruta. Este resultado está en concordancia con el planteo de que los agentes de control biológico no tienen una característica única que pueda explicar su acción antagonista contra los hongos causantes de enfermedades poscosecha (Sharma et al., 2013). Muchos autores han basado la selección de antagonistas en la verificación de alguno de los mecanismos de acción mencionados

anteriormente, en especial en la capacidad de producir sustancias antifúngicas solubles. Este trabajo demuestra que la selección basada en un mecanismo de acción es incorrecta. El único ensayo disponible para verificar la actividad antagonista de una cepa es realizar pruebas de biocontrol en el patosistema correspondiente, en las condiciones ambientales donde se dará la interacción. Por tal razón, hay que considerar que el método empleado para el aislamiento de levaduras, así como los ensayos posteriores de selección, tendrán un impacto importante en el tipo y propiedades de los antagonistas y que una búsqueda inadecuada puede llevar a un proceso largo, trabajoso y costoso (Samir Droby et al., 2009).

Nuestra selección de levaduras se centró en su uso como antagonistas de *P. expansum* en manzanas Red Delicious. Sin embargo, también fueron evaluadas como agentes de biocontrol del mismo patógeno en manzanas Granny Smith y peras Williams. En dichos ensayos se observaron diferencias en la capacidad de controlar el patógeno en las diferentes frutas. Estas diferencias pueden relacionarse, entre otras, con la disponibilidad de nutrientes de cada fruta, pH, diferente susceptibilidad al patógeno o con cambios fisiológicos de la fruta durante el almacenamiento. Resultados similares han sido reportados por otros autores, donde ha quedado demostrado que la capacidad de un antagonista de controlar un patógeno es dependiente de la fruta (Lima et al., 1999; Mari et al., 2012). Estos resultados refuerzan la importancia de seleccionar los antagonistas adecuados para cada patosistema y resaltan la capacidad de un antagonista de actuar sobre más de un patógeno de un producto, característica que lo hace muy atractivo para el desarrollo de un producto comercial. Tomando en cuenta esto, se observó que 2 levaduras fueron capaces de controlar en más de un 75 % el desarrollo de *P. expansum* en las tres frutas. Estas levaduras, F9D y F12B, pertenecen a la especie *Debaryomyces hansenii*. Debido a que ambas levaduras pertenecen a la misma especie y no mostraron características muy diferentes, se decidió continuar los ensayos con una de ellas, la cepa F9D. Para esta cepa se repitieron los ensayos de biocontrol en las tres frutas, observándose la consistencia de los resultados. La levadura F9D no demostró actuar por ninguno de los mecanismos evaluados en nuestros trabajos, salvo la inhibición de la germinación de esporas que fue del $(34,2 \pm 4,3) \%$. Debido a que muchos autores han reportado que la competencia por espacio y nutrientes es el principal mecanismo por el cual las levaduras reprimen el desarrollo de los patógenos se decidió evaluar el crecimiento de la levadura y el patógeno en las heridas de manzanas Red Delicious almacenadas a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

El crecimiento de la levadura se siguió mediante recuento de células viables y se pudo observar que el crecimiento en la herida no estaba afectado por la presencia del patógeno. La levadura comenzó a crecer luego de 5 días y alcanzó la fase estacionaria a los 10 días de inoculación, con una concentración de 1×10^6 células por herida. En las microscopías electrónicas de barrido de las heridas de manzana se observó a su vez, la capacidad de la levadura F9D de colonizar la herida. Cuando se realizó la curva de crecimiento del patógeno mediante la cuantificación de la cantidad de ADN asociado a *P. expansum* empleando q-PCR se observó un crecimiento muy marcado del patógeno a partir de los 35-40 días. Estos resultados se correlacionaron con el aumento del tamaño de la lesión de la fruta y con la observación mediante SEM de una gran producción de hifas y completa colonización de la herida.

En presencia de la levadura, la cantidad de ADN de *P. expansum* presente en las heridas fue similar hasta el día 35 y resultó significativamente menor a partir del día 45, momento en el cual se empezó a visualizar la degradación enzimática de la fruta alrededor de las heridas inoculadas solamente con el patógeno. Estos resultados muestran que hasta el día 35, en presencia de la levadura, el hongo pudo germinar y comenzar a crecer. Sin embargo, no se registró el avance de la lesión a partir del día 45 como ocurrió en las heridas control. Esto podría deberse a una inhibición en la producción de las enzimas del hongo causantes de la lesión (pectinasas) o a una degradación o inactivación de estas por acción de la levadura. Este tipo de mecanismo no ha sido descrito aún en el control biológico en poscosecha. En realidad, la única mención a este mecanismo corresponde a Elad y Kapat (1999) quienes reportaron que la supresión de la enfermedad causada por *B. cinerea* mediante el hongo *Trichoderma harzianum* en hojas de poroto estaba relacionada con la reducción de la patogénesis de *B. cinerea* y no con la inactivación del patógeno. Dicha reducción era causada por una proteasa producida por la cepa de *T. harzianum* utilizada. Se demostró que dicha proteasa era capaz de inactivar las poligalacturonasas producidas por el patógeno, las cuales constituyen importantes factores de patogenicidad en *Botrytis* y en varios hongos tales como *P. expansum* o *P. digitatum* (Prusky et al., 2004).

Dado que la cepa *D. hansenii* F9D no produce proteasas extracelulares (Martinez et al., 2016) se considera que este mecanismo no sería el involucrado en la protección frente a *P. expansum*. Otro mecanismo que podría postularse para explicar la acción de *D. hansenii* F9D en manzana, es que su presencia en la herida provoque un cambio de pH que impida o minimice la producción de enzimas degradadoras de pectina producidas por *P. expansum*.

Según Prusky et al. (2004), el pH del ambiente juega un importante rol en la regulación de la transcripción del gen *pepg1* que codifica para la poligalacturonasa en *P. expansum*. Estos autores observaron que la expresión del mencionado gen ocurría entre pH 3,5 a 5, siendo máxima a pH=4. Los autores constataron además que el crecimiento de *P. expansum* provocaba una reducción en el pH del tejido circundante en la fruta y asociaron esta disminución a la producción de ácido cítrico y glucónico por parte del patógeno. Estos resultados mostraron que un cambio pequeño de pH podría provocar una disminución de la producción de poligalacturonasa y, por tanto, una disminución en la virulencia del patógeno. Por otra parte, Gori et al. (2007) constataron que algunas cepas de *D. hansenii* eran capaces de causar un aumento de pH en la superficie de quesos por producción de amonio y consumo de ácido láctico. En el caso de la manzana, el consumo de citrato y gluconato (producidos por el patógeno) y la producción de amonio son capacidades atribuibles a ciertas cepas de *D. hansenii* (Kurtzman et al., 2011). Estas actividades podrían ocasionar un aumento de pH y por lo tanto, una disminución de la producción de poligalacturonasa por parte del patógeno. El estudio de esta hipótesis se plantea como perspectiva de este trabajo.

Mediante el análisis de las microscopías SEM se observó que el hongo fue capaz de germinar y crecer en presencia de la levadura. Sin embargo, la cantidad de micelio presente resultó notoriamente inferior al final del ensayo y el crecimiento del patógeno no pudo expandirse más allá de la herida inicial. Estos resultados están en concordancia con los resultados de la cuantificación del crecimiento del hongo mediante q-PCR. Algunos autores han reportado que la adhesión de las levaduras a las hifas del patógeno es un importante factor de la actividad biocontroladora, permitiendo que las enzimas degradadoras tengan su efecto (El-Ghaouth et al., 1998; Hernandez-Montiel et al., 2018; Pimenta et al., 2009). En estas investigaciones han mostrado que los antagonistas provocaron la disrupción de la superficie de las hifas, penetración total y muerte. En nuestros estudios, las observaciones microscópicas no mostraron que las levaduras estuvieran interactuando directamente con las hifas del patógeno o que estas estructuras fueran desintegradas o colapsadas. Este resultado está en concordancia con la ausencia de producción de quitinasas extracelulares por parte del antagonista. Cuando se realizaron los ensayos de germinación del patógeno en jugo de manzana en frío, se observó que el patógeno tardaba aproximadamente 5 días en comenzar a germinar y 10 días para que la germinación fuera completa. De acuerdo con las curvas de crecimiento del antagonista en heridas de manzana, en ese tiempo la levadura ya habría alcanzado la fase estacionaria y se encontraría colonizando la herida cuando el patógeno

recién comenzaría a crecer. Estos resultados sugieren una rápida colonización de la herida de la fruta por parte de la levadura F9D, durante la cual se podrían agotar elementos esenciales para el patógeno. Asociado a este crecimiento se podría modificar el microambiente de la fruta, de forma de limitar el desarrollo del patógeno e inhibir la expresión de sus factores de virulencia.

El conocer los mecanismos de acción por los cuales los antagonistas actúan es siempre una perspectiva interesante. Hasta ahora, los enfoques de los investigadores se han focalizado en los diferentes componentes de la interacción antagonista-fruta-patógeno en forma separada. Sin embargo, Spadaro y Droby (2016) plantean las siguientes interrogantes que podrían cambiar los paradigmas del control biológico en el futuro: ¿cuál es el efecto del antagonista en el proceso de curación de la herida y en los mecanismos de resistencia de la fruta? ¿Cuán importante es el efecto directo de los antagonistas en los patógenos? ¿cómo puede afectar la presencia de microorganismos residentes en la fruta a las interacciones patógeno/antagonista? ¿cómo puede afectar la presencia de diferentes compuestos en la herida al antagonista, a otros microorganismos presentes, al proceso de infección y a la respuesta de la fruta?

Se vuelve necesario el conocimiento de la fisiología, genética, supervivencia y diferenciación del agente de control biológico en el tejido hospedero y los cambios en la expresión de genes tanto en el tejido de la fruta como en el patógeno. En los últimos años ha habido un avance en el uso de diferentes técnicas moleculares como la genómica, transcriptómica, proteómica y metagenómica que podrían ser empleadas para mejorar el conocimiento de los cambios fisiológicos de los agentes de biocontrol, el efecto en el patógeno y en la fruta que podrían contribuir a mejorar el conocimiento de los mecanismos de acción del control biológico.

IV.
QUITOSANO

IV. 1. INTRODUCCIÓN

IV.1. Polímero quitosano

El quitosano es un polímero compuesto de unidades β -(1,4)-N-acetil-D-glucosamina que se obtiene industrialmente a partir de la desacetilación química de la quitina (Figura IV.1). La quitina es el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza y puede ser encontrada en el exoesqueleto de artrópodos y en la pared celular de algunos hongos filamentosos (Hafdani y Sadeghinia, 2011; Leceta et al., 2013). Cuando el grado de desacetilación de la quitina alcanza alrededor del 50 % esta se vuelve soluble en soluciones acuosas ácidas y pasa a llamarse quitosano (Rinaudo, 2006).

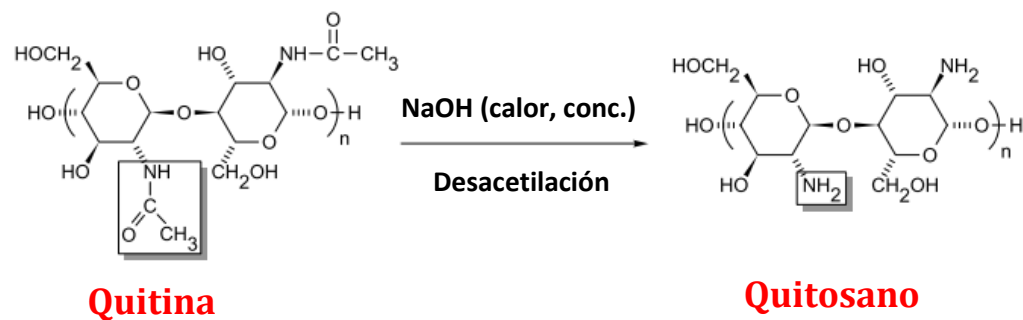


Figura IV. 1. Estructura química de los polímeros quitina y quitosano, adaptado de Sigma-Aldrich®.

La estructura química del quitosano y la celulosa son similares, donde la diferencia se encuentra en que uno de los grupos hidroxilo en cada monómero del quitosano se encuentra sustituido por un grupo amina (Figura IV.2).

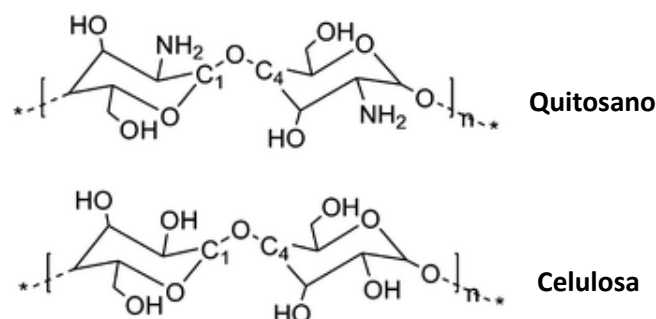


Figura IV. 2. Estructura química de los polímeros quitosano y celulosa

Dos aspectos importantes del quitosano son el grado de desacetilación y el peso molecular del polímero. La solubilidad del quitosano depende del grado de desacetilación, la distribución de los grupos acetilo a lo largo de la cadena, el peso molecular y la naturaleza del ácido empleado. Debido a la presencia de los grupos amino, el quitosano posee un pK_a de entre 6,0 y 6,5. A pH inferiores a 6 los grupos amino se encuentran protonados (NH_3^+) y se vuelve soluble en soluciones ácidas (Pillai et al., 2009). El quitosano es soluble en soluciones diluidas de ácidos orgánicos como ácido acético, fórmico, tartárico, valérico, láctico, glicólico y cítrico, y también en ácidos inorgánicos como clorhídrico y sulfúrico (Park et al., 2002).

El interés que ha despertado este polímero se debe a sus propiedades antifúngicas, su capacidad de formar películas, su biodegradabilidad e inocuidad (Badawy et al. 2009) que lo han llevado a su uso en nutrición, alimentos, protección medioambiental, biotecnología, ingeniería química, industria farmacéutica, medicina y agricultura (H. Liu et al., 2012; Verlee et al., 2017).

IV.2. Propiedades antimicrobianas del quitosano

Diversos estudios se han realizado con respecto a la capacidad del quitosano de inhibir el desarrollo de bacterias y hongos (Hernández-Lauzardo et al., 2011; Verlee et al., 2017). Se ha reportado la capacidad antifúngica del quitosano contra los patógenos más importantes durante la poscosecha de frutas como *Botrytis cinerea* (Badawy & Rabea, 2009; Romanazzi et al., 2009), *Rhizopus stolonifer* (Hernández-Lauzardo et al., 2008), *Monilinia fruticola* (Yang et al., 2012), *Alternaria alternata*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* (Martínez-Camacho et al., 2010; Ziani et al., 2009), *Penicillium digitatum* (Chien et al., 2007) y *Penicillium expansum* (Romanazzi et al., 2003).

El mecanismo de acción por el cual el quitosano ejerce su actividad antimicrobiana no se encuentra del todo elucidado, pero existen dos hipótesis al respecto. Una de las hipótesis plantea que el mecanismo de acción se basa en que las cargas positivas presentes en las cadenas de quitosano (debido a los grupos amino) son capaces de interactuar con las cargas negativas de los residuos de las macromoléculas en la membrana celular. Esta interacción interferiría en el intercambio de nutrientes y a su vez, podría comprometer la integridad de la membrana causando la liberación de material intracelular (Bautista-Baños et al. 2006;

Möller et al. 2004, Palma-Guerrero et al. 2010). Otros autores han propuesto que probablemente el mecanismo de acción del quitosano sea más complejo que la simple interacción con la membrana celular y que involucra una serie de eventos que eventualmente podrían llevar a la muerte celular. Este mecanismo propone la difusión de quitosano al interior de las células donde interaccionaría con el ADN inhibiendo la formación de ARN_m y por lo tanto impidiendo la formación de proteínas (Raafat et al., 2008).

La actividad antimicrobiana del quitosano está afectada no sólo por factores inherentes al sustrato sobre el que actúa, como son la composición en nutrientes, el pH y la actividad de agua, sino también por el pH de la disolución, el grado de desacetilación, el peso molecular del quitosano empleado y el tipo de microorganismo (Hernández-Lauzardo et al. 2011; Badawy et al. 2009; Guerra-Sánchez et al. 2009; Park et al. 2002).

IV.3. Películas y recubrimientos de quitosano para su uso en alimentos

Una película biodegradable se define como una capa fina de un material continuo preformado que se coloca sobre el producto a recubrir o entre capas del mismo (Bravin et al., 2006). Estas películas o recubrimientos pueden actuar como barreras que controlan la transferencia de agua y gases como O₂, CO₂ y etileno, lípidos, aromas y sabores. A su vez, mejora las propiedades mecánicas y pueden ser empleadas para vehicular diferentes compuestos de interés (antimicrobianos, antioxidantes, etc.) que pueden mantener e incrementar la vida útil de los productos (Bourtoom, 2008; Leceta et al., 2013).

Las películas y recubrimientos biodegradables están formadas por polímeros de origen vegetal o animal como pueden ser polisacáridos, proteínas o lípidos que son capaces de formar estructuras o redes moleculares con fuerzas de cohesión y adhesión importantes. Dependiendo de la naturaleza del polímero, la interacción entre sus cadenas para formar una estructura cohesiva podrá darse a través de enlaces covalentes como son los puentes disulfuro o a través de interacciones electrostáticas y puentes de hidrógeno.

Se ha estudiado la formación de películas en base a una gran variedad de biopolímeros como ser metilcelulosa, carboximetilcelulosa, goma algarroba, goma xantana, proteínas de suero de leche, caseínas, gelatina, beta-lactoglobulinas, gluten de trigo, almidón de maíz, entre otros como el quitosano (Hassan et al., 2018).

Para la formación de una película o recubrimiento biodegradable adecuado es necesario seleccionar adecuadamente el polímero, el solvente y los aditivos que permitan obtener la

película o recubrimiento con las características deseadas. Muchas de las películas formadas resultan ser muy rígidas y quebradizas y, por lo tanto, requieren plastificantes para debilitar las fuerzas intermoleculares entre las cadenas de polímero e incrementar la extensibilidad y flexibilidad de las películas. Los plastificantes más usados son los mono-, di- y oligosacáridos (glucosa, fructosa), los polioles como el sorbitol, glicerol o polietilenglicol y lípidos y derivados (ácidos grasos, monoglicéridos acetilados y fosfolípidos) (Martínez-Camacho et al., 2010; Sothornvit et al., 2010; Tantala et al., 2019) El agua residual dentro de las películas también actúa como plastificante para películas hidrofílicas y muchas veces no es necesaria la incorporación de plastificantes.

Con respecto a las películas formadas a partir de quitosano, se ha reportado que las propiedades mecánicas y de permeabilidad de éstas dependen del peso molecular, del grado de desacetilación y de la concentración del quitosano así como del sistema de solventes y plastificantes (Escárcega-Galaz et al., 2018; Leceta et al., 2013; Park et al., 2002; Srinivasa et al., 2007).

IV.4. Aplicación de recubrimientos poliméricos sobre las frutas

El interés en aplicar películas poliméricas a frutas se debe principalmente a sus propiedades de barrera semipermeable a los gases (vapor de H₂O, O₂, CO₂ y etileno) (Hernández-Muñoz et al., 2008). Sin embargo, las propiedades de los recubrimientos sobre las frutas no son necesariamente las mismas propiedades de las películas, ya que debe tomarse en cuenta la dispersión y afinidad del polímero en la superficie de la fruta (Casariego et al., 2008).

Cuando se plantea la aplicación de un recubrimiento sobre un alimento, resulta fundamental estudiar los fenómenos de dispersión y adhesión sobre la superficie de dicho alimento y la cohesión del recubrimiento en sí. Estos fenómenos determinan qué tipo de soluciones pueden adherirse a una superficie y cómo realizar modificaciones para favorecer la formación de un recubrimiento. Si el recubrimiento no es capaz de distribuirse uniformemente en la superficie de la fruta, las propiedades de barrera a los gases pueden verse comprometidas (Lin & Zhao, 2007).

La formación de un buen recubrimiento está controlada por la mojabilidad de las soluciones de polímero en la fruta, la cual puede ser evaluada a través del ángulo de contacto (Park et al., 2002). En la Figura IV.3 se muestra la relación entre la mojabilidad de un líquido y el ángulo de contacto (θ) con la superficie sólida.

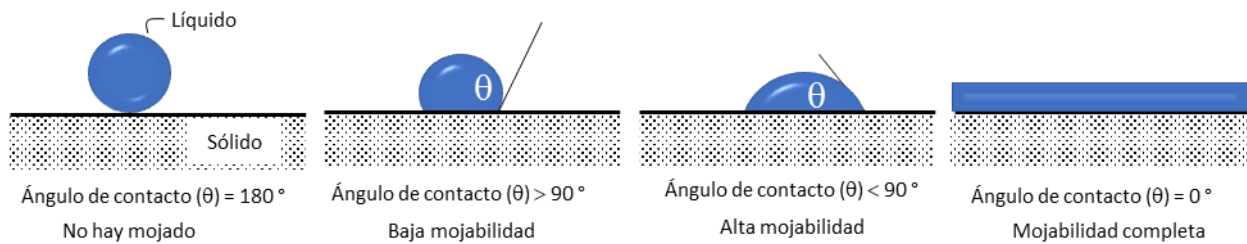


Figura IV. 3. Relación entre el ángulo de contacto θ y la mojabilidad de un líquido sobre una superficie.

Para mejorar la mojabilidad de los recubrimientos se pueden emplear tensoactivos para reducir la tensión superficial de la solución y así mejorar la compatibilidad entre las fases (Goodwin, 2004). Para evaluar este efecto hay que tener en cuenta algunos aspectos importantes de la teoría termodinámica de adhesión (Sharpe & Schonhorn, 1964) que se presentan a continuación.

IV.5. Conceptos teóricos de la termodinámica de adhesión

Uno de los métodos empleados para determinar la tensión superficial de una superficie sólida (γ_S) es el propuesto por Fowkes (1963) y se basa en la medida del ángulo de contacto entre un líquido y la superficie sólida. Las ecuaciones termodinámicas básicas (Sharpe y Schonhorn 1964) que describen la relación entre γ_S y θ para superficies de baja energía son:

$$\gamma_L \cos \theta - \gamma_S + \gamma_{SL} = 0$$

$$W_a = \gamma_L (1 + \cos \theta) = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL}$$

Donde,

θ : ángulo de contacto ($^\circ$)

γ_L : tensión superficial del líquido (mN m^{-1})

γ_{SL} : tensión interfacial sólido-líquido (mN m^{-1})

W_a : coeficiente de adhesión entre el líquido y el sólido (mN m^{-1})

Según Girifalco y Good (1957) el W_a se puede estimar como: $W_a = 2\sqrt{\gamma_S \gamma_L}$

Cuando se consideran las fuerzas de atracción entre las interfaces, se ha sugerido que la tensión superficial es la suma de las contribuciones de las diferentes fuerzas intermoleculares (Owens y Wendt, 1969). Para un líquido puro, si las componentes polares (γ_L^p) y dispersas

(γ_L^d) de la tensión superficial son conocidas, así como el ángulo de contacto (θ) entre el líquido y el sólido, el W_a puede expresarse como:

$$W_a = W_a^p + W_a^d = 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} + 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} = \gamma_L(1 + \cos \theta)$$

Donde:

W_a^p : componente polar del coeficiente de adhesión (mN m^{-1})

W_a^d : componente dispersa del coeficiente de adhesión (mN m^{-1})

γ_S^p : componente polar de la tensión superficial del sólido (mN m^{-1})

γ_S^d : componente dispersa de la tensión superficial del sólido (mN m^{-1})

Reordenando la ecuación anterior se obtiene la ecuación de Fowkes:

$$\frac{1 + \cos \theta}{2} \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}} = \sqrt{\gamma_S^p} \sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}} + \sqrt{\gamma_S^d}$$

Si para líquidos puros de referencia se conocen las componentes polares (γ_L^p) y dispersas (γ_L^d) de la tensión superficial y el ángulo de contacto entre estos líquidos y la superficie del sólido, se pueden calcular las variables independiente $\sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$ y dependiente $\frac{1 + \cos \theta}{2} \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}}$.

Mediante el gráfico de $\frac{1 + \cos \theta}{2} \frac{\gamma_L}{\sqrt{\gamma_L^d}}$ vs. $\sqrt{\frac{\gamma_L^p}{\gamma_L^d}}$ se pueden obtener los parámetros γ_S^p y γ_S^d .

Sumando los parámetros anteriores se obtiene la tensión superficial del sólido:

$$\gamma_S = \gamma_S^p + \gamma_S^d$$

Otra metodología empleada para determinar la tensión superficial de un sólido es la teoría de Zisman (Zisman, 1964). En este método se calcula la tensión superficial crítica, la cual se define como la tensión superficial máxima que un líquido puede tener para poder mojar una superficie sólida. Para determinar este parámetro es necesario medir el ángulo de contacto de líquidos de referencia y la superficie del sólido. La tensión superficial crítica se calcula como la extrapolación del gráfico $\cos \theta$ vs. γ_L para $\theta = 0$. Este método es aplicable únicamente para sistemas con superficies de baja energía con tensiones superficiales por debajo de 100 mN m^{-1} .

Finalmente, la mojabilidad de un líquido en una superficie sólida se puede evaluar mediante el balance entre la energía de adhesión (W_a) del líquido en el sólido y la energía de cohesión del líquido (W_c). La afinidad entre dos fases aumenta a medida que las fuerzas de atracción entre las diferentes fases (fuerza de unión) son mayores que las fuerzas de atracción entre las moléculas de la misma fase (fuerzas de cohesión). El coeficiente de adhesión (W_a) se define como la energía por unidad de área necesaria para separar dos fases, mientras que el coeficiente de cohesión (W_c) se define como la energía por unidad de área necesaria para producir dos nuevas superficies conteniendo las mismas moléculas. La energía de adhesión permite que el líquido se disperse sobre el sólido mientras que la energía de cohesión provoca que el líquido se una. El coeficiente de cohesión (W_c) se puede calcular como:

$$W_c = 2\gamma_L$$

La diferencia entre estos dos coeficientes se conoce como coeficiente de esparcimiento (W_s) y está relacionado con la energía necesaria para que la fase líquida se disperse (moje) en la superficie sólida:

$$W_s = W_a - W_c \leq 0$$

Cuando $W_s < 0$, el líquido moja parcialmente la superficie sólida y la gota de este líquido forma un ángulo θ con la superficie. Por otro lado, cuando $W_s = 0$ significa que el líquido moja completamente la superficie sólida y el ángulo de contacto es cero (Skurtys et al., 2015). Tomando en cuenta estos coeficientes termodinámicos relacionados con la mojabilidad, se puede evaluar el efecto de la incorporación de tensoactivos a la formulación de un polímero para mejorar la compatibilidad entre el recubrimiento y la fruta.

Esquema general del capítulo

En este capítulo se desarrollará la metodología empleada para la selección del tipo de quitosano y la evaluación de sus propiedades antifúngicas y de formación de películas. A su vez, se evaluará la aplicación en manzanas Red Delicious y su efecto en el desarrollo de *P. expansum* y en la calidad de manzanas Red Delicious almacenadas en cámara fría. Por último, se evaluará la posibilidad de aplicar la levadura seleccionada junto con quitosano para lograr un recubrimiento que minimice las pérdidas de fruta por deterioros fúngico y fisiológico.

Las etapas planteadas en este capítulo son:

- ◆ Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los quitosanos.
- ◆ Evaluación de los fenómenos de adhesión, cohesión y esparcimiento de las soluciones de quitosano sobre la superficie de las frutas.
- ◆ Caracterización de las películas de quitosano.
- ◆ Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano contra *P. expansum* en fruta.
- ◆ Evaluación del efecto de quitosano en las propiedades fisicoquímicas de las frutas almacenadas en cámara fría.
- ◆ Evaluación de la aplicación conjunta del quitosano y levaduras seleccionada en el control de *P. expansum* en fruta.

IV.2. OBJETIVOS

- ◆ Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de quitosano contra *Penicillium expansum*.
- ◆ Evaluar la incorporación de tensoactivos para mejorar la mojabilidad de los recubrimientos de quitosano en manzanas Red Delicious.
- ◆ Elaborar y caracterizar las películas de quitosano.
- ◆ Evaluar el efecto del recubrimiento de quitosano en la calidad de manzanas Red Delicious.
- ◆ Evaluar la capacidad antifúngica del quitosano contra *P. expansum* en manzanas Red Delicious y su combinación con la levadura *Debaryomyces hansenii* F9D

IV.3. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.3.1. Quitosano

Para los ensayos se emplearon dos tipos de quitosano, quitosano de bajo peso molecular (LMW, *low molecular weight*) y quitosano de peso molecular medio (MMW, *medium molecular weight*) suministrados por Sigma-Aldrich (USA) (Apéndice 1). Ambos quitosanos poseen grados de desacetilación que se encuentran entre el 75 y 85 %. Las soluciones de quitosano se prepararon en ácido acético glacial al 1 % (v/v) y se dejaron con agitación magnética durante 24 h.

IV.3.2. Determinación de la viscosidad de las soluciones de quitosano

La viscosidad de las soluciones de quitosano LMW y MMW en ácido acético 1 % (v/v) se determinó a 25 °C empleando un viscosímetro rotacional SNB-AI (Senova, China) con una sonda N° 21 y una velocidad de rotación de 100 rpm. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

IV.3.3. Determinación del peso molecular de los quitosanos

La determinación del peso molecular de los quitosanos LMW y MMW se realizó mediante medidas de viscosidad en un viscosímetro capilar Ubbelohde colocado dentro de un baño

termostatizado a 25 °C. Se prepararon soluciones de quitosano (LMW o MMW) de diferente concentración (0,125 a 0,5 %) en buffer de CH₃COOH/CH₃COONa (0,5/0,2 mol L⁻¹). Las soluciones se colocaron en el viscosímetro y se determinó el tiempo de escurrimiento por triplicado. A partir de estos valores y de las medidas del tiempo de escurrimiento del solvente (buffer) se determinaron los parámetros η_{rel} , η_{es} y η_{red} a través de las siguientes ecuaciones:

$$\eta_{rel} = \frac{t_q}{t_{sol}} \quad \eta_{es} = \eta_{rel} - 1 \quad \eta_{red} = \frac{\eta_{es}}{c}$$

Donde:

η_{rel} : viscosidad relativa

t_q : tiempo de escurrimiento de la solución de quitosano (s)

t_{sol} : tiempo de escurrimiento del solvente (s)

η_{es} : viscosidad específica

η_{red} : viscosidad reducida (dL g⁻¹)

c : concentración de quitosano (g dL⁻¹)

A partir de la gráfica de η_{es} versus la concentración de quitosano se determinó la viscosidad intrínseca $[\eta]$ del quitosano como la extrapolación para $c=0$ (Paterson et al. 2003).

Empleando la viscosidad intrínseca se calculó el peso molecular empleando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (Flory, 1953):

$$[\eta] = kPM^\alpha$$

Donde:

$[\eta]$: viscosidad intrínseca del quitosano (dL g⁻¹)

PM: peso molecular del quitosano (Da)

k : constante empírica dependiente de la naturaleza del polímero, solvente y temperatura

α : constante empírica dependiente de la naturaleza del polímero, solvente y temperatura

Para el quitosano los valores de las constantes k y α se consideraron como $3,04 \times 10^{-4}$ y 0,76, respectivamente, de acuerdo a lo reportado por Wang et al. (1991).

IV.3.4. Actividad antifúngica *in vitro* de los quitosanos LMW y MMW

IV.3.4.1. Inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium expansum*

La inhibición del crecimiento micelial se llevó a cabo en placas de Petri de 9 cm conteniendo el medio de cultivo PDA incorporado con quitosano. Las soluciones de quitosano se prepararon empleando ácido acético (1 % v/v) y el pH se ajustó en 5,5 empleando NaOH (1 N) (Badawy et al. 2009). Las concentraciones finales en el medio de cultivo fueron 0,25; 0,5 y 1 % (m/v) de quitosano LMW o MMW.

En el centro de cada placa se colocó un disco de micelio no esporulado de *P. expansum* y se incubó a 25 °C. Luego de 8 días de incubación se midió el diámetro de crecimiento del hongo y se comparó con el control. El control consistió en placas con agregado de ácido acético (1 % v/v, pH=5,5) sin quitosano. Todos los ensayos se llevaron a cabo por cuadruplicado.

IV.3.4.2. Inhibición de la germinación de esporas de *Penicillium expansum*

En el ensayo de inhibición de la germinación de esporas se pusieron en contacto las esporas de *P. expansum* (1×10^5 esporas mL⁻¹) con diferentes concentraciones finales de quitosano (0,001; 0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25, 0,5 y 1 %) en medio PDB y se incubaron a 25 °C. Luego de 18 h de incubación se tomaron muestras, se contaron 200 esporas al azar y se registró el número de esporas germinadas. Se consideró que una espora estaba germinada cuando el largo del tubo germinal alcanzó la mitad del diámetro de la espora (Plascencia-Jatomea et al., 2003). A partir de estos datos se calculó la inhibición de la germinación de esporas debido al tratamiento con quitosano como:

$$\text{Inhibición debido al tratamiento (\%)} = 100 - \frac{\text{Germinación esporas tratamiento (\%)}}{\text{Germinación esporas control (\%)}} \cdot 100$$

IV.3.5. Evaluación de la mojabilidad de las soluciones de quitosano LMW y MMW sobre manzanas Red Delicious

IV.3.5.1. Determinación de la tensión superficial de las soluciones de quitosano

Se prepararon soluciones de quitosano 1 % (m/v) LMW o MMW en ácido acético (1 % v/v) con agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80 (Sigma-Aldrich) en las concentraciones 0,01; 0,02; 0,05; 0,07; 0,1 y 0,15 % (m/m). La tensión superficial de las

soluciones de quitosano se midió empleando un tensiómetro de anillo (Kruss, modelo K6, Alemania) a una temperatura de 25 °C. Para cada solución se realizaron 10 medidas de tensión superficial.

IV.3.5.2. Medida del ángulo de contacto de un líquido y la superficie de manzanas Red Delicious

Las manzanas empleadas en este ensayo se seleccionaron por su uniformidad y ausencia de daños o defectos. Previo al ensayo las frutas se lavaron con agua destilada, se secaron, se cortaron secciones de la cáscara y se adhirieron a un portaobjeto. Para la medida del ángulo de contacto se colocó manualmente una gota de líquido sobre la superficie de la fruta empleando una micropipeta (Microman, Gibson). El ángulo de contacto se midió mediante un goniómetro (Standard Goniometer 200-00, Ramé-Hart Instrument Co., USA) dentro los 30-60 s luego de la colocación de la gota en la superficie (Figura IV.4).



Figura IV.4. Equipo empleado para las medidas del ángulo de contacto e imagen de una gota de líquido sobre la superficie de la fruta.

Para determinar la tensión superficial de la fruta se determinó el ángulo de contacto entre la manzana y los líquidos puros agua, etilenglicol y dimetilsulfóxido (Slavutsky et al. 2015). A su vez, se determinó el ángulo de contacto entre las soluciones de quitosano con el agregado de los tensoactivos y la superficie de la fruta con el fin de determinar los parámetros termodinámicos W_a , W_c y W_s . Para cada líquido empleado se realizaron 15 medidas de ángulo de contacto.

IV.3.6. Preparación y caracterización de películas de quitosano

IV.3.6.1. Preparación de películas de quitosano

Para la obtención de películas de quitosano se empleó la técnica de casting (evaporación del solvente) según Martínez-Camacho et al. (2010) con modificaciones. Las soluciones de quitosano de LMW o MMW se colocaron en placas de acrílico niveladas y se secaron en estufa a 60 °C hasta completa evaporación del solvente. Se evaluó el agregado de glicerol como plastificante en las concentraciones 5, 10 y 20 % y el agregado de los tensoactivos Tween® 20 y Tween® 80 en la concentración seleccionada en los ensayos anteriores.

IV.3.6.2. Espesor de las películas

El espesor de las películas se midió empleando un micrómetro manual (Braive Instruments, Checy, Francia) con una precisión de 1 µm en al menos 5 posiciones al azar. Se calculó el espesor de las películas como el promedio de dichas medidas.

IV.3.6.3. Opacidad

La opacidad de las películas se midió empleando espectrofotometría de acuerdo a lo propuesto por Darbasi et al. (2017). Las películas se colocaron en el interior de una celda y se determinó la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800 (Japón). La opacidad de las películas se calculó mediante la ecuación:

$$Opacidad = \frac{Abs}{e}$$

donde:

Abs: absorbancia a 600 nm

e: espesor de la película (mm)

IV.3.6.4. Solubilidad en agua

La solubilidad de las películas se determinó como el porcentaje de materia seca solubilizada en agua luego de 24 h a 25 °C. Este método fue adaptado según la técnica descrita por Tunc et al. (2007). Las películas se cortaron en piezas de 2 cm de lado y la masa seca inicial se determinó mediante secado en estufa a 105 °C hasta masa constante. Las películas secas se pesaron y se colocaron en un matraz conteniendo 50 mL de agua destilada. Luego de 24 h con agitación magnética, el contenido del matraz se filtró con papel de filtro Whatman N° 4 previamente secado en estufa a 105 °C y pesado. El papel de filtro conteniendo la película

se secó en estufa a 105 °C hasta masa constante y se determinó el peso final de las películas secas. El ensayo se llevó a cabo por triplicado y la solubilidad se calculó según:

$$\text{Solubilidad (\%)} = \frac{m_{p,0} - m_{p,f}}{m_{p,0}} \times 100$$

Donde:

$m_{p,0}$: masa inicial de película en base seca (g)

$m_{p,f}$: masa final de película en base seca (g)

IV.3.6.5. Isotermas de adsorción de agua

Las isotermas de adsorción de agua de las películas se determinaron de acuerdo a Zinoviadou et al., (2010) con modificaciones. Se secaron piezas de las películas de aproximadamente 2 cm de lado en desecador conteniendo P₂O₅ hasta lograr masa constante. Las películas se pesaron y se colocaron en recipientes herméticos de diferente actividad de agua (a_w) controlada por soluciones saturadas de diferentes sales (Tabla IV.1) y se incubaron a 25 °C.

Tabla IV.1. *Actividad de agua a 25 °C de soluciones acuosas saturadas de las sales*

	a_w (%)
LiCl₂	0,114
CH₃CO₂K	0,237
MgCl₂	0,329
K₂CO₃	0,443
Mg(NO₃)₂	0,536
NaBr	0,653
NaCl	0,762
KCl	0,855
BaCl₂	0,915

Las películas se pesaron y cuando la diferencia entre dos masas fue inferior a 1 mg por g de masa seca se consideró alcanzado el equilibrio (Slavutsky y Bertuzzi, 2015b). Los ensayos se realizaron por triplicado para cada actividad de agua. Los datos obtenidos fueron ajustados al modelo de isotermas de adsorción GAB:

$$w_e = \frac{w_0 \cdot C \cdot k \cdot a_w}{(1 - k \cdot a_w)(1 - k \cdot a_w + C \cdot k \cdot a_w)}$$

Donde,

w_e : contenido de humedad de la película en el equilibrio (g H₂O cada 100 g de materia seca)

w_0 : contenido de humedad de la monocapa (g H₂O cada 100 g de materia seca)

C : constante de Guggenheim, relacionada con el calor de sorción de la monocapa

k : factor de corrección relacionado con el calor de sorción de la multicapa

a_w : actividad de agua en el recipiente

El ajuste del modelo se evaluó a través del coeficiente de correlación (r^2) entre los datos experimentales y los valores predichos por el modelo y a través del error cuadrático medio, ECM (%) calculado como:

$$ECM (\%) = \frac{100}{N} \left(\sum_{i=1}^n \frac{|w_e^i - w_p^i|}{w_e^i} \right)$$

Donde,

N : número de observaciones

w_e^i : contenido de humedad experimental (g H₂O cada 100 g de materia seca)

w_p^i : contenido de humedad predicha por el modelo (g H₂O cada 100 g de materia seca)

A partir del valor del contenido de humedad de la monocapa (w_0), se puede determinar la superficie específica de las películas mediante la ecuación:

$$S_0 = w_0 \frac{1}{PM_{H_2O}} N_A A_{H_2O}$$

Donde,

S_0 : superficie específica de las películas (m² g⁻¹)

PM_{H_2O} : peso molecular del agua

N_A : número de Avogadro, 6×10^{23} moléculas mol⁻¹

A_{H_2O} : área de una molécula de agua, $1,06 \times 10^{-19}$ m²

IV.3.6.6. Permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas se realizó a 25 °C mediante gravimetría basándose en una modificación del método ASTM 96-00 (ASTM, 1995). Para el ensayo se emplearon celdas cilíndricas de acrílico de 10 mm de profundidad con una superficie expuesta al ambiente de 6,25 cm² (Figura IV.5). En el interior de cada celda se

colocó una masa de agua conocida, se colocó la película sobre la celda, se selló el sistema y las celdas se colocaron en un desecador conteniendo CaCl_2 como agente desecante. El desecador contó con circulación de aire forzada para asegurar la uniformidad de humedad y temperatura. Las celdas fueron pesadas cada 1 hora en balanza analítica (Shimadzu ATX224, Japón) y se realizaron gráficos de masa en función del tiempo. Para cada película ensayada se contó con 5 réplicas.

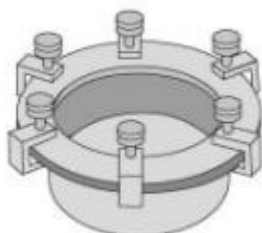


Figura IV.5. Esquema de una celda para determinación de permeabilidad al vapor de agua.

La permeabilidad al vapor de agua se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$PVA = \frac{\Delta m}{\Delta t} \frac{e}{A \cdot \Delta P_v}$$

donde:

PVA : permeabilidad al vapor de agua ($\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$)

$\frac{\Delta m}{\Delta t}$: pendiente de la curva del gráfico masa versus tiempo (g s^{-1})

e : espesor de la película (m)

A : área expuesta de la película (m^2)

ΔP_v : diferencia de presión de vapor a ambos lados de la película (Pa)

IV.3.6.7. Análisis térmico

Los ensayos termogravimétricos (TGA) de las películas de quitosano se llevaron a cabo en un equipo Shimadzu TGA50 (Japón). Para el ensayo se tomaron muestras de entre 5 y 10 mg de película, se colocaron en cápsulas de platino y se calentaron hasta $800\text{ }^\circ\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Se realizaron ensayos bajo atmósfera de aire y de N_2 con un flujo de gas de 50 mL min^{-1} .

IV.3.6.8. Microscopía electrónica de barrido

La sección transversal de las películas se obtuvo mediante criofractura en nitrógeno líquido. Las muestras se montaron en soportes metálicos y fueron sometidas a secado por punto crítico de CO₂ y posterior recubrimiento con oro. El análisis se llevó a cabo en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6480 LV (Japón) de la Universidad Nacional de Salta (Argentina).

IV.3.7. Efecto de la aplicación de quitosano en la calidad de las frutas

IV.3.7.1. Aplicación de quitosano

A las manzanas se les aplicó la solución de quitosano y tensoactivo seleccionados en los ensayos anteriores mediante aspersion. Las frutas se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se introdujeron en cámara a (0 ± 1) °C y se incubaron por 3 meses. Se emplearon como frutas no tratadas con quitosano. Al inicio y finalización del período de almacenamiento se midieron las propiedades fisicoquímicas de 30 manzanas por tratamiento.

IV.3.7.2. Determinación de pH, sólidos solubles y acidez titulable

La determinación de sólidos solubles, pH y acidez titulable se evaluó en jugo obtenido de cada manzana. La medida de pH se realizó empleando un pH-metro Jenway pH meter 3305 (Inglaterra) y los sólidos solubles totales (SST) se determinaron mediante un refractómetro manual (Atago PAL-1, Japón). Los SST se expresaron como °Brix, donde 1 °Brix equivale a 1 g sólido disuelto por cada 100 g de solución.

La determinación de la acidez total titulable se basó en el método AOAC 942.15 (AOAC, 2005). Para ello, el jugo de la manzana se valoró con NaOH (0,1 mol L⁻¹) hasta pH = $8,1 \pm 0,2$.

La acidez titulable se expresó como gramos de ácido málico por cada 100 gramo de jugo:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{V_{NaOH} \cdot [NaOH] \cdot PM_{AM}}{2 \cdot m_{jugo}} 100$$

Donde,

V_{NaOH} : volumen del gasto de NaOH (L)

$[NaOH]$: concentración de NaOH empleada en la valoración (mol L⁻¹)

PM_{AM} : peso molecular del ácido málico

m_{jugo} : masa de jugo empleada en la valoración (g)

IV.3.7.3. Determinación de la firmeza de la fruta

La firmeza de la fruta se determinó mediante un penetrómetro manual Efeggi (Italia) con una sonda cilíndrica con base cóncava de 8 mm. Se evaluaron 30 frutas por cada tratamiento y cada fruta se midió por duplicado.

IV.3.7.4. Determinación de pérdida de peso de la fruta

Las frutas fueron pesadas al inicio y final del tiempo de almacenamiento empleando una balanza analítica Shimadzu ATX224 (Japón). La pérdida de masa se expresó como el porcentaje de pérdida de masa con respecto al peso inicial. Para cada tratamiento se emplearon 30 frutas.

IV.3.7.5. Determinación de color

El color de las manzanas al inicio y final del período de almacenamiento se midió mediante un colorímetro manual (Konica Minolta Color Reader CR-10, Japón). Mediante este equipo se obtuvieron las coordenadas cromáticas L^* (luminosidad), a^* (- verde, + rojo) y b^* (- azul, + amarillo) del espacio de color CIEL^{*} a^*b^* (Figura IV.6).

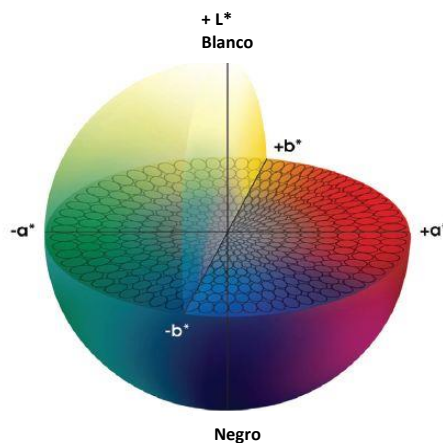


Figura IV.6. Espacio de color CIEL^{*} a^*b^* .

Imagen adaptada de “Guidelines for Thermoplastic Color Control and Change Management”

Estos parámetros se emplearon para calcular los cambios de color total (ΔE) de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2}$$

Para cada tratamiento se evaluaron 30 frutas y en cada fruta se evaluó el color de fondo y el sobrecolor (Figura IV. 7).

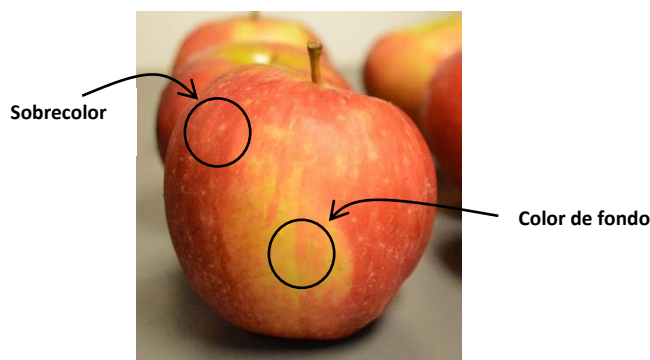


Figura IV.7. Medidas de color en manzanas Red Delicious

IV.3.8. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano seleccionado y su combinación con la levadura F9D para el control de *P. expansum* en manzanas Red Delicious

En este ensayo se empleó el quitosano y tensoactivo seleccionado en los ensayos anteriores. La evaluación de la actividad antifúngica de quitosano se realizó en forma similar a los ensayos de biocontrol en fruta planteados en el capítulo anterior. En primer lugar, frutas sanas fueron desinfectadas superficialmente con etanol 70 % y se dejaron secar en cabina de flujo laminar. Sobre cada fruta se realizaron cinco heridas en la zona ecuatorial y fueron inoculadas como se describe a continuación:

- i) Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano: las heridas fueron inoculadas con 10 μL de la suspensión de quitosano (en ácido acético 1 % v/v) con agregado del tensoactivo y posterior inoculación con 10 μL de una suspensión de esporas de *P. expansum* (1×10^4 esporas mL^{-1}).
- ii) Evaluación del efecto combinado quitosano-levadura: las heridas fueron inoculadas con 10 μL de una suspensión de levadura F9D (1×10^7 células mL^{-1}) y quitosano (en ácido acético 1 % v/v, con agregado de tensoactivo) y posterior inoculación con 10 μL de una suspensión de esporas del hongo (1×10^4 esporas mL^{-1}).

- iii) Evaluación de la levadura F9D: las heridas fueron inoculadas con 10 μL de una suspensión de la levadura (1×10^7 células mL^{-1}), se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente se inocularon con 10 μL de una suspensión de esporas del hongo de concentración 1×10^4 esporas mL^{-1} .
- iv) Control 1: las heridas fueron inoculadas con 10 μL de una solución de ácido acético 1 % v/v con agregado de tensoactivo y posterior inoculación con 10 μL de una suspensión de esporas del hongo de concentración 1×10^4 esporas mL^{-1} .
- v) Control 2: las heridas fueron inoculadas con 10 μL de agua destilada estéril y posterior inoculación con 10 μL de una suspensión de esporas del hongo de concentración 1×10^4 esporas mL^{-1} .

Luego de la inoculación, las heridas se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente las frutas se almacenaron en cámara fría (0 ± 1) °C. Se emplearon seis frutas por tratamiento, por lo que el ensayo contó con 30 repeticiones ($n=30$).

A la salida de la cámara se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad y a su vez, se evaluó el crecimiento de la levadura en las heridas. Para ello se tomaron 10 heridas al azar, se retiraron de la fruta y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 mL conteniendo 1 mL de suero fisiológico con Tween[®] 80 (agua + 0,9 % peso NaCl + 0,1 % Tween[®] 80). Los tubos se agitaron en vórtex durante 5 minutos y de la suspensión resultante se realizaron diluciones seriadas y 100 μL de estas suspensiones se sembraron en placas de PDA. Las placas se incubaron a 25 °C durante 48 h. Luego de la incubación se contó el número de colonias por placa correspondientes a la levadura inoculada.

IV.3.9. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó a través de un análisis de varianza de una vía, utilizando la prueba de Tukey para comparar las medias de los tratamientos considerando un nivel de significancia de 0,05.

El análisis estadístico de la incidencia en los ensayos de control biológico se realizó a través del modelo lineal generalizado asumiendo una distribución binomial y utilizando la función logit. Los tratamientos fueron comparados utilizando el test DGC (Di Rienzo et al. 2002) con un nivel de significancia de 0,05.

Para estos análisis se empleó el software InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009).

IV.4. RESULTADOS

IV.4.1. Soluciones de quitosano

Los quitosanos LMW y MMW fueron capaces de disolverse completamente en ácido acético 1 % luego de 24 h de agitación a temperatura ambiente. La máxima concentración preparada fue de 1 % (m/v) debido a la alta viscosidad de las soluciones resultantes. Para esta concentración, la viscosidad del quitosano LMW fue de (35 ± 2) mPa s y para el quitosano MMW fue de (214 ± 1) mPa s.

Los pesos moleculares de los quitosanos LMW y MMW determinados mediante la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada fueron $(1,39 \pm 0,01) \times 10^5$ Da y $(2,14 \pm 0,03) \times 10^5$ Da, respectivamente.

IV.4.2. Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de los quitosanos

IV.4.2.1. Inhibición del crecimiento micelial de *Penicillium expansum*

El crecimiento micelial de *P. expansum* en medio PDA incorporado con quitosano LMW o MMW en las concentraciones 0,25, 0,5 y 1 % fue significativamente menor que en el medio control (PDA sin agregado de quitosano). Para el quitosano LMW no se observaron diferencias significativas en el grado de inhibición de las concentraciones 0,25 y 0,5 % siendo la concentración 1 % la que logró el mayor porcentaje de inhibición (Figura IV.8).

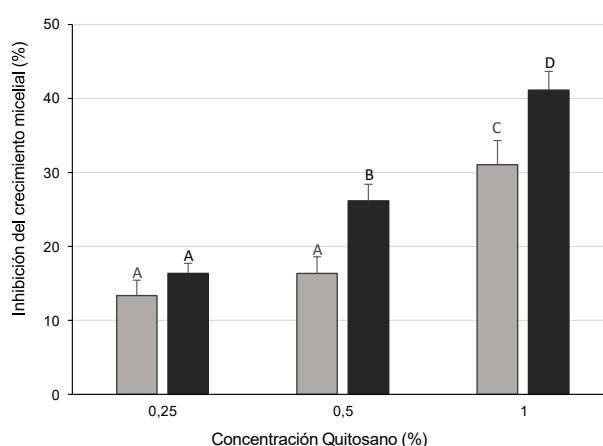


Figura IV.8. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *P. expansum* evaluado a los 8 días de incubación a 25 °C en medio PDA conteniendo quitosano LMW (■) y quitosano MMW (■). Las barras de error representan el IC.

Para el quitosano MMW se observó un aumento de la inhibición con el aumento de la concentración. Cuando se compararon ambos tipos de quitosano al día 8 de incubación se pudo observar que a partir de la concentración 0,5 % hubo diferencias significativas entre ambos quitosanos, logrando un mayor porcentaje de inhibición el quitosano MMW. Para la concentración 1 % el porcentaje de inhibición del quitosano LMW fue de $(31,1 \pm 2,5)$ % y para el quitosano MMW fue de $(41,1 \pm 2,7)$ %.

IV.4.2.2. Inhibición de la germinación de esporas de *Penicillium expansum*

En la Figura IV.9 se muestra la inhibición de la germinación de esporas de *P. expansum* en presencia de diferentes concentraciones de los quitosanos LMW y MMW. La presencia de quitosano tuvo un efecto muy marcado en la germinación de las esporas, donde para concentraciones mayores a 0,025 % la inhibición de la germinación fue del 100 %. A pesar de esto, la observación al microscopio no mostró diferencias morfológicas entre las esporas en ausencia y presencia de los quitosanos. Para la concentración más baja evaluada, 0,001 % no se observaron diferencias significativas entre la germinación del control ($95,5 \pm 0,6$) % y la germinación en presencia del quitosano LMW ($94,5 \pm 3,6$) % o del quitosano MMW ($95,4 \pm 2,8$) %. Para las distintas concentraciones evaluadas no se observaron diferencias significativas en la actividad de los quitosanos.

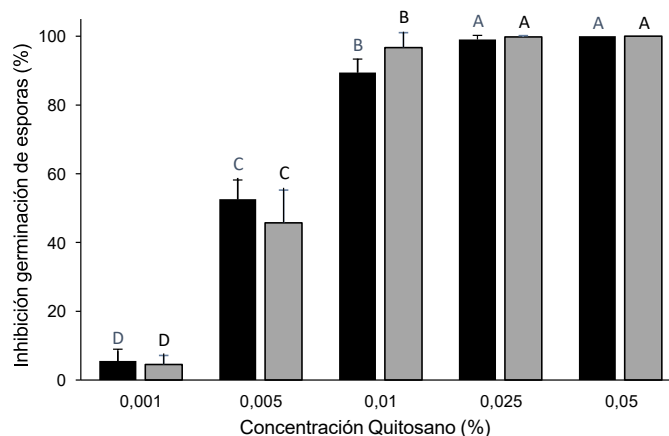


Figura IV.9. Inhibición de la germinación de esporas de *P. expansum* en presencia de los quitosanos LMW (■) y MMW (■). Letras distintas implican diferencias significativas ($p=0,05$). Las barras de error representan el IC.

A partir de los resultados de estos ensayos se decidió continuar trabajando con ambos tipos de quitosano, empleando la concentración de 1 % (m/v). Se continuó evaluando la

formulación para su uso como recubrimiento en fruta y las características de las películas formadas.

IV.4.3. Elaboración de películas de quitosano LMW y MMW

Tomando en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, se prepararon películas a partir de soluciones de quitosano LMW o MMW (1 % m/v) en ácido acético (1 % v/v) con el agregado de glicerol en las concentraciones 0, 5, 10 y 15 % (m/v). El agregado de glicerol no permitió la formación de las películas, obteniéndose una estructura tipo gel. Las películas de quitosano sin agregado de glicerol resultaron ser transparentes, flexibles y homogéneas, no observándose diferencias significativas entre los quitosanos (Figura IV.10). Mediante las microscopías electrónicas de barrido se observó la sección transversal de las películas que mostraron que estas son compactas y uniformes (Figura IV.11)



Figura IV.10. Imagen de las películas de quitosano LMW (izquierda) y MMW (derecha).

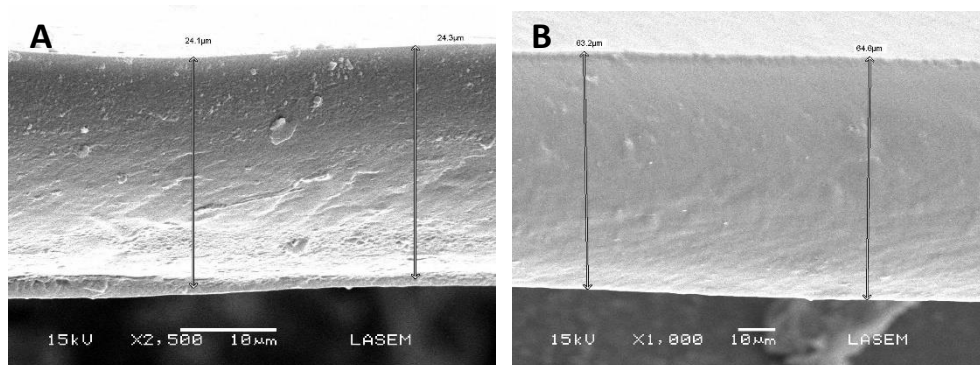


Figura IV.11. Microscopía SEM de películas de quitosano LMW (A) y quitosano MMW (B).

IV.4.4. Evaluación de la mojabilidad de las soluciones de quitosano sobre manzanas Red Delicious

En estos ensayos se estudiaron las propiedades de la superficie de las manzanas Red Delicious con el fin de incrementar la efectividad del recubrimiento con quitosano. En primer lugar, se determinó la tensión superficial de la cáscara de la fruta empleando el método propuesto por Fowkes y la tensión superficial crítica mediante el método de Zisman. Posteriormente se evaluó la mojabilidad de los recubrimientos de quitosano LMW y MMW con el agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80.

IV.4.4.1. Determinación de la tensión superficial de manzanas Red Delicious

Para la determinación de la tensión superficial de las manzanas se emplearon los líquidos de referencia agua, etilenglicol y dimetilsulfóxido. En la Tabla IV.2 se muestran los valores de tensión superficial (γ_L) y las componentes polares (γ_L^p) y dispersas (γ_L^d) tomados de bibliografía. A su vez, se presentan los ángulos de contacto (θ) determinados experimentalmente entre estos líquidos y la superficie de manzanas Red Delicious.

Tabla IV.2. Tensión superficial, componentes polares y dispersas de la tensión superficial y ángulo de contacto entre los líquidos de referencia y la superficie de manzanas Red Delicious.

	γ_L (mN m ⁻¹)	γ_L^p (mN m ⁻¹)	γ_L^d (mN m ⁻¹)	θ (°)
Agua	72,10	52,20	19,90	70,2 ± 2,4
Etilenglicol	47,7	17,6	30,1	42,1 ± 1,7
Dimetilsulfóxido	44,0	8,0	36,0	23,9 ± 1,8

Datos tomados de (Michalski, Desobry, Pons, & Hardy, 1998)

A partir de estos valores se realizó la linealización de la ecuación de Fowkes (Figura IV.12) y se determinaron las componentes polares (γ_S^p) y dispersas (γ_S^d) de la tensión superficial de la manzana.

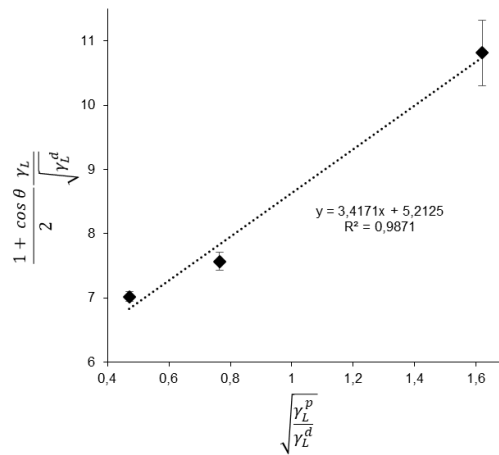


Figura IV.12. Representación gráfica de la ecuación de Fowkes para los líquidos de referencia agua, etilenglicol y dimetilsulfóxido en la superficie de manzanas Red Delicious. Las barras de error representan el IC.

Para la superficie de las manzanas los valores de γ_S^p y γ_S^d fueron de 11,68 mN m⁻¹ y 27,17 mN m⁻¹, respectivamente. Estos dos términos hacen referencia a la contribución en la tensión superficial que tienen las diferentes fuerzas intermoleculares (Owens et al. 1969), lo que verifica que la cáscara de las manzanas Red Delicious se trata de una superficie poco hidrofílica que interacciona con los líquidos principalmente a través de fuerzas de dispersión. La tensión superficial de la manzana, 38,9 mN m⁻¹, se obtiene como la suma de estas dos componentes.

La gráfica de Zisman de $\cos(\theta)$ vs. γ_L y la extrapolación cuando $\theta=0$ fue empleada para determinar la tensión superficial crítica de la manzana (Figura IV.13).

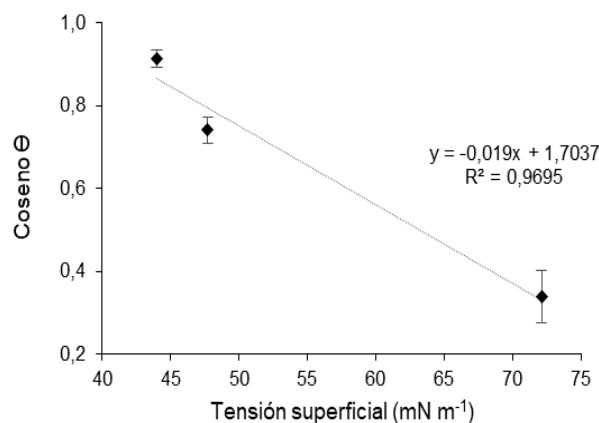


Figura IV.13. Gráfica de Zisman para determinar la tensión superficial crítica de manzanas Red Delicious. Las barras de error representan el IC.

La tensión superficial crítica de las manzanas Red Delicious determinada por el método de Zisman fue de $36,96 \text{ mN m}^{-1}$. Este valor es similar al determinado por el método de Fowkes, lo que verifica que la cáscara de las manzanas Red Delicious se trata de una superficie poco hidrofílica.

IV.4.4.2. Determinación de la tensión superficial de las soluciones de quitosano con el agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80

La tensión superficial de las soluciones de quitosano 1 % en ácido acético (1 %) sin agregado de tensoactivos fueron $(59,0 \pm 0,7) \text{ mN m}^{-1}$ y $(39,4 \pm 0,8) \text{ mN m}^{-1}$ para los quitosanos LMW y MMW, respectivamente. El agregado de los tensoactivos disminuyó significativamente la tensión superficial de las soluciones de quitosano LMW y MMW (Figura IV.14). Para el quitosano LMW, el agregado de los tensoactivos en una concentración 0,01 % provocó una disminución de la tensión superficial de 41 % para el Tween[®] 20 y 44 % para el Tween[®] 80. El efecto en la tensión superficial para ambos tensoactivos fue similar, aunque se obtuvieron tensiones ligeramente inferiores con el Tween[®] 80. A partir de concentraciones superiores a 0,05 % no se observan cambios significativos en la tensión superficial, lo que sugiere que esa concentración se encuentra próxima a la concentración micelar crítica (CMC) de los tensoactivos.

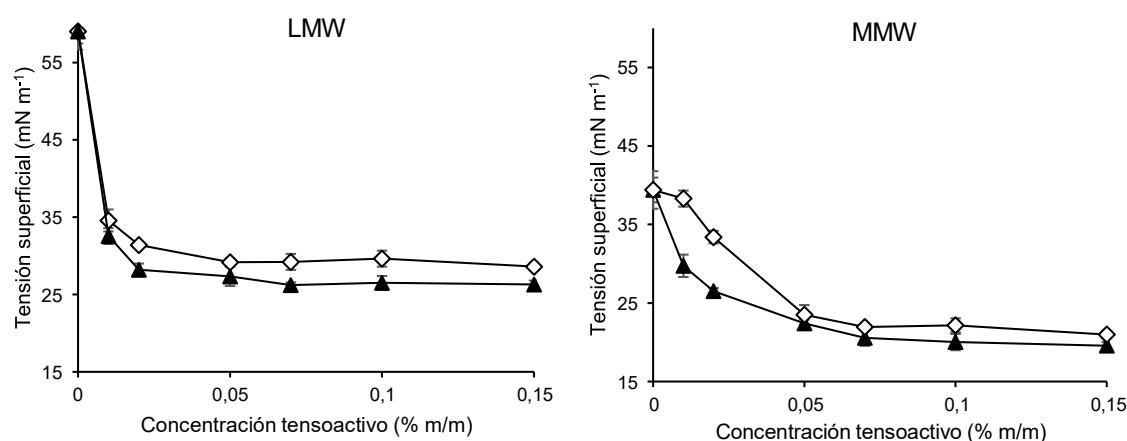


Figura IV.14. Tensión superficial de las soluciones de quitosano LMW y MMW con el agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 (△) y Tween[®] 80 (▲). Las barras de error representan el IC.

Para el quitosano MMW se observaron diferencias significativas entre los tensoactivos. Para una concentración de 0,01 % de Tween[®] 20 la disminución en la tensión superficial fue casi

despreciable (3 %), mientras que con el Tween[®] 80 la disminución fue de 25 %. A partir de la concentración 0,05 % no se observaron diferencias significativas entre ambos tensoactivos, con una CMC en el entorno del 0,07 %.

IV.4.4.3. Determinación de los ángulos de contacto entre las soluciones de quitosano y la superficie de manzanas Red Delicious

El ángulo de contacto de la solución de quitosano LMW y la superficie de la manzana fue de $(71,1 \pm 2,2)^\circ$, mientras que para el quitosano MMW fue de $(70,5 \pm 2,4)^\circ$. Estos ángulos elevados, se deben a las fuertes interacciones entre las moléculas de polímero que llevan a que la tensión superficial de estas soluciones sea elevada y tengan poca capacidad de mojado de la superficie de la fruta. El agregado de los tensoactivos provocó una disminución de los ángulos de contacto entre las soluciones de quitosano y la fruta (Figura IV.15).

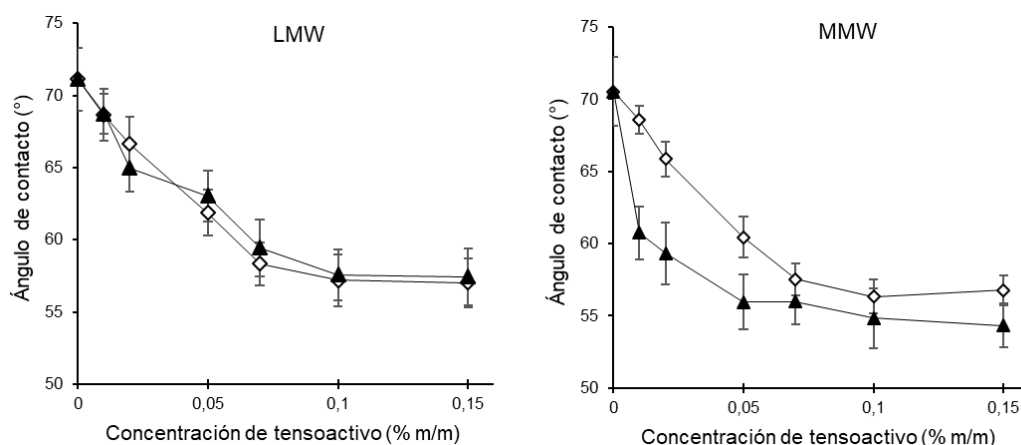


Figura IV.15. Ángulo de contacto de las soluciones de quitosano LMW (**Cuadro A**) y MMW (**Cuadro B**) con el agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 (◇) y Tween[®] 80 (▲) en la superficie de manzanas Red Delicious. Las barras de error representan el IC.

El agregado de los tensoactivos a las soluciones de quitosano LMW mostró un comportamiento similar al observado con la tensión superficial, donde no se observaron diferencias significativas entre los tensoactivos. Para concentraciones mayores a 0,1 % no se observaron variaciones significativas en el ángulo de contacto. Para las soluciones de quitosano MMW se observó que el efecto del agregado de los tensoactivos en el ángulo de contacto fue similar al efecto en la disminución de la tensión superficial, donde el Tween[®] 80 mostró un efecto más marcado.

IV.4.4.4. Determinación de los coeficientes de adhesión, cohesión y dispersión de las soluciones de quitosano sobre la superficie de las manzanas

A partir de la tensión superficial de las soluciones de quitosano (γ_L) y los ángulos de contacto (θ) entre estas soluciones y la superficie de las manzanas Red Delicious se calcularon los coeficientes de adhesión (W_a), cohesión (W_c) y esparcimiento (W_s).

En la Figura IV.16 se muestran estos coeficientes en función de la concentración de los tensoactivos.

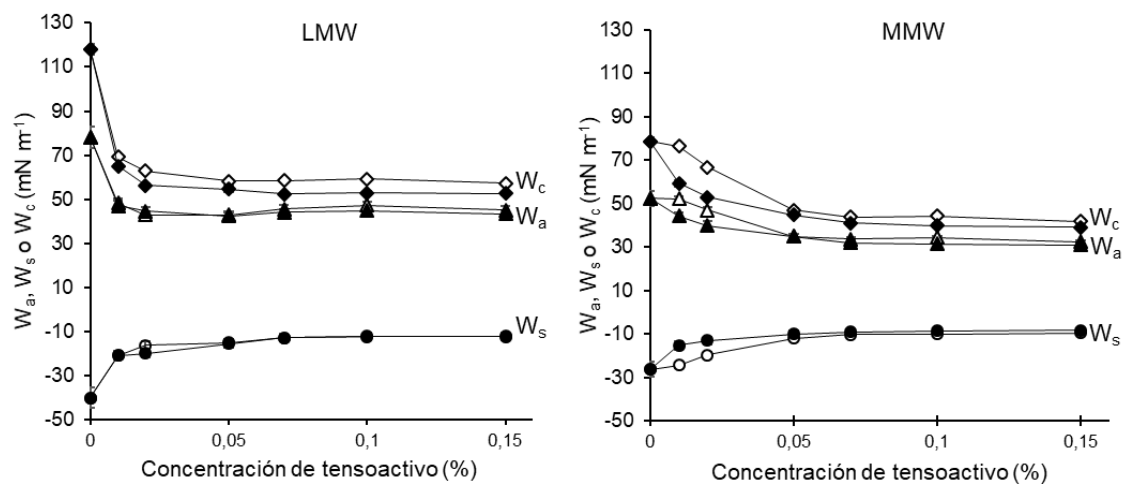


Figura IV.16. Coeficiente de adhesión (W_a), coeficiente de esparcimiento (W_s) y coeficiente de cohesión (W_c) para las soluciones de quitosano con agregado de Tween[®] 20 y Tween[®] 80. (\diamond) W_c con agregado de Tween[®] 20, (\blacklozenge) W_c con agregado de Tween[®] 80, (Δ) W_a con agregado de Tween[®] 20, (\blacktriangle) W_a con agregado de Tween[®] 80, (\circ) W_s con agregado de Tween[®] 20 y (\bullet) W_s con agregado de Tween[®] 80. Las barras de error representan el IC.

El grado de mojado de las soluciones de quitosano está determinado por el balance de fuerzas entre la adhesión y la cohesión : $W_s = W_a - W_c \leq 0$ (Skurtys et al., 2015).

El coeficiente W_s está relacionado con la energía necesaria para que la solución de quitosano se disperse y moje la superficie de la fruta. La afinidad entre la solución de quitosano y la superficie de la manzana aumenta a medida que la diferencia entre las fuerzas de atracción entre estas fases (fuerzas de adhesión, relacionado con W_a) y las fuerzas de atracción entre las moléculas en la solución de quitosano (fuerzas de cohesión, relacionado con W_c) disminuye. Una alta adhesión y una débil cohesión resultan en un aumento del grado de mojado (Skurtys et al., 2015). En la Figura IV.16 se observa que el agregado de los tensoactivos mejora la afinidad entre las fases ya que W_s disminuye (valor menos negativo).

Sin embargo, se observa que el agregado de los tensoactivos provoca una disminución en W_a y W_c . La disminución en W_c favorece el proceso de mojado, pero podría afectar la cohesión de las moléculas de quitosano y generar rupturas o pérdidas de integridad del recubrimiento. La disminución en W_a no favorece el mojado y podría afectar negativamente la adherencia del recubrimiento de quitosano en la fruta. Esto significa que el óptimo no es necesariamente determinado por el menor valor de W_s , sino que hay que tener en cuenta el efecto en los tres coeficientes. En las gráficas se puede observar que el valor de W_s disminuye (valor menos negativo) hasta una concentración aproximadamente 0,02 % en los diferentes sistemas. Para esta concentración el agregado de los tensoactivos a las soluciones de quitosano LMW llevó a un cambio de W_s de $-39,997 \text{ mN m}^{-1}$ a $-19,981 \text{ mN m}^{-1}$ con Tween[®] 20 y a $-16,295 \text{ mN m}^{-1}$ con el agregado de Tween[®] 80. Para el quitosano MMW el cambio en W_s fue de $-26,325 \text{ mN m}^{-1}$ a $-19,745$ y $-13,024 \text{ mN m}^{-1}$ con el agregado de 0,02 % de Tween[®] 20 y Tween[®] 80, respectivamente (Tabla IV.3). Para concentraciones mayores el efecto del tensoactivo en la disminución de W_s no es tan marcado.

Tomando en cuenta esto, se eligió una concentración de 0,02 % que permite una disminución importante del W_s , pero sin afectar considerablemente los valores de W_a y W_c . Para el quitosano LMW con el agregado de 0,02 % de tensoactivos, no se observaron diferencias significativas entre los tensoactivos. Sin embargo, para el quitosano MMW se observó que el agregado de 0,02 % de Tween[®] 80 afectaba en mayor medida los coeficientes W_a , W_c y W_s que la misma concentración de Tween[®] 20.

A partir de estos resultados se decidió elaborar y caracterizar las películas de quitosanos LMW o MMW con el agregado de los tensoactivos con el fin de seleccionar el tipo de quitosano y tensoactivo a ser empleado en los ensayos posteriores en fruta.

Tabla IV.3. Valores de tensión superficial, θ , W_a , W_c y W_s para los quitosanos LMW y MMW con agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80.

Quitosano	Tensoactivo	Concentración (%)	Tensión superficial (mN m ⁻¹)	Θ (°)	W_a (mN m ⁻¹)	W_c (mN m ⁻¹)	W_s (mN m ⁻¹)
LMW	Sin tensoactivo	-	59,05	71,11	78,103	118,10	-39,997
		0,01	34,58	68,65	48,272	69,16	-20,888
		0,02	31,40	66,63	42,816	62,80	-19,981
		0,05	29,18	61,88	42,904	58,36	-15,456
		0,07	29,22	55,66	45,659	58,44	-12,781
		0,10	29,64	53,44	47,258	59,28	-12,022
		0,15	28,62	54,96	45,009	57,24	-12,231
	Tween [®] 20	0,01	34,58	68,74	44,341	65,12	-20,779
		0,02	31,40	64,96	40,105	56,40	-16,295
		0,05	29,18	63,03	39,717	54,68	-14,963
		0,07	29,22	59,43	39,535	52,44	-12,904
		0,10	29,64	57,47	40,680	53,00	-12,320
		0,15	28,22	57,42	40,432	52,60	-12,168
		MMW	Sin tensoactivo	-	39,40	70,53	52,475
0,01	38,30			68,57	52,284	76,60	-24,316
0,02	33,40			65,84	47,055	66,80	-19,745
0,05	23,50			60,44	35,076	47,00	-11,924
0,07	21,96			57,54	33,737	43,92	-10,183
0,10	22,16			56,33	34,435	44,32	-9,885
0,15	20,98			56,75	32,473	41,96	-9,486
Tween [®] 80	0,01		29,74	60,74	44,243	59,48	-15,237
	0,02		26,50	59,32	39,976	53,00	-13,024
	0,05		22,42	55,94	34,944	44,84	-9,896
	0,07		20,58	55,98	32,075	41,16	-9,085
	0,10		20,02	54,84	31,516	40,04	-8,524
	0,15		19,56	54,33	30,948	39,12	-8,172

IV.4.5. Caracterización de las películas de quitosano

IV.4.5.1. Películas con agregado de los tensoactivos

Se prepararon películas de los quitosanos LMW y MMW al 1 % en ácido acético con el agregado de 0,02 % de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80. Las películas con tensoactivos mostraron apariencia similar a las obtenidas sin el agregado de estos.

La opacidad de las diferentes películas fueron muy bajas (Tabla IV.4), lo que se correlaciona con la alta transparencia observada en las películas. No se observaron diferencias

significativas en la opacidad de las películas de quitosanos LMW o MMW ni con el agregado de los tensoactivos.

Tabla IV.4. Opacidad de las películas de quitosano LMW y MMW.

	Opacidad
LMW	0,93 ± 0,14 a
LMW + Tween® 20 0,02 %	1,02 ± 0,29 a
LMW + Tween® 80 0,02 %	1,12 ± 0,21 a
MMW	0,95 ± 0,12 a
MMW + Tween® 20 0,02 %	1,05 ± 0,14 a
MMW + Tween® 20 0,02 %	0,99 ± 0,13 a

IV.4.5.2. Solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua

La permeabilidad y adsorción de agua y la solubilidad son propiedades de las películas que están relacionadas con la capacidad de difusión de las moléculas de agua a través de la matriz del polímero. En el ensayo de solubilidad no se observó que las películas perdieran integridad luego de estar sumergidas en agua durante 24 h a 25 °C. Todas las películas mostraron baja solubilidad en agua, que se encontró en el entorno del 13-14 % en base seca. La solubilidad de las películas con y sin agregado de tensoactivos no fueron significativamente diferentes (Tabla IV.5).

Tabla IV.5. Solubilidad y permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas de quitosano LMW y MMW.

	Solubilidad (%)	PVA × 10 ⁹ g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹
LMW	14,5 ± 0,5 a	2,49 ± 0,13 a
LMW + Tween® 20 0,02 %	14,1 ± 1,1 a	2,60 ± 0,20 a
LMW + Tween® 80 0,02 %	13,8 ± 1,1 a	2,55 ± 0,10 a
MMW	13,3 ± 1,1 a	1,01 ± 0,17 b
MMW + Tween® 20 0,02 %	13,9 ± 0,4 a	1,12 ± 0,27 b
MMW + Tween® 20 0,02 %	13,1 ± 1,9 a	1,09 ± 0,19 b

Valores con la misma letra en una misma columna no son significativamente diferentes (p>0,05).

La PVA de las películas de quitosano se calculó a partir de la pendiente de los gráficos de pérdida de masa de las celdas en función del tiempo, los cuales presentaron coeficientes de correlación (r²) mayores a 0,995. Los resultados muestran que la permeabilidad al vapor de agua de las películas se vio afectada por el peso molecular del quitosano, donde el quitosano

LMW mostró una PVA mayor que el quitosano MMW. El agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 o Tween[®] 80 parecería aumentar ligeramente la PVA, aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa.

IV.4.5.3. Isotermas de adsorción de agua

Las isotermas de adsorción de agua de las películas de quitosano se determinaron en sistemas con humedad relativa controlada (a_w entre 0,1 y 0,91) usando soluciones saturadas de diferentes sales. Estas isotermas mostraron que a bajas a_w (0,1-0,75) el contenido de humedad de las películas fue bajo (entre 2,5 y 10 %), mientras que al aumentar la actividad de agua ($a_w > 0,8$) la pendiente del gráfico aumenta rápidamente (Figura IV.17).

Para la $a_w=0,91$ el contenido de humedad de las películas de quitosano LMW fue de $(43,1 \pm 2,8)$ %, mientras que para el quitosano MMW fue de $(32,1 \pm 2,4)$ %.

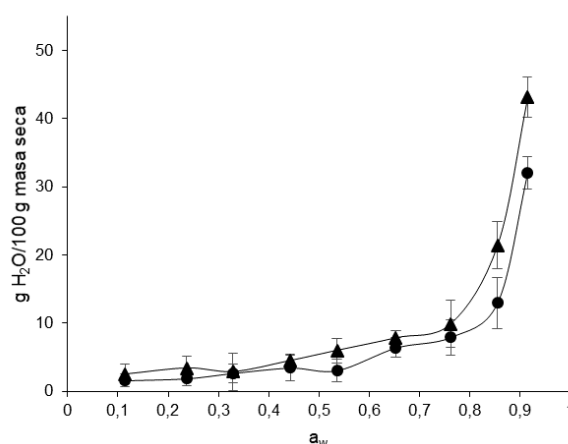


Figura IV.17. Isotermas de adsorción de agua para los quitosano LMW (▲) y MMW (●) expresados como masa de agua cada 100 g de película seca en función de la actividad de agua (a_w). Las barras de error representan el IC.

En las películas con agregado de los tensoactivos no se observó un cambio significativo en el contenido de humedad (Figura IV.18).

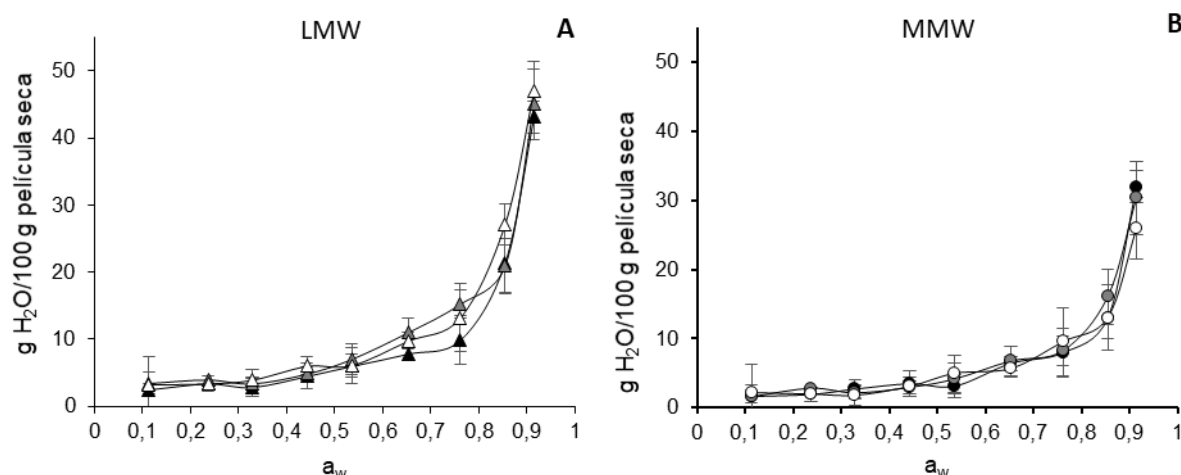


Figura IV.18. Cuadro A. Isotermas de adsorción de agua para las películas de quitosano LMW (\blacktriangle) con el agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 (Δ) y Tween[®] 80 (\blacktriangle). **Cuadro B.** Isotermas de adsorción de agua para las películas de quitosano MMW (\bullet) con el agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 (\circ) y Tween[®] 80 (\bullet). Las barras de error representan el IC.

Los datos experimentales fueron ajustados al modelo de isothermas GAB en todo el rango de a_w . Los valores de las constantes del modelo matemático GAB (w_0 , C y k), el coeficiente de correlación (r^2) y el error cuadrático medio (ECM) para las películas de quitosano LMW y MMW con agregado de los tensoactivos se muestran en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Estimación de los parámetros de las isothermas de adsorción de agua de las películas de quitosano LMW y MMW usando el modelo de isothermas GAB.

Película	w_0^*	C	k	S_0 ($m^2 g^{-1}$)	r^2	ECM (%)
LMW	2,5378	47,4418	1,0307	88,82	0,9972	3,8567
LMW + Tween [®] 20 0,02 %	3,0927	42,9110	1,0331	108,25	0,9882	5,3558
LMW + Tween [®] 80 0,02 %	3,0607	49,9402	1,0329	107,12	0,9889	0,7678
MMW	1,9241	21,9061	1,0274	61,70	0,9900	8,9734
MMW + Tween [®] 20 0,02 %	1,9027	18,3032	1,0398	66,60	0,9802	0,6953
MMW + Tween [®] 80 0,02 %	1,9345	27,2990	1,0387	66,71	0,9902	3,8657

*g de agua cada 100 g de película seca

El ajuste de los datos experimentales al modelo GAB fue bueno tomando en cuenta el r^2 entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo y el ECM que fue inferior al 10 % en todos los casos. El ECM (%) ha sido ampliamente adoptado en la literatura para evaluar la bondad de ajuste de modelos de adsorción, donde un valor por debajo de 10 % indica un buen ajuste para aplicaciones prácticas (Slavutsky & Bertuzzi,

2015b). Esto indica que el modelo GAB puede ser empleado para predecir el contenido de humedad de las películas en el rango de a_w de 0,1 a 0,9.

El modelo GAB se basa en una adsorción de agua en multicapas con un significado físico para cada constante (Quyen et al., 2012). El valor de w_0 de las películas estuvo en el rango de 1,90 a 3,10 gramos de agua por cada 100 gramos de película seca, siendo los valores de las películas con quitosano LMW mayores que para el quitosano MMW. El valor w_0 indica la máxima cantidad de agua que puede ser adsorbida en una única capa por cada 100 gramos de película seca y es una medida del número de sitios de adsorción. A partir de este valor se determinó la superficie específica de las diferentes películas (S_0) que se encontraron en el rango de 61 a 108 $m^2 g^{-1}$ (Tabla IV.6). Las películas de quitosano LMW mostraron áreas específicas mayores que las de quitosano MMW.

Los parámetros C y k del modelo de GAB se relacionan con el calor de sorción de la monocapa y con la diferencia de magnitud de este calor entre las diferentes capas de agua y la monocapa. Para las películas de quitosano LMW el parámetro C fue mayor que para las películas con quitosano MMW, mientras que el parámetro k fue similar para todas las películas.

IV.4.5.4. Análisis térmico

La estabilidad térmica de las películas de quitosano LMW y MMW fue estudiada mediante TGA bajo atmósfera de nitrógeno y aire (Figura IV.19). En el proceso en atmósfera de nitrógeno ocurre una degradación no oxidativa, mientras que en atmósfera de aire ocurre una degradación oxidativa de las muestras.

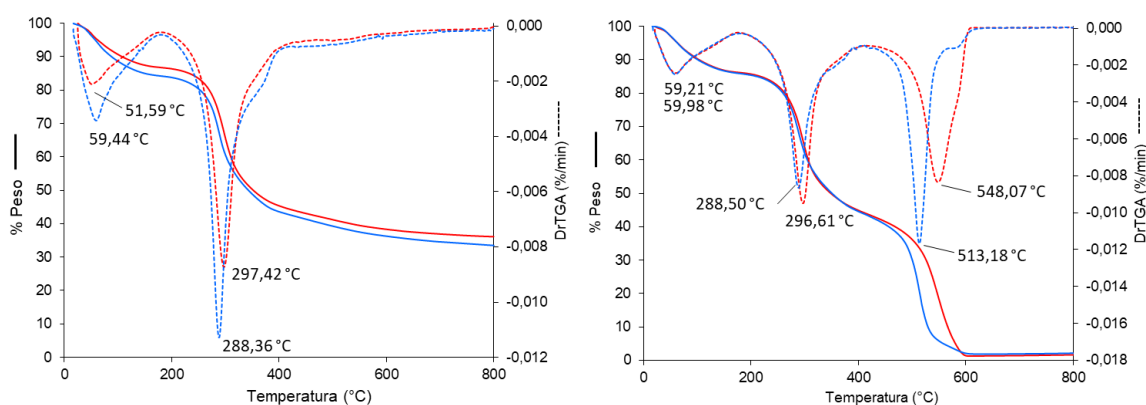


Figura IV.19. Termogramas en atmósfera de N_2 (**Cuadro A**) y atmósfera de aire (**Cuadro B**) de películas de quitosano LMW 1 % (■) y películas de quitosano MMW al 1 % (■).

En atmósfera de N₂ (**Cuadro A**) se observa que ambos quitosanos tienen un comportamiento térmico similar, con dos procesos de pérdida de masa importante. La pérdida de masa inicial, entre 40 y 150 °C presenta un pico asimétrico hacia el lado de temperaturas superiores y una velocidad máxima de pérdida de masa en el entorno de 50-60 °C. Esta pérdida de masa, correspondiente a un 13-16 % del peso inicial, se debe a la desorción de agua físicamente adsorbida y agua unida mediante puentes de hidrógeno a las moléculas de quitosano (Moussout et al., 2016). La segunda pérdida de masa observada, entre 42-45 % del peso, comienza por encima de los 200 °C y continua hasta los 400 °C con picos de velocidad máxima entre 288 y 298 °C. Esta pérdida de masa se puede relacionar con la desacetilación y descomposición de la cadena polimérica a través de la ruptura de los enlaces glucosídicos (Guinesi & Cavalheiro, 2006; Moussout et al., 2016; Zawadzki & Kaczmarek, 2010). Al final del proceso de calentamiento (800 °C) se obtiene un residuo de 25-35 %.

En los termogramas en atmósfera de aire se observa a su vez, un tercer proceso de degradación, entre 400 y 600 °C. Esta pérdida de masa se debe al efecto oxidante de la atmósfera de aire llevando a la ruptura del anillo de piranosa con la formación de productos de degradación volátiles en el entorno de los 600 °C (Martínez-Camacho et al., 2010; Moussout et al., 2016; Zawadzki & Kaczmarek, 2010). Se puede observar que para el quitosano MMW la velocidad máxima de pérdida de masa ocurre a una temperatura inferior que para el quitosano LMW, demostrando esto una menor estabilidad térmica. Al final del proceso de calentamiento se obtuvo un residuo de entre 1 y 3,5 %.

En la Figura IV.20 se muestran los termogramas en atmósfera de N₂ y aire para las películas de quitosano MMW 1 % y LMW 1 % con el agregado de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80 en la concentración 0,02 %. En los termogramas en N₂ se pueden observar los mismos procesos de degradación descritos anteriormente con pequeñas diferencias en la temperatura máxima de pérdida de agua en las películas con tensoactivos. Este comportamiento se observó para el quitosano MMW. Con respecto al segundo proceso de degradación no se observó que la presencia de los tensoactivos afectara significativamente. En los termogramas en aire, al igual que lo observado en los termogramas en N₂, el agregado de los tensoactivos modificó la temperatura máxima de pérdida de agua y no afectó al segundo proceso de degradación. Con respecto a la descomposición final del polímero, se puede observar que la presencia de los tensoactivos modificó la temperatura de máxima

velocidad para dicho proceso. Estos cambios se pueden asociar con modificaciones en la afinidad por el agua, así como con cambios en la estabilidad térmica de las películas por la presencia de los tensoactivos.

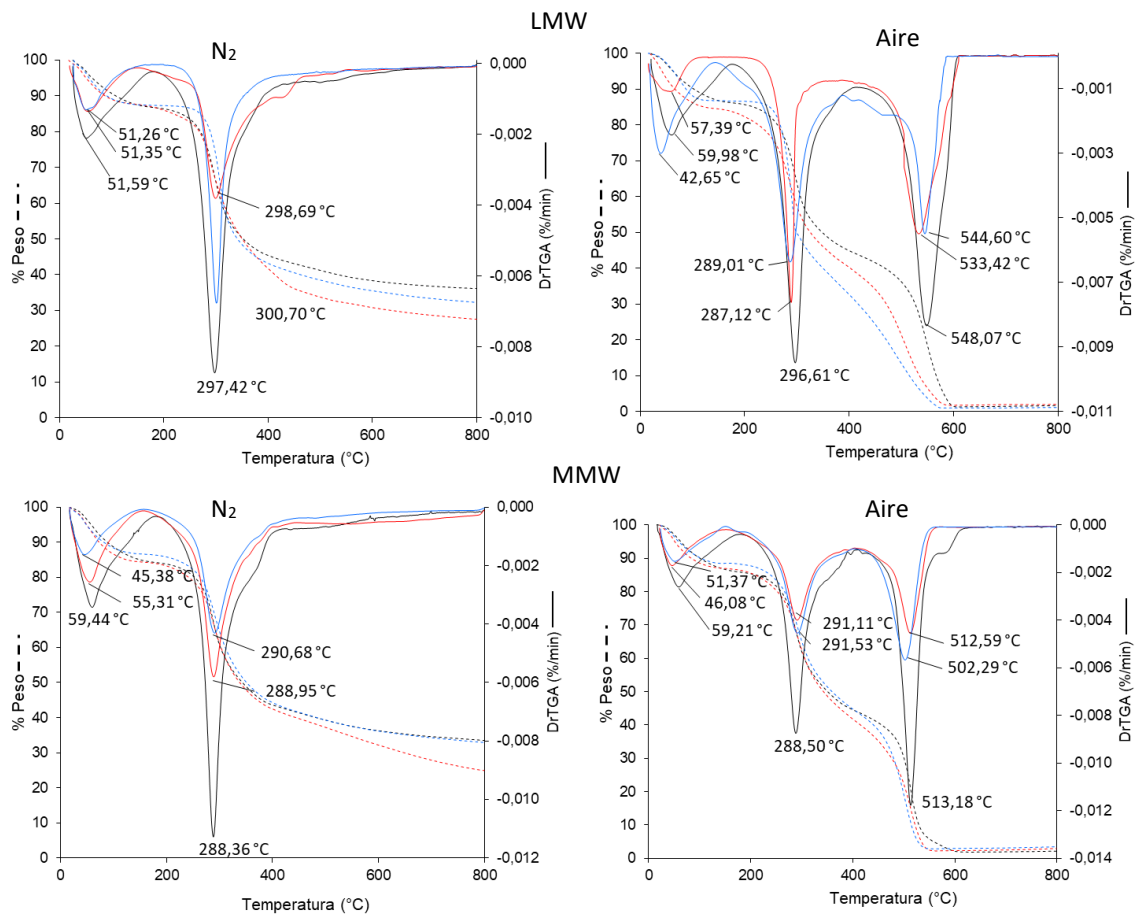


Figura IV.20. Termogramas en atmósfera de N₂ y atmósfera de aire para películas de quitosano LMW y MMW (■) con agregado de los tensoactivos Tween® 20 (■) y Tween® 80 (■) en la concentración 0,02 %.

IV.4.6. Selección final del tipo de quitosano y tensoactivo

Teniendo en cuenta los resultados de todos los ensayos anteriormente presentados se decidió seleccionar el quitosano MMW. Este quitosano mostró mayor capacidad de inhibición del crecimiento micelial de *P. expansum* e igual capacidad de inhibir la germinación de esporas que el quitosano LMW. A su vez, las películas de quitosano MMW mostraron menor permeabilidad al vapor de agua y menor capacidad de adsorción de agua. Con respecto al tensoactivo, se seleccionó el Tween® 80 ya que este tuvo mayor impacto en la disminución de la tensión superficial y en el coeficiente de esparcimiento W_s en la superficie de las manzanas Red Delicious.

IV.4.7. Efecto de la aplicación de quitosano MMW con el agregado de 0,02 % de Tween® 80 en la calidad de manzanas Red Delicious

En la Tabla IV.7 se muestran los valores de sólidos solubles totales (SST), pH, acidez, pérdida de masa y firmeza de las frutas con y sin tratamiento con quitosano luego de 4 meses de almacenamiento en cámara fría a (0 ± 1) °C.

Tabla IV.7. pH, sólidos solubles, acidez titulable, firmeza y pérdida de peso manzanas Red Delicious.

Tratamiento	SST (° Brix)	pH	Acidez titulable (%)	Pérdida de masa (%)	Firmeza (kgf)
Inicio almacenamiento	12,8 ± 0,2 a	3,88 ± 0,05 a	0,252 ± 0,008 a	-	9,3 ± 0,2 a
Control final almacenamiento	12,9 ± 0,3 a	3,84 ± 0,06 a	0,145 ± 0,007 c	3,1 ± 0,2 a	5,6 ± 0,2 c
MMW final almacenamiento	13,2 ± 0,3 a	3,80 ± 0,05 a	0,214 ± 0,011 b	1,6 ± 0,1 b	7,5 ± 0,3 b

Valores en la misma columna y con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

En este ensayo se observó que ni el contenido de sólidos solubles ni el pH se vieron afectados durante el almacenamiento o por el tratamiento con quitosano. Por otro lado, se observó una disminución en la acidez y la firmeza de todas las frutas durante el almacenamiento. Estos resultados son esperables debido a los cambios químicos ocurridos durante el proceso de maduración y senescencia de las frutas. Sin embargo, estos cambios fueron significativamente menores en las manzanas tratadas con quitosano que en las manzanas control. En las frutas control se observó una disminución de la firmeza de alrededor del 40 % mientras que en las frutas recubiertas con quitosano la firmeza disminuyó aproximadamente un 20 %. Resultados similares se encontró con respecto a la pérdida de humedad, donde las frutas recubiertas con quitosano perdieron aproximadamente un 50 % menos de masa. Estas pérdidas de masa son causadas por los procesos de respiración y transpiración.

En la Tabla IV.8 se muestran las coordenadas L*, a* y b* del color de fondo y sobrecolor de las manzanas tratadas con quitosano y las manzanas control al inicio y luego de 4 meses de almacenamiento en cámara fría. El recubrimiento con quitosano no afectó el color inicial de las manzanas ya que no se observaron diferencias significativas entre las frutas al inicio del ensayo.

Tabla IV.8. Color de fondo, sobrecolor y ΔE de manzanas Red Delicious tratadas con quitosano MMW 1 % y Tween 80 0,02 % y almacenadas en cámara fría durante 4 meses.

Tiempo	Control		Tratamiento con quitosano		
	Inicio	Final	Inicio	Final	
Color de fondo	L*	56,5 ± 1,9 a	58,2 ± 1,7 a	56,2 ± 2,3 a	57,3 ± 2,2 a
	a*	7,0 ± 3,1 a	9,0 ± 2,8 a	7,0 ± 2,5 a	8,2 ± 2,2 a
	b*	34,0 ± 1,9 ab	37,3 ± 1,7 b	32,8 ± 1,8 a	36,0 ± 1,9 ab
	ΔE	-	5,1 ± 0,4 b	-	4,2 ± 0,4 a
Sobrecolor	L*	35,3 ± 1,8 a	36,2 ± 1,9 a	34,1 ± 1,9 a	34,2 ± 2,1 a
	a*	25,2 ± 1,7 a	27,9 ± 1,8 a	23,7 ± 1,2 a	25,7 ± 1,3 a
	b*	16,9 ± 1,7 ab	18,9 ± 1,8 b	15,3 ± 1,8 a	16,4 ± 2,0 ab
	ΔE	-	4,1 ± 0,4	-	3,0 ± 0,4

Valores en la misma fila con la misma letra no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

No se observaron cambios significativos en la luminosidad (L^*) o el parámetro a^* durante el período de almacenamiento, pero si en el parámetro b^* del color de fondo y sobrecolor. Cuando se evaluó el cambio total de color (ΔE), se observó que en las frutas control el cambio de color fue estadísticamente mayor que en las frutas tratadas con quitosano. Sin embargo, es factible que las variaciones observadas entre las manzanas tratadas con quitosano y las manzanas control se encuentren dentro del orden de la variabilidad existente en el color de las frutas (Figura IV.12).

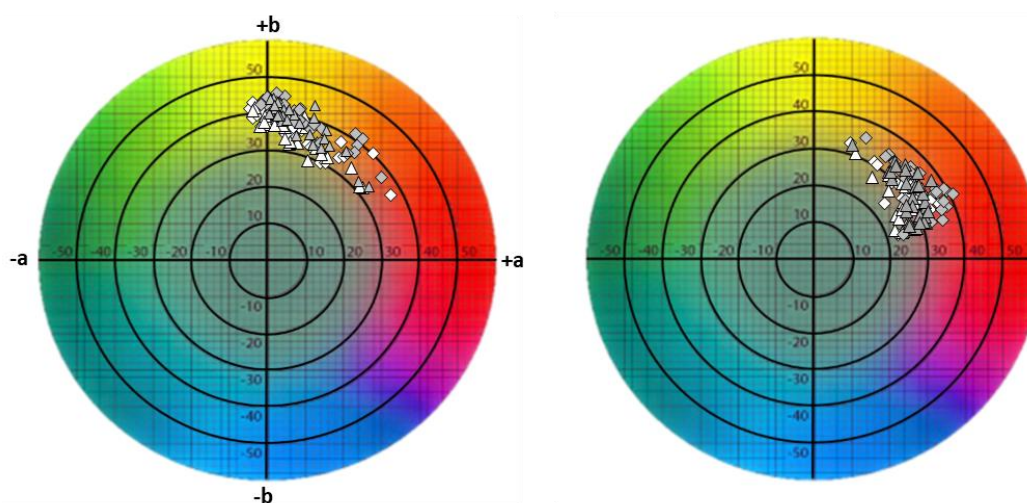


Figura IV.21. Coordenadas a^* y b^* para el color de fondo (A) y sobre color (B) de las manzanas Red Delicious tratadas con quitosano al inicio (Δ) y final (\blacktriangle) del período de almacenamiento y en las manzanas control al inicio (\diamond) y final (\blacklozenge) del período de almacenamiento.

IV.4.8. Evaluación de la actividad antifúngica en manzanas Red Delicios de quitosano MMW y su combinación con la levadura F9D

Las heridas tratadas con quitosano MMW en la concentración 1 % mostraron una incidencia de la enfermedad significativamente menor que en las frutas control (heridas inoculadas con agua) (Figura IV.22).

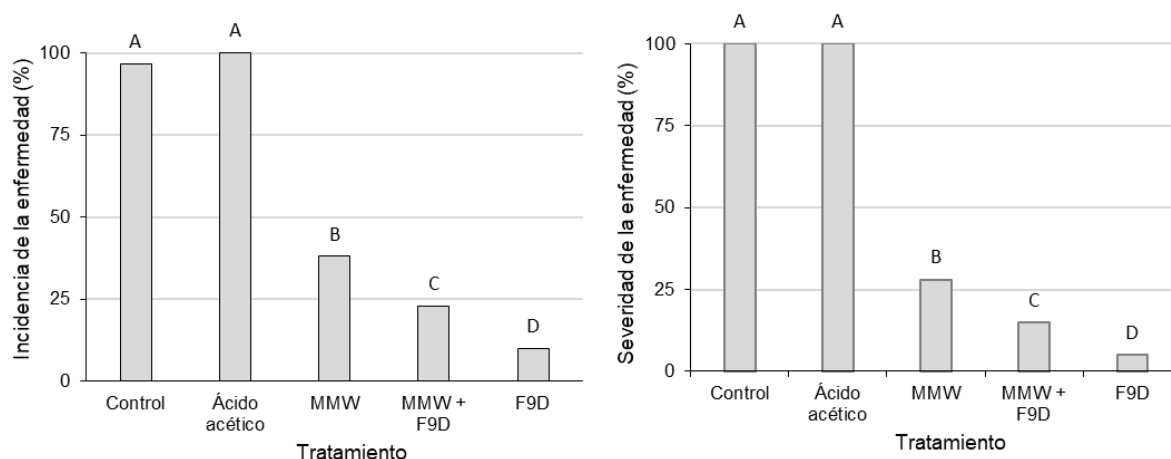


Figura IV.22. Incidencia (A) y severidad (B) de la enfermedad causada por *Penicillium expansum* en manzanas Red Delicious tratadas con quitosano (MMW), con la levadura (F9D) y con una combinación de quitosano y F9D (MMW + F9D). Se emplearon como control heridas inoculadas con agua o ácido acético 1 %. Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes.

Las manzanas control mostraron una incidencia y severidad de la enfermedad similar a las frutas tratadas con ácido acético al 1 %. Esto demuestra que el ácido acético empleado para la preparación de las soluciones de quitosano no tiene efecto en el control del crecimiento de *P. expansum*. Las manzanas inoculadas con la levadura F9D mostraron una incidencia de la enfermedad de 10 %, mientras que cuando se inoculó la levadura en conjunto con el quitosano la incidencia de la enfermedad fue del 23 %.

Cuando se cuantificó la cantidad de levadura al finalizar el ensayo se observó que en las manzanas inoculadas únicamente con la levadura la concentración fue de $(2,8 \pm 0,7) \times 10^6$ células por herida mientras que en las heridas inoculadas con la levadura en presencia del quitosano la concentración fue de $(6,1 \pm 1,2) \times 10^5$ células por herida.

IV.5. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó el efecto de dos quitosanos de peso molecular bajo (LMW, 139 kDa) y peso molecular medio (MMW, 214 kDa) en la actividad antifúngica contra *P. expansum* y su capacidad de mantener la calidad de manzanas Red Delicious durante el almacenamiento poscosecha en frío.

En los ensayos realizados en medio PDA incorporado con diferentes concentraciones de los quitosanos LMW y MMW se comprobó la actividad inhibitoria del crecimiento micelial de *P. expansum*. Para la concentración de 0,25 % se lograron inhibiciones del entorno del 15 % no observándose diferencias significativas entre los quitosanos. A medida que la concentración aumentó, se observó un incremento en la inhibición, donde el quitosano MMW mostró mayor actividad. En los ensayos en medio líquido donde se pusieron en contacto las esporas del hongo con el medio PDB adicionado con quitosano, se observó que ambos quitosanos afectaron fuertemente la germinación de esporas de *P. expansum*. El tratamiento con quitosano no provocó morfología anormal de las esporas como otros autores han reportado (De Oliveira et al., 2012). Sin embargo, a concentraciones muy bajas (0,05 %) la inhibición de la germinación de las esporas fue total. El efecto de los quitosanos fue más notorio en la germinación de las esporas que en la inhibición del crecimiento micelial. Esto se puede relacionar con el mayor contacto entre el polímero y el hongo en medio líquido que en medio sólido donde el quitosano debe difundir a través del agar. Diferentes investigaciones con respecto a la actividad antimicrobiana del quitosano han reportado resultados contradictorios. Hernández-Lauzardo et al. (2012) reportaron que quitosano de bajo peso molecular fue más efectivo contra el crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* mientras que quitosano de alto peso molecular fue más efectivo contra la germinación de esporas de este patógeno. En un estudio reciente, Rahman et al. (2015) demostraron que el oligoquitosano fue óptimo para la inhibición de la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* y *Mucor piriformis*, mientras que el incremento del peso molecular disminuyó la actividad antifúngica. Ziani et al. (2009) evaluaron quitosanos de peso molecular bajo y alto contra los patógenos *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* y *Rhizopus oryzae*. En estos ensayos se observó que la inhibición era dependiente de la especie de hongo, pero no del peso molecular del quitosano.

Los resultados de diferentes autores indican que el mecanismo de acción del quitosano es ampliamente dependiente del tipo de microorganismo y de diferentes factores como la forma de obtención del quitosano, peso molecular, grado de desacetilación, pH, entre otros (Kong, Guan Chen, Xing, & Jin Park, 2010; S. C. Park, Nah, & Park, 2011; Verlee et al., 2017). Debido a estos diferentes factores, es difícil comprender el mecanismo detrás de la actividad antimicrobiana del quitosano. Se cree que la interacción electrostática entre las cargas positivas de los grupos amino protonados del quitosano y las cargas negativas de los fosfolípidos presentes en la membrana celular es la principal responsable de la actividad antimicrobiana del quitosano (Verlee et al., 2017). Esta interacción entre el quitosano y la superficie celular provocaría una alteración en la membrana, permitiendo que el quitosano sea capaz de entrar a la célula donde puede llevar a la inhibición de la síntesis de ADN y ARN (Hernández-Lauzardo et al., 2012; Palma-Guerrero et al., 2010). En algunos hongos, el quitosano es incapaz de perturbar la membrana celular y esto se ha relacionado con la presencia de ciertos ácidos grasos y fluidez de la membrana característica de diferentes tipos de hongos (Palma-Guerrero et al., 2010). Diferentes estudios han sugerido que el grado de desacetilación resultó en un incremento en la actividad antifúngica. Sin embargo, al igual que con el peso molecular, el grado de desacetilación y la actividad antimicrobiana del quitosano depende del tipo de hongo (Hongpattarakere y Riyaphan, 2008). Younes et al. (2014) reportaron que el peso molecular del quitosano tuvo un efecto más pronunciado en el control de *Fusarium oxysporum*, mientras que el grado de desacetilación fue más importante para la actividad antimicrobiana contra *Alternaria solani*. A su vez, la actividad antimicrobiana de *Aspergillus niger* no se vio afectada por el peso molecular o el grado de desacetilación.

Tomando en cuenta los resultados de los ensayos de inhibición *in vitro*, se decidió trabajar con la concentración 1 % que fue la que mostró mayor capacidad de inhibición del crecimiento micelial y continuar estudiando las propiedades de ambos quitosanos para la formación de películas. Las propiedades policatiónicas del polímero de quitosano le brindan la capacidad de formar películas y geles. Esto puede ser logrado mediante la evaporación del solvente, creando enlaces hidrofílicos, puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas entre las cadenas del polímero (Butler et al., 1996). Las películas de quitosano LMW o MMW 1 % con el agregado de glicerol fueron obtenidas mediante esta técnica. Varios autores han reportado el empleo de glicerol como agente plastificante, ya que es capaz de

mejorar las propiedades mecánicas de las películas formadas con quitosano (Cissé et al., 2012; Darbasi et al., 2017; Ziani et al., 2008). En nuestros estudios la incorporación de glicerol a las soluciones de quitosano llevó a que se formara una estructura tipo gel y no una película. Esto puede explicarse porque los plastificantes actúan como lubricantes internos debilitando los enlaces intra e intermoleculares, incrementando la movilidad y espaciado de las cadenas de biopolímero (Park et al., 2002). El efecto ocasionado por el glicerol se debe a su naturaleza hidrofílica que mediante los grupos hidroxilos ayuda a retener agua en la matriz del polímero formando un gel (Santacruz et al., 2015). Las películas obtenidas sin el agregado de glicerol fueron homogéneas, transparentes y flexibles demostrando que el quitosano es un buen material para la formación de matrices poliméricas. Resultados similares fueron obtenidos por Leceta et al. (2013) y Ziani et al. (2008), donde se obtuvieron películas con características adecuadas sin la incorporación de plastificantes. A su vez, se ha reportado que películas con agregado de glicerol mostraron un aumento de la permeabilidad al vapor de agua, mayor solubilidad, mayor adsorción de agua y menor capacidad de mojado (Santacruz et al., 2015; Skurtys et al., 2015). Por lo tanto, la ausencia de quitosano en la formulación de la película resulta muy beneficioso, no solo porque simplifica la formulación sino porque evita su efecto en las propiedades de las películas.

En función de estos resultados, se decidió evaluar la mojabilidad de las soluciones de quitosanos LMW y MMW en la concentración 1 % sin agregado de glicerol y con la incorporación de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80 sobre manzanas Red Delicious. En primer lugar se determinó la tensión superficial de la cáscara de las manzanas Red Delicious y posteriormente se evaluó la mojabilidad de los recubrimientos de quitosano LMW y MMW con el agregado de los tensoactivos. La tensión superficial de las manzanas Red Delicious fue de 38,9 mN m⁻¹ y 36,96 mN m⁻¹ obtenidas por el método de Fowkes y Zisman respectivamente. Este resultado menor a 100 mN m⁻¹ sugiere que la cáscara de la manzana es una superficie de baja energía y que interactúa con los líquidos principalmente a través de fuerzas de dispersión (Zisman, 1964). Velásquez et al. (2011) reportaron un valor de 39,7 mN m⁻¹ para manzanas Granny Smith y Carneiro-da-Cunha et al. (2009) reportaron valores de tensión superficial crítica y tensión superficial de manzanas Golden de 25,4 y 27,81 mN m⁻¹, respectivamente. Choi et al. (2002) reportaron un valor inferior de tensión superficial crítica de manzanas Fuji de 18,7 mN m⁻¹. Un comportamiento similar se ha observado en otras frutas cuyos valores de tensión superficial fueron 23 mN m⁻¹ en pomelo,

23 mN m⁻¹ en naranjas (Hagenmaier & Baker, 1993), 18,8 mN m⁻¹ en frutillas (Ribeiro et al., 2007) y 26,8 mN m⁻¹ en arándanos (Skurtys et al., 2015). El método de Fowkes a su vez, permitió conocer las componentes polares (γ_S^p) y dispersas (γ_S^d) de la tensión superficial de las manzanas, los cuales fueron de 11,68 mN m⁻¹ y 27,17 mN m⁻¹, respectivamente. Estos dos términos hacen referencia a la contribución en la tensión superficial que tienen las diferentes fuerzas intermoleculares (Owens et al. 1969). La cáscara de la manzana mostró un carácter apolar y menor componente polar, lo que verifica la naturaleza poco hidrofílica de la cáscara de la fruta, donde interacciona con los líquidos principalmente a través de fuerzas de dispersión (Skurtys et al., 2015).

Debido a que el quitosano es un polímero catiónico, la tensión superficial de las soluciones de quitosano son elevadas. Por lo tanto, para lograr que el recubrimiento sea capaz de distribuirse uniformemente en la superficie de la fruta hay que evaluar los fenómenos de dispersión, adhesión y cohesión con el fin de aumentar la compatibilidad entre la solución de polímero y la superficie de la fruta. El agregado de tensoactivos disminuyó la tensión superficial de las soluciones de quitosano. Esto se debe a la naturaleza anfifílica de los tensoactivos que les permite adsorberse en la interfase, disminuir la energía libre interfacial y así reducir el trabajo requerido para expandir la interfase (Ziani et al., 2008). El efecto del agregado de Tween[®] 80 fue superior al efecto del agregado de Tween[®] 20. El Tween[®] 20 y Tween[®] 80 son tensoactivos no iónicos compuestos por ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitano (Figura IV.23).

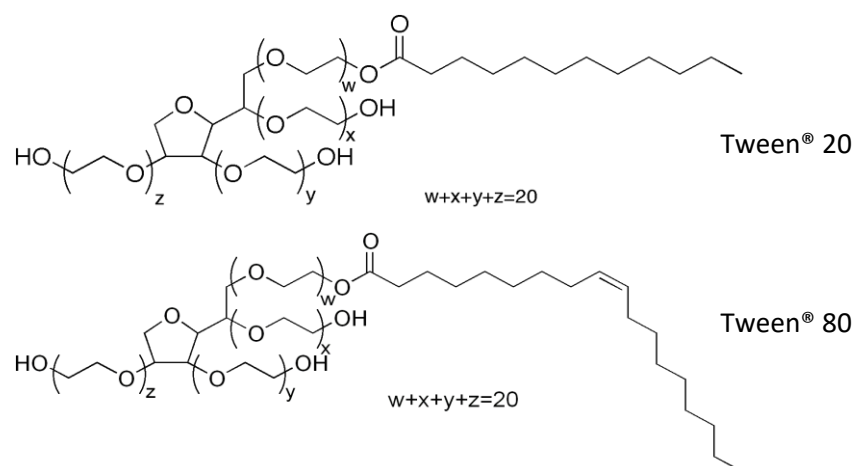


Figura IV.23. Estructura química de los tensoactivos Tween[®] 20 y Tween[®] 80.

Ambos tensoactivos tienen el mismo grupo polar y difieren en los ácidos grasos de las cadenas laterales. El Tween[®] 20 posee un ácido láurico C12:0 dentro de su estructura mientras que el Tween[®] 80 posee un ácido oleico C18:1. Los hidrocarburos proporcionan las cadenas laterales hidrofóbicas mientras que el carácter hidrofílico lo proporcionan las subunidades de óxido de etileno. El mayor efecto del Tween[®] 80 podría explicarse por el mayor largo de la cadena hidrofóbica que le confiere un balance hidrofílico-lipofílico (HLB=15) menor que el del Tween[®] 20 (HLB=16,7), lo que podría llevar a una mayor afinidad del Tween[®] 80 por la interfase. Para concentraciones superiores a 0,05-0,07 % no se observaron cambios significativos en la tensión superficial de las soluciones, lo que sugiere que se alcanzó la concentración micelar crítica (CMC) de los tensoactivos. La CMC se define como la concentración a partir de la cual la interfase se satura en el tensoactivo y este migra al seno de la solución donde se forman las micelas. Esta concentración es importante ya que el agregado de tensoactivos por encima de dicha concentración no redundará en un efecto en la tensión superficial.

Para evaluar la capacidad de las soluciones de quitosano de dispersarse y mojar la superficie de las manzanas, se realizaron medidas de ángulos de contacto. Los ángulos de contacto de las soluciones de quitosano LMW y MMW con la superficie de las manzanas se encontraron en el entorno de los 70 °. Estos ángulos elevados, similar al obtenido para el agua (70,2 ± 2,4), se deben a las fuertes interacciones entre las cadenas de quitosano, que provocan una tensión superficial elevada y poca capacidad de mojado de la superficie de la fruta. El agregado de los tensoactivos disminuyó los ángulos de contacto, lo que se puede atribuir a la adsorción de tensoactivo en la interfase sólido-líquido que permite un aumento de la capacidad de mojado de la solución (Choi et al., 2002). Este efecto se verificó a través de la disminución del coeficiente de esparcimiento W_s . Este coeficiente se define como la diferencia entre la adhesión del líquido a la superficie (W_a) y la cohesión de las moléculas del propio líquido (W_c), donde una alta adhesión y una débil cohesión resultan en un aumento del grado de mojado (Skurtys et al., 2015). El agregado de los tensoactivos favoreció la disminución del coeficiente de cohesión (W_c), sin embargo, afectó la cohesión de las moléculas de quitosano. Tomando en cuenta esto, se eligió trabajar con una concentración 0,02 % de los tensoactivos y evaluar su efecto en las propiedades de las películas obtenidas. Las películas de los quitosanos LMW y MMW con el agregado de Tween[®] 20 o Tween[®] 80 0,02 % mostraron características visuales similares a las películas sin agregado de los

tensoactivos con opacidades bajas en todos los casos. Para la aplicación de recubrimientos en fruta, una baja opacidad es importante para no afectar la apariencia del producto. Con respecto a la solubilidad de las películas estas se ubicaron en el entorno del 14 % no observándose diferencias significativas entre quitosanos o tensoactivos. Estos valores bajos de solubilidad indican un buen grado de interacción de las moléculas de polímero que le dan gran estabilidad e integridad en presencia de agua. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas fue determinada debido a la importancia que esta tiene en la transferencia de agua entre la fruta a recubrir y el ambiente. La PVA de las películas de quitosano LMW fue superior a la PVA de las películas de quitosano MMW con valores de $(2,19 \pm 0,13) \times 10^9$ y $(1,01 \pm 0,17) \times 10^9 \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Leceta et al. (2013), donde el aumento del peso molecular del quitosano provocó una disminución de la PVA. Este comportamiento puede deberse a una menor interacción entre las cadenas de quitosano LMW comparado con las cadenas de mayor peso molecular del quitosano MMW, lo que podría facilitar la migración de las moléculas de agua a través de la película (Leceta et al., 2013). A su vez, se ha reportado que la PVA aumenta al aumentar el contenido de humedad de las películas, lo que se debe al efecto plastificante de las moléculas de agua (Slavutsky et al. 2016). Si se consideran las isotermas de adsorción de agua, se puede observar que el contenido de humedad de las películas de quitosano LMW fue mayor, lo que concuerda con una permeabilidad al vapor de agua mayor. En contraposición a esto resultados, otros autores no han reportado diferencias en la PVA de quitosanos de distinto peso molecular (Hwang et al., 2003; Park et al., 2002; Santacruz et al., 2015). En nuestros ensayos, la incorporación de los tensoactivos no afectó significativamente la PVA de las películas. Darbasi et al. (2017) reportaron que la incorporación de Tween[®] 80 en la concentración 0,05 y 0,1 % en ausencia de etanol no afectó significativamente la PVA, mientras que con la presencia de etanol se observó una reducción de PVA con la incorporación de tensoactivo. Ziani et al. (2008) reportaron que la incorporación de 0,05 % de Tween[®] 20 a la película de quitosano en ausencia de glicerol no modificó la PVA mientras que en presencia de glicerol la PVA se incrementó con la incorporación de tensoactivo. El hecho de que la permeabilidad al vapor de agua pueda estar afectada por la concentración de tensoactivo se debe a la modificación de las propiedades superficiales de las películas que pueden llevar a una mayor afinidad por el agua. Las diferencias encontradas entre los autores se puede explicarse por los diversos factores que

afectan a la permeabilidad al vapor de agua de las películas, como el peso molecular, la movilidad de las cadenas, las propiedades hidrofílicas/hidrofóbicas del polímero, grado de desacetilación, incorporación de plastificantes, tipo y concentración de tensoactivos, entre otros (Carneiro-da-Cunha et al., 2009). Con respecto a las isothermas de adsorción de agua, los datos experimentales se ajustaron satisfactoriamente al modelo GAB. Varios autores han evaluado diferentes modelos matemáticos para describir las isothermas de adsorción de agua en películas poliméricas. El modelo GAB es uno de los más empleados debido a que cada constante del modelo posee un significado físico (Timmermann et al., 2001) y es uno de los modelos que mejor se ajusta a los datos experimentales en películas de quitosano (Rosa et al., 2010; Tantala et al., 2019). En las isothermas se observó que el quitosano LMW fue capaz de adsorber un contenido de agua mayor que las películas MMW. Esto se vio reflejado en el valor del contenido de humedad de la monocapa (w_0) del modelo GAB, el cual se relaciona con el número de sitios disponibles para la adsorción de agua. Las películas de quitosano LMW mostraron áreas específicas de entre 88 y 108 m² g⁻¹ mientras que para el quitosano MMW se encontraron entre 61 y 67 m² g⁻¹. Estos valores de área superficial se pueden relacionar con el tamaño y número de poros de la matriz polimérica, lo que determina el área total de adsorción y por lo tanto determina el grado de hidratación de las películas (Rosa et al., 2010). El agua puede interactuar con el quitosano a través de los grupos amino y los grupos hidroxilo de las cadenas del polímero. Neto et al. (2005) reportaron que el agua se une a los grupos amino a través de interacciones más débiles que aquellas moléculas unidas a los grupos hidroxilos. En los análisis térmicos de las películas se observó que la desorción de agua ocurrió a temperaturas inferiores a los 100 °C, lo que se puede relacionar con interacciones débiles entre el agua y el polímero (Leceta et al 2013; Rueda 1999; Zawadzki et al. 2010). El agregado de los tensoactivos no afectó significativamente la estabilidad de las películas de quitosano, sin embargo, se observó un cambio en la afinidad de las películas por el agua, ya que la incorporación de los tensoactivos provocó una disminución en la temperatura máxima de desorción del agua. Debido a la naturaleza anfifílica de los tensoactivos, estos pueden interactuar con segmentos hidrofílicos de las películas y podrían afectar la afinidad por las moléculas de agua, resultando en agua más débilmente adsorbida (Darbasi et al., 2017).

En función de todos los resultados obtenidos se consideró seleccionar al quitosano MMW para continuar con los ensayos en fruta. Este quitosano mostró mayor capacidad de

inhibición del crecimiento micelial de *P. expansum in vitro* e igual capacidad de inhibir la germinación de esporas que el quitosano LMW. A su vez, las películas de quitosano MMW mostraron menor permeabilidad al vapor de agua y menor capacidad de adsorción de agua. Con respecto al tensoactivo, se seleccionó el Tween[®] 80 en la concentración 0,02 % ya que tuvo mayor impacto en la disminución de la tensión superficial y en el coeficiente de esparcimiento W_s en la superficie de las manzanas Red Delicious.

En los ensayos de aplicación en fruta de quitosano MMW 1 % en ácido acético con 0,02 % de Tween[®] 80, se observó que el recubrimiento con quitosano no afectó significativamente los sólidos solubles ni el pH de las frutas, sin embargo, afectó la acidez, pérdida de agua, textura y color de las manzanas Red Delicious almacenadas en cámara fría a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante 4 meses. El mecanismo por el cual las películas conservan la calidad de las frutas y vegetales se debe a la modificación de la atmósfera que rodea al producto. Esto permite disminuir la velocidad de respiración debido a la disminución de la disponibilidad de oxígeno y al incremento de la concentración interna de CO_2 . Esto contribuye a retrasar los cambios asociados a ablandamiento y cambios de textura, cambio de sabor y mayor retención del color (Bourtoom, 2008). A su vez, las películas actúan como una barrera al agua previniendo las pérdidas de masa por transpiración. Esta pérdida de agua depende del gradiente de humedad entre el tejido de la fruta y la atmósfera circundante, así como de la temperatura de almacenamiento. En nuestros ensayos se observó que las manzanas tratadas con quitosano tuvieron una pérdida de masa significativamente menor que en las frutas sin tratar luego de 4 meses de almacenamiento en cámara fría. Los resultados obtenidos sugieren que las películas de quitosano actúan como una barrera física reduciendo la pérdida de agua de la fruta. A su vez, las películas de quitosano podrían actuar sellando pequeñas heridas de la cáscara lo cual podría contribuir a reducir la deshidratación de la fruta (Hernández-Muñoz et al., 2008). El recubrimiento con quitosano a su vez redujo significativamente la pérdida de firmeza de las manzanas. En las frutas control se observó una reducción de la firmeza del 40 % mientras que en las frutas tratadas con quitosano la firmeza disminuyó un 20 %. Las propiedades de textura de las frutas están afectadas por la estructura y composición de los polisacáridos de la pared celular. La reducción de la pérdida de agua en las frutas tratadas con quitosano podría estar contribuyendo positivamente al mantenimiento de la firmeza. Con respecto al color, se observaron diferencias significativas en los cambios de color de las manzanas aunque estos resultados podrían quedar enmascarados en la propia variabilidad

del color de las frutas. Varios autores han reportado resultados similares de la aplicación de quitosano en la poscosecha de frutillas, tomates, duraznos, peras, kiwis, manzanas (Bautista-Baños et al., 2006; Carneiro-da-Cunha et al., 2009; Jianglian y Shaoying, 2013; Meng et al., 2010; Sivakumar et al., 2016).

A su vez, el quitosano MMW fue evaluado en el control de *P. expansum* en manzanas Red Delicious almacenadas a bajas temperaturas. Las manzanas tratadas con quitosano MMW 1% mostraron una incidencia de la enfermedad del 40 % que fue significativamente menor que en el control (heridas tratadas con agua destilada). En las heridas tratadas con ácido acético (1 %) el *P. expansum* fue capaz desarrollarse, con una incidencia de la enfermedad similar a las heridas tratadas con agua destilada. Estos resultados indican que el control del crecimiento de *P. expansum* se debe a la presencia del quitosano y no al pH del medio en el que se encuentra disuelto. La actividad antifúngica del quitosano ha sido reportada en la poscosecha de diferentes frutas. Xu et al. (2007) reportaron que el recubrimiento con quitosano redujo el crecimiento de *B. cinerea* en uvas, mientras que de Oliveira et al. (2014) reportaron la inhibición de *P. expansum* en la misma fruta. Con respecto al peso molecular, Chien et al. (2007) reportaron que quitosano de peso molecular alto HMW (357 kDa) mostró mayor actividad en el control de *B. cinerea*, *P. digitatum* y *P. italicum* en cítricos, que el quitosano de bajo peso molecular LMW (15 kDa). Sin embargo, el quitosano LMW fue más efectivo en el mantenimiento de la calidad de las frutas que el quitosano HMW (Chien et al., 2007). A su vez, Badawy y Rabea (2009) reportaron que quitosanos de diferente peso molecular (5 kDa, 37 kDa, 57 kDa, 290 kDa) mostraron diferente control de *B. cinerea* en tomates. El quitosano de 57 kDa mostró ser más efectivo en el control del hongo en fruta, mientras que en los ensayos *in vitro* el quitosano de 5 kDa fue el más efectivo en el control de *B. cinerea*. Una vez más, estos resultados demuestran que la actividad biológica del quitosano es altamente dependiente de diversos factores. El quitosano también ha sido reportado como una alternativa para el control de *P. expansum* en manzanas (Bautista-Baños et al., 2004; De Capdeville et al., 2002). De Capdeville et al. (2002) plantearon que la inducción de resistencia fue el mecanismo de acción involucrado en la actividad antifúngica del quitosano, más que el simple hecho de la inhibición directa del patógeno. Otros autores han reportado resultados similares, donde el quitosano fue capaz de modular las respuestas de inducción de resistencia (aumento de la formación de fenilalanina amonio liasa, quitinasa

y β -1,3-glucanasa) en uvas, naranjas, frutillas y peras (Fajardo et al., 1998; Ma et al., 2013; Meng et al., 2008; Romanazzi, 2010).

Cuando el quitosano MMW fue evaluado en conjunto con la levadura F9D se observó una mayor inhibición de la enfermedad (77 %) con respecto a la obtenida con el quitosano MMW solo (62 %). Sin embargo, la inhibición de *P. expansum* fue mayor (90 %) cuando se evaluó la levadura sola. Esto indica que la levadura no se vio beneficiada por la incorporación del quitosano MMW. Estos resultados pueden explicarse debido a una disminución en la viabilidad de la levadura F9D en las heridas de manzanas tratadas con quitosano. Yu et al. (2012) reportaron resultados similares, donde la viabilidad de la *C. laurentii* disminuyó con el agregado de quitosano, sin embargo, no observó disminución en la actividad biocontroladora de la levadura contra *P. expansum* en peras. A su vez, estos autores reportaron el mejoramiento del control del patógeno mediante la combinación de quitosano con la levadura *C. laurentii* y CaCl_2 . Otros autores han reportado la mejora de la actividad biocontroladora de varias levaduras con la incorporación de sales, aminoácidos, inductores de resistencia, antioxidantes, entre otros (Bastiaanse et al., 2010; Janisiewicz y Conway, 2010; Sharma et al., 2009; Wang et al., 2010). Incluso, se han comercializado dos productos con la levadura *Candida saitoana* en combinación con quitosano (InovaCoat) y lisozima (Inovacure) por la empresa Neova Technologies (Abbotsford, British Columbia, Canadá) (Samir Droby et al., 2009; El Ghaouth & Wilson, 2002). Esto sugiere que el desempeño del conjunto quitosano-levadura puede ser mejorado por la incorporación de otras sustancias, siendo esta una perspectiva del presente trabajo. A su vez, no se descarta la perspectiva de evaluar el quitosano LMW para el control del *P. expansum* y su combinación con la levadura F9D en manzanas Red Delicious.

V.
CONSIDERACIONES
FINALES

Los residuos de pesticidas en frutas frescas y vegetales han sido y seguirán siendo una preocupación para las agencias reguladoras y los consumidores. Por esta razón, reducir o eliminar los fungicidas químicos en la poscosecha mediante el desarrollo de diferentes alternativas sigue siendo de alta prioridad. En este trabajo se propuso el estudio del control biológico y el polímero natural quitosano para controlar el desarrollo de *P. expansum* y mantener la calidad de manzanas Red Delicious durante su almacenamiento a $(0 \pm 1) ^\circ\text{C}$.

La estrategia de control biológico planteada resultó ser muy exitosa, ya que se encontraron diversas levaduras antárticas capaces de controlar el desarrollo de *P. expansum*. Este éxito se debió a una selección de los agentes de biocontrol basado en el conocimiento del patógeno y ciclo de la enfermedad y de las condiciones de almacenamiento de la fruta. La selección realizada resultó fundamental para no malgastar esfuerzos en el proceso y aumentar la probabilidad de éxito. A su vez, se comprobó que la selección de un agente de biocontrol no debe estar basada en determinados mecanismos de acción, ya que el único ensayo decisivo para una correcta selección es el biocontrol en el patosistema seleccionado.

Los resultados con quitosano mostraron que puede ser una alternativa para el control de la enfermedad causada por *P. expansum* y para mantener la calidad de las frutas durante el almacenamiento poscosecha. La combinación de quitosano con la levadura *D. hansenii* F9D no mostró un incremento en la actividad biocontroladora de la levadura. Sin embargo, podría plantearse la mejora de esta estrategia mediante la incorporación de otras sustancias naturales o la evaluación de otro tipo de quitosano. La estrategia de combinar uno o más factores para ayudar a reducir las enfermedades se basa en el concepto de múltiples barreras. Este método consiste en la reducción de la enfermedad mediante la aplicación de barreras consecutivas al patógeno, donde cada una de ellas contribuye a la reducción total de la enfermedad (Romanazzi et al., 2012). El quitosano posee la capacidad antifúngica, la posible inducción de resistencia en la fruta, así como la capacidad de formar películas que pueden contribuir a mantener la calidad de la fruta, mientras que la levadura, podría aportar su efecto más eficiente en el control de *P. expansum*. En este sentido, deberían explorarse distintas alternativas para mejorar el efecto de la aplicación combinada de estas dos estrategias que podría proveer un adecuado control comparado con los logrados por los fungicidas químicos tradicionales. El control biológico y su combinación con productos naturales parecería ser un método factible para controlar las enfermedades poscosecha, el cual en un futuro podría constituirse en una práctica internacionalmente adoptada. Sin embargo, se debe aceptar el

hecho de que los agentes de control biológico usualmente no son tan efectivos como los fungicidas químicos (Sharma et al., 2009). A pesar de esto, los beneficios para el medioambiente y la salud pública deberían compensar este hecho. La transición entre el control químico y el control biológico es una combinación de factores económicos, políticos y medioambientales, donde el éxito de esta estrategia dependerá enormemente de la consciencia de los consumidores en preferir alimentos más seguros.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abano, E. E., Sam-Amoah, L. K. (2012). Application of Antagonistic Microorganisms for the control of postharvest decays in fruits and vegetables. *International Journal of Advanced Biological Research*, 2(1), 1–8.
- Adams, R. P. (2007). *Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry* (4th ed.; A. P. Corp., Ed.).
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(1), 9–21.
- Alem, M. A., Oteef, M. D., Flowers, T. H., & Douglas, L. J. (2006). Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell*, 5(10), 1770–1779.
- An, B., Li, B., Qin, G., & Tian, S. (2012). Exogenous calcium improves viability of biocontrol yeasts under heat stress by reducing ROS accumulation and oxidative damage of cellular protein. *Current Microbiology*, 65(2), 122–127.
- Andersen, B., Smedsgaard, J., & Frisvad, J. C. (2004). *Penicillium expansum*: Consistent Production of Patulin, Chaetoglobosins, and Other Secondary Metabolites in Culture and Their Natural Occurrence in Fruit Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(8), 2421–2428.
- Anuario Estadístico. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2017). *Uruguay*.
- AOAC. (2005). *Official Method 942.15 Acidity (Titratable) of Fruit Products. 1*.
- Arras, G., De Cicco, V., Arru, S., & Lima, G. (1998). Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 73(3), 413–418.
- ASTM. (1995). Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. In *Annual book of ASTM* (Vol. 552, pp. 406–413).
- Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2009). Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 110–117.
- Baker, K., & Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. San Francisco, USA: W.H. Freeman and Company.
- Bar-Shimon, M., Yehuda, H., Cohen, L., Weiss, B., Kobeshnikov, A., Daus, A., ... Droby, S. (2004). Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Current Genetics*, 45(3), 140–148.
- Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: Development and Control*. Amsterdam: Elsevier Sciences.
- Bastiaanse, H., de Bellaire, L., Lassois, L., Misson, C., & Jijakli, M. H. (2010). Integrated control of crown rot of banana with *Candida oleophila* strain O, calcium chloride and modified atmosphere packaging. *Biological Control*, 53, 100–107.
- Bautista-Baños, S., De Lucca, A., & Wilson, C. (2004). Evaluation of the antifungal activity of natural compounds to reduce postharvest blue mold (*Penicillium expansum*

- Link.) of apples (*Malus domestica* Dorkh.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 362–369.
- Bautista-Baños, S., Hernandez-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M., Hernández-López, M., Air Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108–118.
- Besil, N., Pérez-Parada, A., Cesio, V., Varela, P., Rivas, F., & Heinzen, H. (2016). Degradation of imazalil, orthophenylphenol and pyrimethanil in Clementine mandarins under conventional postharvest industrial conditions at 4 °C. *Food Chemistry*, 194, 1132–1137.
- Bettiol, W. (1991). Biocontrol na filosfera: problemas e perspectivas. In: EMBRAPA/CNPDA (Ed.). *Controle Biológico de Doenças de Plantas*, 59–97.
- Bhuvaneswari, S. (2015). Quantitative Analysis of Iron and Ascorbic acid contents in locally consumed Fruits and Vegetables. *International Research Journal of Biological Science*, 4(7), 42–47.
- Blum, L., Amarante, C., Valdebenito-Sanhueza, R., Guimaraes, L., Dezanet, A., & Hack-Neto, P. (2004). Postharvest application of *Cryptococcus laurentii* reduces apple fruit rots. *Fitopatologia Brasileira*, 29, 433–436.
- Bourtoom, T. (2008). Review Article Edible films and coatings: characteristics and properties. In *International Food Research Journal* (Vol. 15).
- Bovi Mitre, M. G., Wierna, N. R., Retamozo, Z., & Ruggeri, M. A. (2004). Curva de Degradación del Plaguicida Imazalil en Frutos Maduros de Pomelos durante el Almacenamiento en Frio. *Información Tecnológica*, 15(3).
- Bravin, B., Peressini, D., & Sensidoni, A. (2006). Development and application of polysaccharide-lipid edible coating to extend shelf-life of dry bakery products. *Journal of Food Engineering*, 76(3), 280–290.
- Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. N., & Wiles, J. N. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of Food Science*, 61, 953–955.
- Calvente, V., Benuzzi, D., & Tosetti, M. (1999). Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43(4), 167–172.
- Calvente, V., de Orellano, M., Sansone, G., Benuzzi, D., & Sanz de Tosetti, M. (2001). A simple agar plate assay for screening siderophore producer yeasts. *Journal of Microbiology Methods*, 47, 273–279.
- Calvo, J., Calvente, V., de Orellano, M., Benuzzi, D., & de Tosetti, M. (2007). Biological control of postharvest spoilage caused by *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in apple by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 251–257.
- Cañamás, T. P., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., Solsona, C., & Teixidó, N. (2011). Field applications of improved formulations of *Candida sake* CPA-1 for control of *Botrytis cinerea* in grapes. *Biological Control*, 56, 150–158.
- Cankar, K., Stebih, D., Dreo, T., Žel, J., & Gruden, K. (2006). Critical points of DNA

- quantification by real-time PCR - Effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*.
- Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Souza, M. P., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2009). Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Journal of Food Engineering*, 95(3), 379–385.
- Cartwright, D., & Spurr, H. (1998). Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* on tobacco seedlings with non-pathogenic binucleate *Rhizoctonia* fungi. *Coil Biology and Biochemistry*, 30(14), 1879–1884.
- Casariego, A., Souza, B. W. S., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., & Díaz, R. (2008). Chitosan coating surface properties as affected by plasticizer, surfactant and polymer concentrations in relation to the surface properties of tomato and carrot. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1452–1459.
- Castoria, R., De Curtis, F., Caputo, L., Pacifico, S., Lima, G., & De Cicco, V. (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruit: study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology*, 22, 7–17.
- Castoria, Raffaello, Caputo, L., De Curtis, F., & De Cicco, V. (2003). Resistance of Postharvest Biocontrol Yeasts to Oxidative Stress: A Possible New Mechanism of Action. *Phytopathology*, 93(5), 564–572.
- Castoria, Raffaello, De Curtis, F., Lima, G., & De Cicco, V. (1997). β -1,3-glucanase activity of two saprophytic yeasts and possible mode of action as biocontrol agents against postharvest diseases. *Postharvest Biology and Technology*, 12(3), 293–300.
- Chalutz, E., & Wilson, C. (1990). Postharvest biocontrol of green and blue mold and sour rot of citrus fruit by *Debaryomyces hansenii*. *Plant Disease*, 74, 134–137.
- Chi, M., Li, G., Liu, Y., Liu, G., Li, M., Zhang, X., ... Liu, J. (2015). Increase in antioxidant enzyme activity, stress tolerance and biocontrol efficacy of *Pichia kudriavzevii* with the transition from a yeast-like to biofilm morphology. *Biological Control*, 90, 113–119.
- Chien, P. J., Sheu, F., & Lin, H. R. (2007). Coating citrus (Murcott tangor) fruit with low molecular weight chitosan increases postharvest quality and shelf life. *Food Chemistry*, 100, 1160–1164.
- Choi, W. Y., Park, H. J., Ahn, D. J., Lee, J., & Lee, C. Y. (2002). Wettability of chitosan coating solution on “Fuji” apple skin. *Journal of Food Science*, 67(7), 26Choi, W. Y., Park, H. J., Ahn, D. J., Lee, J., .
- Cissé, M., Montet, D., Loiseau, G., & Ducamp-Collin, M. N. (2012). Influence of the Concentrations of Chitosan and Glycerol on Edible Film Properties Showed by Response Surface Methodology. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(3), 830–837.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clement, C., & Barka, E. A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied Environmental Microbiology*, 71, 4951–4959.
- Contarino, R., Brighina, S., Fallico, B., Cirvilleri, G., Parafati, L., & Restuccia, C. (2019).

- Volatile organic compounds (VOCs) produced by biocontrol yeasts. *Food Microbiology*, 82(October 2017), 70–74.
- Conway, W. S., Leverentz, B., Janisiewicz, W. J., Saftner, R. A., & Camp, M. J. (2005). Improving biocontrol using antagonist mixtures with heat and/or sodium bicarbonate to control postharvest decay of apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, (36), 234–244.
- Cook, R., & Baker, K. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogens*. St. Paul, Minnesota, USA: American Phytopathological Society.
- Costa-Orlandi, C., Sardi, J., Pitangui, N., de Oliveira, H., Scorzoni, L., Galeane, M., ... Mendes-Giannini, M. (2017). Fungal Biofilms and Polymicrobial Diseases. *Journal of Fungi*, 3(2), 22.
- D. Raafat, D., Barga, K., Haas, A., & Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3764–3773.
- Darbasi, M., Askari, G., Kiani, H., & Khodaiyan, F. (2017). Development of chitosan based extended-release antioxidant films by control of fabrication variables. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 303–310.
- De Boer, W., Leveau, J. H. J., Kowalchuk, G. A., Klein Gunnewiek, P. J. A., Abeln, E. C. A., Figge, M. J., ... Van Veen, J. A. (2004). *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae International. *Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54, 857–864.
- De Capdeville, G., Wilson, C. L., Beer, S. V., & Aist, J. R. (2002). Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested “Red Delicious” apple fruit. *Phytopathology*, 92(8), 900–908.
- de Oliveira, C. E. V., Magnani, M., de Sales, C. V., de Souza Pontes, A. L., Campos-Takaki, G. M., Stamford, T. C. M., & de Souza, E. L. (2014). Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). *International Journal of Food Microbiology*, 171, 54–61.
- De Oliveira, E. J., El Guwss, N. E., Moerschbacher, B. M., & Franco, T. T. (2012). Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 800–809.
- Di Francesco, A., Martini, C., & Mari, M. (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action? *European Journal of Plant Pathology*, 145(4), 711–717.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., D’Aquino, S., Pagnotta, E., & Mari, M. (2017). Biocontrol of *Monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: insights on competition for nutrients and space. *International Journal of Food Microbiology*, 248, 32–38.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., & Mari, M. (2014). Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*, 81, 8–14.
- Di Rienzo, J. A., Guzmán, A. W., & Casanoves, F. (2002). A multiple-comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 7(2), 129–142.

- Dos Santos, R. S., Arge, L. W. P., Costa, S. I., Machado, N. D., de Mello- Farias, P. C., Rombaldi, C. V., & de Oliveira, A. C. (2015). Genetic regulation and the impact of omics in fruit ripening. *Omics*, 8(2): *Plant Omics Journal*, 8(2), 78–88.
- Droby, S., Chalutz, E., Wilson, C. L., & Wisniewski, M. E. (1989). Characterization of the biocontrol activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. *Canadian Journal of Microbiology*, 35, 794–800.
- Droby, S., Cohen, A., Weiss, B., Horev, B., Chalutz, E., Katz, H., ... Shachnai, A. (1998). Commercial testing of aspire: a yeast preparation for the biological control of postharvest decay of citrus. *Biological Control*, 12, 97–100.
- Droby, S., Eick, A., Macarisin, D., Cohen, L., Rafael, G., Stange, R., ... Shapira, R. (2008). Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 386–396.
- Droby, S., Hofstein, R., Wilson, C. L., Wisniewski, M., Fridlender, B., Cohen, L., ... Chalutz, E. (1993). Pilot testing of *Pichia guilliermondii*: a biocontrol agent for postharvest diseases of citrus fruit. *Biological Control*, 3, 47– 52.
- Droby, Samir, Wisniewski, M., El Ghaouth, A., & Wilson, C. (2003). Influence of food additives on the control of postharvest rots of apple and peach and efficacy of the yeast-based biocontrol product Aspire. *Postharvest Biology and Technology*, 27, 127–135.
- Droby, Samir, Wisniewski, M., Macarisin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52, 137–145.
- Ebrahimi, L., Etebarian, H. R., Aminian, H., & Sahebani, N. (2012). Enhancement of biocontrol activity of *Torulasporea delbrueckii* with methyl jasmonate against apple blue mould disease. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 45(19), 2355–2363.
- El-Ghaouth, A., WILSON, C. L., & WISNIEWSKI, M. (2003). Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology*, 93, 344–348.
- El-Ghaouth, A, Smilanick, J., Wisniewski, M., & Wilson, C. (2000). Improved control of apple and citrus fruit decay with the combination of *Candida saitoana* and 2deoxy-d-glucose. *Plant Disease*, 84, 249–253.
- El-Ghaouth, Ahmed, Wilson, C. L., & Wisniewski, M. (1998). Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*, 88(4), 282–291.
- El-Neshawy, S. M., & El-Sheikh, M. M. . (1998). Control of green mold on oranges by *Candida oleophila* and calcium treatments. *Annals of Agricultural Sciences*, 3, 881–890.
- El-Neshawy, S., & Wilson, C. (1997). Nisin enhancement of biocontrol of postharvest diseases of apple with *Candida oleophila*. *Postharvest Biology and Technology*, 10, 9–14.
- El Ghaouth, A., & Wilson, C. L. (2002). *Candida saitoana* compositions for biocontrol of

- plant postharvet decay. U.S. Patent No. 6,419,922.*
- Elad, Y., & Kapat, A. (1999). The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, *105*, 177–189.
- EPA - Biopesticides. (2019).
- Escárcega-Galaz, A. A., Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Sanches-Silva, A., Madera-Santana, T. J., & Paseiro-Losada, P. (2018). Characterization data of chitosan-based films: Antimicrobial activity, thermal analysis, elementary composition, tensile strength and degree crystallinity. *Data in Brief*, *21*, 473–479.
- Fajardo, J. E., McCollum, T. G., McDonald, R. E., & Mayer, R. T. (1998). Differential induction of proteins in orange flavedo by biologically based elicitors and challenged by *Penicillium digitatum* Sacc. *Biological Control Control.*, *13*, 143–151.
- Fan, Q., & Tian, S. (2001). Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology Technol*, *21*, 341–350.
- Fan, Y., Xu, Y., Wang, D., Zhang, L., Sun, J., Sun, L., & Zhang, B. (2009). Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria × ananassa*) preservation quality. *Postharvest Biology and Technology*, *53*, 84–90.
- FAO. (2011). *Report: Global food losses and food waste: extent, causes and prevention*. Roma.
- Farahani, L., & Etebarian, H. . (2012). Enhancement of the efficacy of two antagonistic yeasts with salicylic acid against *Penicillium expansum*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *45*, 260–267.
- Farbo, M. (2018). Effect of yeast volatile organic compounds on ochratoxin A-producing *Aspergillus carbonarius* and *A. ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology*, *284*, 1–10.
- Fiori, S., Fadda, A., Giobbe, S., Berardi, E., & Migheli, Q. (2008). *Pichia angusta* is an effective biocontrol yeast against postharvest decay of apple fruit caused by *Botrytis cinerea* and *Monilia fructicola*. *FEMS Yeast Research*, *8*, 961–963.
- Flory, P. J. (1953). *Principles of Polymer Chemistry* (First Edit). Ithaca, USA: Cornell University Press.
- Fowkes, F. (1963). Additivity of intermolecular forces at interfaces. determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids. *Journal of Physical Chemistry*, *67*, 2538–2541.
- Fredlund, E., Druvefors, U., Olstorpe, M., Passoth, V., & Schnurer, J. (2004). Influence of ethyl acetate production and ploidy on the anti-mould activity of *Pichia anomala*. *FEMS Microbiology Letters*, *238*(1), 133–137.
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), 1–19.
- Gamagae, S., Sivakumar, D., Wijeratnam, R., & Wijesundera, R. (2003). Use of sodium bicarbonate and *Candida oleophila* to control anthracnose in papaya during storage. *Crop Protection*, *22*, 775–779.

- Gehlot, P., & Singh, J. (2018). Fungi and their role in sustainable development: Current perspectives. In *Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspective*.
- Gholamnejad, J., & Etebarian, H. R. (2009). Effect of calcium chloride on the biocontrol efficacy of two antagonistic yeasts against *Penicillium expansum* on apple fruit. *Phytoparasitica*, *37*, 255–261.
- Giovannoni, J. J. (2004). Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, *16*(1), 170–180.
- Girifalco, L., & Good, R. (1957). A theory for the estimation of surface and interfacial energies: derivation and application to interfacial tension. *Journal of Physical Chemistry*, *61*, 904–909.
- Goodwin, J. (2004). *Colloids and interfaces with surfactants and polymers: An introduction*. John Wiley & Sons Ltd.
- Gore-Lloyd, D., Sumann, I., Brachmann, A. O., Schneeberger, K., Ortiz-Merino, R. A., Moreno-Beltrán, M., ... Freimoser, F. M. (2019). Snf2 controls pulcherriminic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima*. *Molecular Microbiology*, *112*(1), 317–332.
- Gori, K., Mortensen, H., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2007). Ammonia as a mediator for communication in strains of *Debaryomyces hansenii* and yeast species. *J Dairy Sci. Journal of Dairy Science*, *90*, 5032–5041.
- Gori, Klaus, Knudsen, P. B., Nielsen, K. F., Arneborg, N., & Jespersen, L. (2011). Alcohol-based quorum sensing plays a role in adhesion and sliding motility of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Yeast Research*, *11*, 643–652.
- Guerra-Sánchez, M. G., Vega-Pérez, J., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Lauzardo, a. N. (2009). Antifungal activity and release of compounds on *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. by effect of chitosan with different molecular weights. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *93*(1), 18–22.
- Guinesi, L. S., & Cavalheiro, É. T. G. (2006). The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*, *444*(2), 128–133.
- Hafdani, F. N., & Sadeghinia, N. (2011). A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial. *World Academic Science, Engineering and Technology*, *5*, 225–229.
- Hagenmaier, R., & Baker, R. (1993). Reduction in gas exchange of citrus fruit by wax coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*, 283–287.
- Hassan, B., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Zia, K. M., & Akhtar, N. (2018). Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *109*, 1095–1107.
- Hernández-Lauzardo, a. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Pérez, L. a. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, *73*, 541–547.
- Hernández-Lauzardo, Ana N., Guerra-Sánchez, M. G., Hernández-Rodríguez, A., Heydrich-Pérez, M., Vega-Pérez, J., & Velázquez-del Valle, M. G. (2012). Assesment

- of the effect of chitosan of different molecular weights in controlling *Rhizopus* rots in tomato fruits. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 45(October), 33–41.
- Hernández-Lauzardo, Ana Niurka, Velázquez-del Valle, M., & Guerra-Sánchez, M. G. (2011). Current status of action mode and effect of chitosan against phytopathogens fungi. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25), 4243–4247.
- Hernandez-Montiel, L. G., Gutierrez-Perez, E. D., Murillo-Amador, B., Vero, S., Chiquito-Contreras, R. G., & Rincon-Enriquez, G. (2018). Mechanisms employed by *Debaryomyces hansenii* in biological control of anthracnose disease on papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 139(December 2017), 31–37.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Valle, V. Del, Velez, D., Gavara, R., Hernández-Muñoz, P., ... Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428–435.
- HersHKovitz, V., Sela, N., Taha-Salaime, L., Liu, J., Rafael, G., Kessler, C., ... Droby, S. (2013). De-novo assemble and characterization of the transcriptome of *Metschnikowia fructicola* reveals differences in gene expression following interaction with *Penicillium digitatum* and grapefruit peel. *BMC Genomics*, 14, 168.
- Hongpattarakere, T., & Riyaphan, O. (2008). Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, 1–9.
- Hu, H., Wisniewski, M. E., Abdelfattah, A., & Zheng, X. (2017). Biocontrol activity of a cold-adapted yeast from Tibet against gray mold in cherry tomato and its action mechanism. *Extremophiles*, 21(4), 789–803.
- Hu, H., Yan, F., Wilson, C., Shen, Q., & Zheng, X. (2015). The ability of a cold-adapted *Rhodotorula mucilaginosa* strain from Tibet to control blue mold in pear fruit. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108(6), 1391–1404.
- Hua, S. S., Beck, J. J., Sarreal, S. B., & Gee, W. (2014). The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 30, 71–78.
- Hwang, K. T., Kim, J. T., Jung, S. T., Cho, G. S., & Park, H. J. (2003). Properties of chitosan-based biopolymer films with various degrees of deacetylation and molecular weights. *Journal of Applied Polymer Science*, 89, 3476–3484.
- Ikner, A., & Shiozaki, K. (2005). Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutation Research*, 569, 13–27.
- Irtwange, S. V. (2006). Application of biological control agents in pre and postharvest operations. *Agricultural Engineering International*, 3, 1–12.
- Janisiewicz, W., & Conway, W. (2010). Combining biological control with physical and chemical treatments to control fruit decay after harvest. *Stewart Postharvest Review*, 1(3), 1–16.
- Janisiewicz, W., Conway, W., Glenn, D., & Sams, C. (1998). Integrating biological control and calcium treatment for controlling postharvest decay of apple. *Hortscience*, 33, 105–109.

- Janisiewicz, W. J., Tworcoski, T. J., & Kurtzman, C. P. (2001). Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology*, 91(11), 1098–1108.
- Janisiewicz, W.J., & Korsten, L. (2002). Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 411–441.
- Janisiewicz, Wojciech J., Saftner, R. a., Conway, W. S., & Yoder, K. S. (2008). Control of blue mold decay of apple during commercial controlled atmosphere storage with yeast antagonists and sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 374–378.
- Jiang, Y., & Li, Y. (2001). Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*, 73(2), 139–143.
- Jianglian, D., & Shaoying, Z. (2013). Application of Chitosan Based Coating in Fruit and Vegetable Preservation: A Review. *Journal of Food Processing & Technology*, 04(05), 5–8.
- Jijakli, M., & Lepoivre, P. (1998). Characterization of na exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology*, 88, 335–343.
- Karabulut, O. A., Smilanick, J. L., Gabler, F. M., Mansour, M., & Droby, S. (2003). Near-harvest ap- plications of *Metschnikowia fructicola*, ethanol, and sodium bicarbonate to control postharvest diseases of grape in central California. *Plant Disease*, 87, 1384–1389.
- Karabulut, O. A., Tezcan, H., Daus, A., Cohen, L., Wiess, B., & Droby, S. (2004). Biological control of preharvest and postharvest rots in strawberries by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol Sci Technol*, (14), 513–521.
- Kefialew, Y., & Ayalew, A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 8–11.
- Kim, E., & Park, I. (2012). Fumigant antifungal activity of myrtaceae essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. *Molecules*, 17, 10459–10469.
- Klein, M., & Kupper, K. (2018). Biofilm production by *Aureobasidium pullulans* improves biocontrol against sour rot in citrus. *Food Microbiology*, 69, 1–10.
- Knee, M. (1976). Influence of ethylene on the ripening of stored apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 27(4), 383–392.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 845.
- Kong, M., Guan Chen, X., Xing, K., & Jin Park, H. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51–63.
- Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, (5ta ed.). Amsterdam: Elsevie.

- Lahlali, R., Raffaele, B., & Jijakli, M. H. (2011). UV protectants for *Candida oleophila* (strain O), a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Plant Pathology*, *60*, 288–295.
- Lahlali, R., Serrhini, M., & Jijakli, M. (2004). Efficacy assessment of *Candida oleophila* (strain O) and *Pichia anomala* (strain K) against major postharvest diseases of citrus fruit in Morocco. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, *69*, 601–609.
- Lassois, L., de Bellaire, L., & Jijakli, M. H. (2008). Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O. *Biological Control*, *45*(3), 410–418.
- Leceta, I., Guerrero, P., & De La Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, *93*(1), 339–346.
- Li, B., Lai, T., Qin, G., & Tian, S. (2009). Ambient pH stress inhibits spore germination of *Penicillium expansum* by impairing protein synthesis and folding: a proteomic-based study. *Journal of Proteome Research*, *9*(1), 298–307.
- Li, J., & Yuan, R. (2008). NAA and ethylene regulate expression of genes related to ethylene biosynthesis, perception, and cell wall degradation during fruit abscission and ripening in “delicious” apples. *Journal of Plant Growth Regulation*, *27*(3), 283–295.
- Lima, G., Arru, S., De Curtis, F., & Arras, G. (1999). Influence of antagonist, host fruit and pathogen on the biological control of postharvest fungal diseases by yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *23*, 223–229.
- Lima, Giuseppe, Ippolito, A., Nigro, F., & Salerno, M. (1997). Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, *10*(2), 169–178.
- Lin, D., & Zhao, Y. (2007). Innovations in the Development and Application of Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits and Vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *6*(3), 60–75.
- Liu, He, Tian, W., Li, B., Wu, G., Ibrahim, M., Tao, Z., ... Sun, G. (2012). Antifungal effect and mechanisms of chitosan against the rice sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. *Biotechnology Letters*, *34*, 2291–2298.
- Liu, Hui, Coulthurst, S. J., Pritchard, L., Hedley, P. E., Ravensdale, M., Humphris, S., ... Toth, I. K. (2008). Quorum Sensing Coordinates Brute Force and Stealth Modes of Infection in the Plant Pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogens*, *4*(6), e1000093.
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, *167*(2), 153–160.
- Liu, J., Wisniewski, M., Droby, S., Vero, S., Tian, S., & Hershkovitz, V. (2011). Glycine betaine improves oxidative stress tolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Cystofilobasidium infirmominiatum*. *International Journal of Food Microbiology*, *146*, 76–83.
- Liu, P., Cheng, Y., Yang, M., Liu, Y., Chen, K., Long, C. A., & Deng, X. (2014).

- Mechanisms of action for 2-phenylethanol isolated from *Kloeckera apiculata* in control of *Penicillium* molds of citrus fruits. *BMC Microbiology*, 14(1).
- Long, C. A., Deng, B. X., & Deng, X. X. (2006). Pilot testing of *Kloeckera apiculata* for the biological control of postharvest diseases of citrus. *Annals of Microbiology*, 56, 13–17.
- Loper, J., & Henkels, M. (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5357–5363.
- Lu, L., Ye, C., Guo, S., Sheng, K., Shao, L., Zhou, T., ... Zheng, X. (2013). Preharvest application of antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum* induced resistance against postharvest diseases in mandarin orange. *Biological Control*, 67(2), 130–136.
- Lutz, M. C., Lopes, C. A., Sosa, M. C., & Sangorrín, M. P. (2012). A new improved strategy for the selection of cold-adapted antagonist yeasts to control postharvest pear diseases. *Biocontrol Science and Technology*, 22(12), 1465–1483.
- Ma, Z., Yang, L., Yan, H., Kennedy, J. F., & Meng, X. (2013). Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. *Carbohydrate Polymers*, 94(1), 272–277.
- Macarisin, D., Droby, S., Bauchan, G., & Wisniewski, M. (2010). Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: A new role for reactive oxygen species in postharvest control? *Postharvest Biology and Technology*, 58(3), 194–202.
- Mandal, G., Singh, D., & Sharma, R. (2007). Effect of hot water treatment and biocontrol agent (*Debaryomyces hansenii*) on shelf life of peach. *Indian Journal of Horticulture*, 64, 25–28.
- Manso, T., & Nunes, C. (2011). *Metschnikowia andauensis*: A novel biocontrol agent of fruit postharvest diseases. *Acta Horticulturae*, 905(1), 261–268.
- Manual de Frutas y Hortalizas en el Uruguay. Observatorio Granjero (Mercado Modelo y MGAP)*. (n.d.).
- Mari, M., Martini, C., Spadoni, A., Rouissi, W., & Bertolini, P. (2012). Biocontrol of apple postharvest decay by *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, (73), 56–62.
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerro-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., ... Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305–315.
- Martínez-González, M. E., Balois Morales, R., Alia-Tejacal, I., Cortes-Cruz, M. A., Palomino-Hermosillo, Y. A., & López-Gúzman, G. G. (2017). Postcosecha de frutos: maduración y cambios bioquímicos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (19), 4075.
- Martinez, A., Cavello, I., Garmendia, G., Rufo, C., Cavalitto, S., & Vero, S. (2016). Yeasts from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles*, 20(5), 759–769.
- Masoud, W., Poll, L., & Jakobsen, M. (2005). Influence of volatile compounds produced

- by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast*, 22, 1133–1142.
- McLaughlin, R., Wilson, C., Chalutz, E., Kurtzman, W., & Osman, S. (1990). Characterization and reclassification of yeasts used for biological control of postharvest diseases of fruit and veg- etables. *Appl Environ Microbiol. Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3583–3586.
- Meng, X. H., Qin, G. Z., & Tian, S. P. (2010). Influences of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* combined with postharvest chitosan coating on postharvest diseases and quality of table grapes in storage. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 596–601.
- Meng, X., Li, B., Liu, J., & Tian, S. (2008). Physiological responses and quality attributes of table grape fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. *Food Chemistry*, 106(2), 501–508.
- Meng, X., Yang, L., Kennedy, J. F., & Tian, S. (2010). Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 70–75.
- Mercier, J., & Wilson, C. L. (1995). Effect of wound moisture on the biocontrol by *Candida oleophila* of gray mold rot (*Botrytis cinerea*) of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 6, 9–15.
- Mercier, Julien, Lego, S. F., & Smilanick, J. L. (2010). In-package use of Muscodor albus volatile-generating sachets and modified atmosphere liners for decay control in organic table grapes under commercial conditions. *Fruits*, 65(1), 31–38.
- Merín, M. G., Mendoza, L. M., Farías, M. E., & Morata de Ambrosini, V. I. (2011). Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *International Journal of Food Microbiology*.
- Michalski, M. C., Desobry, S., Pons, M. N., & Hardy, J. (1998). Adhesion of edible oils to food contact surfaces. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*.
- Möller, H., Grelier, S., Pardon, P., & Coma, V. (2004). Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan - HPMC-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21), 6585–6591.
- Mondino, Pedro, & Vero, S. (Eds.). (2006). *Control Biológico de Patógenos de Plantas*. Montevideo: Unidad de Educación Permanente.
- Morales, H., Sanchis, V., Usall, J., Ramos, A., & Marín, S. (2008). Effect of biocontrol agents *Candida sake* and *Pantoea agglomerans* on *Penicillium expansum* growth and patulin accumulation in apples. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 61–67.
- Morath, S. U., Hung, R., & Bennett, J. W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Review*, 26, 73–83.
- Mori, Y., Ishikawa, S., Ohnishi, H., Shimatani, M., Morikawa, Y., Hayashi, K., ... Hikichi, Y. (2018). Involvement of ralfuranones in the quorum sensing signalling pathway and virulence of *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology*, 19(2), 454–463.

- Moussout, H., Ahlafi, H., Aazza, M., & Bourakhouadar, M. (2016). Kinetics and mechanism of the thermal degradation of biopolymers chitin and chitosan using thermogravimetric analysis. *Polymer Degradation and Stability*, *130*, 1–9.
- Nanguy, S. P., Perrier-Cornet, J. Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2010). Impact of water activity of diverse media on spore germination of *Aspergillus* and *Penicillium* species. *International Journal of Food Microbiology*, *142*, 273–276.
- Neto, C. G. T., Giacometti, J. A., Job, A. E., Ferreira, F. C., Fonseca, J. L. C., & Pereira, M. R. (2005). Thermal analysis of chitosan based networks. *Carbohydrate Polymers*, *62*(2), 97–103.
- Nickerson, K. W., Atkin, A. L., & Hornby, J. M. (2006). Quorum Sensing in Dimorphic Fungi: Farnesol and Beyond. *Microbiology. Applied Environmental*, *72*, 3805–3813.
- Normas para la producción integrada de manzano.* (2018).
- Nunes, C. A. (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. *European Journal of Plant Pathology*, *133*(1), 181–196.
- Owens, D. K., & Wendt, R. C. (1969). Estimation of the surface free energy of polymers. *Journal of Applied Polymer Science*.
- Palma-Guerrero, J., Lopez-Jimenez, J., Pérez-Berná, A., Huang, I.-C., Jansson, H.-B., Salinas, J., ... Lopez-Llorca, L. (2010). *Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan.* *Mol. Microbiol.*, *75*(4), 1021–1032.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2015). Biocontrol ability and action mechanism of food-isolated yeast strains against *Botrytis cinerea* causing post-harvest bunch rot of table grape. *Food Microbiology*, *47*, 85–92.
- Parafati, L., Vitale, A., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Performance evaluation of volatile organic compounds by antagonistic yeasts immobilized on hydrogel spheres against gray, green and blue postharvest decays. *Food Microbiology*, *63*, 191–198.
- Park, M. J., Gwak, K. S., Yang, I., Choi, W. S., Jo, H. J., Chang, J. W., ... Choi, I. G. (2007). Antifungal activities of the essential oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. *Journal of Microbiology*, *45*, 460–465.
- Park, S. C., Nah, J. W., & Park, Y. (2011). pH-dependent mode of antibacterial actions of low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC) against various pathogens. *Macromolecular Research*, *19*, 853–860.
- Park, S. Y., Marsh, K. S., & Rhim, J. W. (2002). Characteristics of Different Molecular Weight Chitosan Films Affected By the Type of Organic Solvents. *Journal of Food Science: Food Engineering and Physicall Properties*, *67*(1), 194–197.
- Paterson, M., & Kennedy, J. F. (2003). Chitin and chitosan. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications. *Carbohydrate Polymers*.
- Pech, J. C., Purgatto, E., Girardi, C. L., Rombaldi, C. V., & Latché, A. (2013). Current challenges in postharvest biology of fruit ripening. *Current Agricultural Science Technology*, *19*, 1–18.
- Pedrido, M. E., de Oña, P., Ramirez, W., Leñini, C., Goñi, A., & Grau, R. (2013). Spo0A links de novo fatty acid synthesis to sporulation and biofilm development in *Bacillus*

- subtilis. *Molecular Microbiology*, 87, 348–367.
- Pelser, P., & Eckert, J. W. (1977). Constituents of orange juice that stimulate the germination of conidia of *Penicillium digitatum*. *Phytopathology*, 67, 747–754.
- Pianzola, M. J., Moscatelli, M., & Vero, S. (2004). Characterization of *Penicillium* Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. *Plant Disease*, 88(1), 23–28.
- Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34, 641–678.
- Pimenta, R. S., Morais, P. B., Rosa, C. A., & Corrêa, A. (2009). Utilization of yeasts in biological control programs. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 199–214).
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M. M., & Shirai, K. (2003). Effect of Chitosan and Temperature on Spore Germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*.
- Prusky, D., McEvoy, J. L., Saftner, R., Conway, W. S., & Jones, R. (2004). Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. *Phytopathology*, 94(1), 44–51.
- Pu, L., Jingfan, F., Kai, C., Chao-an, L., & Yunjiang, C. (2014). Phenylethanol promotes adhesion and biofilm formation of the antagonistic yeast *Kloeckera apiculata* for the control of blue mold on citrus. *FEMS Yeast Research*, 14, 536–546.
- Qin, G., Tian, S., & Xu, Y. (2004). Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 31, 51–58.
- Qin, GZ, Tian, S., Xu, Y., & WanYK. (2003). Enhancement of biocontrol efficacy of antagonistic yeasts by salicylic acid in sweet cherry fruit. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62(3), 147–154.
- Quyen, D. T. M., Adisak, J., & Rachtanapun, P. (2012). Relationship between Solubility, Moisture Sorption Isotherms and Morphology of Chitosan/methylcellulose Films with Different Carbendazim Content. *Journal of Agricultural Science*, 4(6), 187–196.
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 50(1), 403–424.
- Rahman, M. H., Hjeljord, L. G., Aam, B. B., Sørli, M., & Tronsmo, A. (2015). Antifungal effect of chito-oligosaccharides with different degrees of polymerization. *European Journal of Plant Pathology*, 141, 147–158.
- Ribeiro, C., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., & Miranda, C. (2007). Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biology and Technology*, 44(1), 63–70.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603–632.
- Roberts, D. A., & Boothroyd, C. W. (1984). Fundamentals of Plant Pathology. In *Fundamentals of Plant Pathology* (2nd ed.). New York: Freeman and Co.

- Roberts, R. G. (1990). Postharvest biological control of gray mold of apple by *Cryptococcus laurentii*. *Phytopatology*, 80, 526–530.
- Robiglio, A., Sosa, M. C., Lutz, M. C., Lopes, C. A., & Sangorrín, M. P. (2011). Yeast biocontrol of fungal spoilage of pears stored at low temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 147(3), 211–216.
- Romanazzi, G., Lichter, A., & Gabler, F. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 141–147.
- Romanazzi, G., Nigro, F., & Ippolito, A. (2003). Short hypobaric treatments potentiate the effect of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. *Postharvest Biology and Technology*, 29(1), 73–80.
- Romanazzi, Gianfranco. (2010). Chitosan treatment for the control of postharvest decay of table grapes, strawberries and sweet cherries. *Fresh Produce*, 4(1), 111–115.
- Romanazzi, Gianfranco, Gabler, F. M., Margosan, D., MacKey, B. E., & Smilanick, J. L. (2009). Effect of chitosan dissolved in different acids on its ability to control postharvest gray mold of table grape. *Phytopathology*, 99(9), 1028–1036.
- Rosa, G. S., Moraes, M. A., & Pinto, L. A. A. (2010). Moisture sorption properties of chitosan. *LWT - Food Science and Technology*, 43(3), 415–420.
- Rueda, D. (1999). Differences in the interaction of water with starch and chitosan films as revealed by infrared spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Carbohydrate Polymers*, 40(1), 49–56.
- Ruisi, S., Barreca, D., Selbmann, L., Zucconi, L., & Onofri, S. (2007). Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 6(1–3), 127–141.
- Ruzicka, F.; Holá, V.; Votava, M.; Tejkalová, R. (2007). Importance of Biofilm in *Candida parapsolopsis* and Evaluation of Its Susceptibility to Antifungal Agents by Colorimetric Method. *Folia Microbiologica*, 52(3), 209–214.
- Saligkarias, I., Gravanis, F., & Epton, H. (2002). Biological control of *Botrytis cinerea* on tomato plants by the use of epiphytic yeasts *Candida guilliermondii* strains 101 and US 7 and *Candida oleophila* strain I-182: in vivo studies. *Biological Control*, 25, 143–150.
- Sansone, G., Rezza, I., Calvente, V., Benuzzi, D., & Sanz de Tosetti, M. I. (2005). Control of *Botrytis cinerea* strains resistant to iprodione in Apple with rhodotorulic acid and yeasts. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 245–251.
- Santacruz, S., Rivadeneira, C., & Castro, M. (2015). Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*, 49, 89–94.
- Santos, A., & Marquina, D. (2004). Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, 150, 2527–2534.
- Saravanakumar, D, Ciavorella, A., Spadaro, D., & Garibaldi, A. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biology and Technology*, 49(121–128).

- Saravanakumar, Duraisamy, Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2009). Detection of enzymatic activity and partial sequence of a chitinase gene in *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 used as postharvest biocontrol agent. *European Journal of Plant Pathology*, 123(2), 183–193.
- Schena, L., Nigro, F., Pentimone, I., Ligorio, A., & Ippolito, A. (2003). Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Postharvest Biology and Technology*, 30, 209–220.
- Schwyn, B., & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47–56.
- Segarra, G., Casanova, E., Avilés, M., & Trillas, I. (2010). *Trichoderma asperellum* Strain T34 Controls Fusarium Wilt Disease in Tomato Plants in Soilless Culture Through Competition for Iron. *Microbial Ecology*, 59(1), 141–149.
- Seymour, G. B., Ostergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S., & Martin, C. (2013). Fruit development and ripening. *Annual Review of Plant Biology*, 64, 219–241.
- Sharma, N., Sharma, S., & Prabha, B. (2013). Postharvest Biocontrol - New concepts and application. In *Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies* (pp. v–vi).
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205–221.
- Sharpe, L. H., & Schonhorn, H. (1964). Surface energetics, adhesion and adhesive joints. *Advances in Chemistry*, (12), 189–201.
- Singh, D. (2002). Bioefficacy of *Debaryomyces hansenii* on the incidence and growth of *Penicillium italicum* on Kinnow fruit in combination with oil and wax emulsions. *Ann Plant Protect Sci. Annals of Plant Protection Sciences*, 10, 72–276.
- Singh, D. (2004). Effect of *Debaryomyces hansenii* and calcium salt on fruit rot of peach (*Rhizopus macrosporus*). *Annals of Plant Protection Sciences*, 12(2), 310–313.
- Singh, D. (2005). Interactive effect of *Debaryomyces hansenii* and calcium chloride to reduce *Rhizopus* rot of peaches. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 35(1), 118–121.
- Sivakumar, D., Bill, M., Korsten, L., & Thompson, K. (2016). Integrated Application of Chitosan Coating with Different Postharvest Treatments in the Control of Postharvest Decay and Maintenance of Overall Fruit Quality. In *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*.
- Skurtys, O., Velásquez, P., & Osorio, F. (2015). Wetting behavior of Chitosan Solutions on blueberry epicarp with or without epicuticular waxes. *Food Engineering Series*, 44(6), 509–518.
- Slavutsky, A. M., & Bertuzzi, M. A. (2015a). Formulation and characterization of nanolaminated starch based film. *LWT - Food Science and Technology*, 61(2), 407–413.
- Slavutsky, A. M., & Bertuzzi, M. A. (2015b). Thermodynamic study of water sorption and water barrier properties of nanocomposite films based on brea gum. *Applied Clay Science*, 108, 144–148.

- Slavutsky, A. M., & Bertuzzi, M. A. (2016). Improvement of water barrier properties of starch films by lipid nanolamination. *Food Packaging and Shelf Life*, 7, 41–46.
- Sothornvit, R., Hong, S. I., An, D. J., & Rhim, J. W. (2010). Effect of clay content on the physical and antimicrobial properties of whey protein isolate/organo-clay composite films. *LWT - Food Science and Technology*, 43(2), 279–284.
- Spadaro, D., & Droby, S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: The importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends in Food Science and Technology*, 47, 39–49.
- Spadaro, D., Vola, R., Piano, S., & Gullino, M. L. (2002). Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 123–134.
- Spadoni, A., Neri, F., & Mari, M. (2015). Physical and Chemical Control of Postharvest Diseases. In *Contemporary Food Engineering. Advances in Postharvest Fruit and Vegetable Technology* (pp. 89–116).
- Srinivasa, P. C., Ramesh, M. N., & Tharanathan, R. N. (2007). Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 21(7), 1113–1122.
- Sui, Y., & Liu, J. (2014). Effect of glucose on thermotolerance and biocontrol efficacy of the antagonistic yeast *Pichia guilliermondii*. *Biological Control Control*, 74, 59–64.
- Suzzi, G., Romano, P., Ponti, I., & Montuschi, C. (1995). Natural wine yeasts as biocontrol agents. *Journal of Applied Bacteriology*, 78, 304–308.
- Tannières, M., Lang, J., Barnier, C., Shykoff, J., & Faure, D. (2017). Quorum-quenching limits quorum-sensing exploitation by signal-negative invaders. *Scientific Reports*, 7, 40126.
- Tannous, J., Atoui, A., El Khoury, A., Kantar, S., Chdid, N., Oswald, I. P., ... Lteif, R. (2015). Development of a real-time PCR assay for *Penicillium expansum* quantification and patulin estimation in apples. *Food Microbiology*.
- Tantala, J., Rachtanapun, C., Tongdeesoontorn, W., Jantanasakulwong, K., & Rachtanapun, P. (2019). Moisture Sorption Isotherms and Prediction Models of Carboxymethyl Chitosan Films from Different Sources with Various Plasticizers. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2019.
- Tian, S. P., Fan, Q., Xu, Y., Qin, G. Z., & Liu, H. B. (2002). Effect of biocontrol antagonists applied in combination with calcium on the control of postharvest diseases in different fruit. *Bulletin-OILB/SROP* 25, 10, 193–196.
- Tian, S., Qin, G., Xu, Y., & Wang, Y. (2004). Application of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. *Acta Bot Sin. Acta Botanica Sinica*, 46, 1324–1330.
- Tilocca, B., Balmas, V., Hassan, Z., Jaoua, S., & Migheli, Q. (2019). A proteomic investigation of *Aspergillus carbonarius* exposed to yeast volatiles or to its major component 2-phenylethanol reveals major shifts in fungal metabolism. *International Journal of Food Microbiology*, 306, 108265.
- Timmermann, E. O., Chirife, J., & Iglesias, H. A. (2001). Water sorption isotherms of foods and foodstuffs: BET or GAB parameters? *Journal of Food Engineering*, 48(1),

- 19–31.
- Toivonen, P. M. A. (2007). Fruit maturation and ripening and their relationship to quality. *Stewart Postharvest Review*, 3(2), 1–5.
- Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32(3), 235–245.
- Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, (32), 235–245.
- Tronsmo, A., & Dennis, C. (1977). The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83(1 Supplement), 449–455.
- Tunc, S., Angellier, H., Cahyana, Y., Chalier, P., Gontard, N., & Gastaldi, E. (2007). Functional properties of wheat gluten/montmorillonite nanocomposite films processed by casting. *Journal of Membrane Science*, 289(1–2), 159–168.
- Usall, J., Ippolito, A., Sisquella, M., & Neri, F. (2016). Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Postharvest Biology*, 122, 30–40.
- Velásquez, P., Skurtys, O., Enrione, J., & Osorio, F. (2011). Evaluation of Surface Free Energy of Various Fruit Epicarps Using Acid–Base and Zisman Approaches. *Food Biophysics*, 6(3), 349–358.
- Verlee, A., Mincke, S., & Stevens, C. V. (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 164, 268–283.
- Vero, S., Garmendia, G., Garat, M. F., De Aurrecochea, I., & Wisniewski, M. (2011). *Cystofilobasidium infirmominiatum* as a biocontrol agent of postharvest diseases on apples and citrus. *Acta Horticulturae*, 905, 169–180.
- Vero, S., Mondino, P., Burgueño, J., Soubes, M., & Wisniewski, M. (2002). Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biology and Technology*, 26, 91–98.
- Vero, S. (2006). Mecanismos de biocontrol. In P Mondino & S. Vero (Eds.), *Control Biológico de Patógenos de Plantas* (p. 158). Montevideo: Comisión Sectorial de Educación Permanente, Udelar.
- Vero, Silvana, Garmendia, G., González, M. B., Bentancur, O., & Wisniewski, M. (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus × domestica*). *FEMS Yeast Research*, 13, 189–199.
- Vero, Silvana, Garmendia, G., González, M. B., Garat, M. F., & Wisniewski, M. (2009). *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Science and Technology*, 19(10), 1033–1049.
- Viñas, I., Usall, J., Teixido, N., Fons, E., & Ochoa-de-Eribe, J. (1996). Successful biological control of the major postharvest diseases on apples and pears with a new strain of *Candida sake*. *British Crop Protection Conference, Pests and Diseases*, 6, 603–608.
- Viñas, I., Usall, J., Teixidó, N., & Sanchis, V. (1998). Biological control of major

- postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *International Journal of Food Microbiology*, 40(1–2), 9–16.
- Vivekananthan, R., Ravi, M., Saravanakumar, D., Kumar, N., Prakasam, V., & Samiyappan, R. (2004). Microbially induced defense related proteins against postharvest anthracnose infection in mango. *Crop Protection*, 23(11), 1061–1067.
- Wang, W., Bo, S., Li, S., & Qin, W. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*.
- Wang, Y., Wang, P., Xia, J., Yu, T., Lou, B., Wang, J., & Zheng, X. D. (2010). Effect of water activity on stress tolerance and biocontrol activity in antagonistic yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3), 103–108.
- Watkins, C., Kupferman, E., & Rosenberger, D. (2004). *Apple the commercial storage of fruits, vegetables, and florist and nursery stocks*.
- Wei, Y., Mao, S., & Tu, K. (2014). Effect of preharvest spraying *Cryptococcus laurentii* on postharvest decay and quality of strawberry. *Biological Control*, 73, 68–74.
- Weiler, F., & Schmitt, J. (2003). Zygoicin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Research*, 3(1), 69–76.
- Wilson, C., & Pusey, P. (1985). Potential for biological control of postharvest plant diseases. *Plant Disease*, 69(5), 375–378.
- Wilson, C., Wisniewski, M., Droby, S., & Chalutz, E. (1993). A selection strategy for microbial antagonists to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Scientia Horticulturae*, 53, 183–189.
- Wilson, C.L., & Chalutz, E. (1989). Postharvest biocontrol of *Penicillium* rots of citrus with antagonistic yeasts and bacteria. *Scientia Horticulturae*, 40, 105–112.
- Wilson, C L, & Wisniewski, M. E. (1989). Biological Control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: An Emerging Technology. *Annual Review of Phytopathology*, 27(1), 425–441.
- Wilson, Charles L., Wisniewski, M. E., Biles, C. L., McLaughlin, R., Chalutz, E., & Droby, S. (1991). Biological control of post-harvest diseases of fruits and vegetables: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Protection*, 10(1), 172–177.
- Wisniewski, M, Wilson, C., Droby, S., Chalutz, E., El Ghaouth, A., & Stevens, C. (2007). Postharvest biocontrol: new concepts and applications. In C. Vincent, M. S. Goettel, & G. Lazarovits (Eds.), *Biological Control: A Global Perspective* (pp. 262–273).
- Wisniewski, ME, & Wilson, C. (1994). Biological control of postharvest diseases: theory and practice. *CRC Press*.
- Wisniewski, Michael, Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., & Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39, 245–258.
- Wisniewski, Michael, Droby, S., Norelli, J., Liu, J., & Schena, L. (2016). Alternative

- management technologies for postharvest disease control: The journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 3–10.
- Wittig, H. P. P., Johnson, K. B., & Pscheidt, J. W. (1997). Effect of epiphytic fungi on brown rot, blossom blight and latent infections in sweet cherry. *Plant Disease*, 81, 383–387.
- Xi, L., & Tian, S. P. (2005). Control of postharvest diseases of tomato fruit by combining antagonistic yeast with sodium bicarbonate. *Scientia Agricultura Sinica*, 38(5), 950–955.
- Xu, W. T., Huang, K. L., Guo, F., Qu, W., Yang, J. J., Liang, Z. H., & Luo, Y. B. (2007). Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology*, 46(1), 86–94.
- Xu, X., Qin, G., & Tian, S. (2008). Effect of microbial biocontrol agents on alleviating oxidative damage of peach fruit subjected to fungal pathogen. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1–2), 153–158.
- Yang, L. Y., Zhang, J. L., Bassett, C. L., & Meng, X. H. (2012). Difference between chitosan and oligochitosan in growth of *Monilinia fructicola* and control of brown rot in peach fruit. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 254–259.
- Yao, H. J., & Tian, S. P. (2005). Effects of pre- and post-harvest application of salicylic acid or methyl jasmonate on inducing disease resistance of sweet cherry fruit in storage. *Postharvest Biology and Technology*, 35, 253–262.
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., & Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 57–63.
- Yu, T., Li, H. Y., & Zheng, X. D. (2007). Synergistic effect of chitosan and *Cryptococcus laurentii* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3), 261–266.
- Yu, T., Yu, C., Chen, F., Sheng, K., Zhou, T., Zunun, M., ... Zheng, X. (2012). Integrated control of blue mold in pear fruit by combined application of chitosan, a biocontrol yeast and calcium chloride. *Postharvest Biology and Technology*, 69, 49–53.
- Zawadzki, J., & Kaczmarek, H. (2010). Thermal treatment of chitosan in various conditions. *Carbohydrate Polymers*, 80(2), 394–400.
- Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. (2010). Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control*, 54, 172–180.
- Zhang, Dianpeng, Spadaro, D., Valente, S., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2011). Cloning, characterization and expression of an exo-1,3- β -glucanase gene from the antagonistic yeast, *Pichia guilliermondii* strain M8 against grey mold on apples. *Biological Control*, 59(2), 284–293.
- Zhang, H., Zheng, X., Fu, C., & Xi, Y. (2005). Postharvest biological control of gray mold rot of pear with *Cryptococcus laurentii*. *Postharvest Biology and Technology*, 35(1), 79–86.
- Zhang, H, Ma, L., Turner, M., Xu, H., Dong, Y., & Jiang, S. (2009). Methyl jasmonate enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula glutinis* to postharvest blue mold decay

- of pears. *Food Chemistry*, 117(4), 621–626.
- Zhang, H, Yang, Q., Lin, H., Ren, X., Zhao, X., & Hou, J. (2013). Phytic acid enhances biocontrol efficacy of *Rhodotorula mucilaginosa* against postharvest gray mold spoilage and natural spoilage of strawberries. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 110–115.
- Zhang, H, Zheng, X., Wang, L., Li, S., & Liu, R. (2007). Effect of antagonist in combination with hot water dips on postharvest *Rhizopus* rot of strawberries. *J Food Engin. Journal of Food Engineeringin*, 78, 281–287.
- Zhang, H, Zheng, X., & Yu, T. (2007). Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*. *Food Control*, 18, 287–291.
- Zhang, Hongyin, Wang, L., Dong, Y., Jiang, S., Zhang, H., & Zheng, X. (2008). Control of postharvest pear diseases using *Rhodotorula glutinis* and its effects on postharvest quality parameters. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1–2), 167–171.
- Zhimo, V., Bhutia, D., & Saha, J. (2016). Biological control of post harvest fruit diseases using antag- onistic yeasts in India. *Journal of Plant Pathology*, 98, 275–283.
- Ziani, K., Fernández-Pan, I., Royo, M., & Maté, J. I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2309–2314.
- Ziani, K., Oses, J., Coma, V., & Maté, J. I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT - Food Science and Technology*, 41(10), 2159–2165.
- Zinoviadou, K. G., Koutsoumanis, K. P., & Biliaderis, C. G. (2010). Physical and thermo-mechanical properties of whey protein isolate films containing antimicrobials, and their effect against spoilage flora of fresh beef. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 49–59.
- Zisman, W. A. (1964). In Contact Angle, Wettability, and Adhesion. In *U.S. Naval Reserch Laboratory*.

APÉNDICE

SIGMA-ALDRICH®

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaaldrich.com

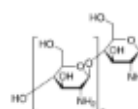
Email USA: techserv@sigmaaldrich.com

Outside USA: eurtechserv@sigmaaldrich.com

Product Specification

Product Name:
Chitosan – low molecular weight

Product Number: 448869
CAS Number: 9012-76-4
MDL: MFCD00181512



TEST	Specification
Appearance (Color)	Faint Beige to Beige
Appearance (Form)	Conforms to Requirements
Powder and/or Chips	
Assay	≥ 75 %
Deacetylation	
Viscosity	20 - 300 cps
c = 1% in 1% Acetic Acid	

Specification: PRD.2.ZQ5.10000020770

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

SIGMA-ALDRICH

sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA

Website: www.sigmaldrich.com

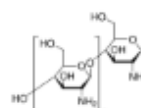
Email USA: techserv@aldrich.com

Outside USA: eurtechserv@aldrich.com

Product Specification

Product Name:
Chitosan - medium molecular weight

Product Number: 448877
CAS Number: 9012-76-4
MDL: MFCD00181512



TEST	Specification
Appearance (Color)	Off White to Beige and Faint Brown to Light Brown
Appearance (Form)	Conforms to Requirements
Powder and/or Chips	
Deacetylation	75 - 85 %
Viscosity	200 - 800 cps
c = 1%, 1% Acetic Acid	
Specification: PRD.1.ZQ5.10000030084	

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

ANEXOS

ANEXO 1 – MEDIOS DE CULTIVO

AJM (Agar Jugo de Manzana)

Jugo de manzana (Conaprole)..... 1 L

Agar20 g

Previo al agregado del agar se ajusta el pH del jugo a 4,5 con NaOH 0,1 N.

Agar Pectina

Se prepara medio YNB con agregado de 1 g de pectina cada 100 mL solución.

Agar Quitina

Medio YNB.....150 g

Quitina coloidal.....15 g

Agar..... 15g

Agua destilada..... 1 L

Quitina coloidal

Se pesan 0,5 g de quitina molida (Sigma) se agregan 5 mL de ácido fosfórico 85 % y se mezclan bien. Se deja toda la noche a 4 °C. Se lava adicionando agua en exceso. Se filtra por papel de filtro y se continúa lavando con agua corriente hasta eliminar el ácido. El material obtenido se pasa a un frasco y se suspende en 100 mL de agua destilada.

Medio para producción de sideróforos (Schwyn & Neilands, 1987)Buffer Pipes

Pipes.....15 g

Agua destilada..... 900 mL

Llevar a pH 6,8

Medio base (Medio de Grimm y Allen) (Baakza et al., 2004)

K₂SO₄..... 1 g

Acetato de amonio..... 900 mL

K₂HPO₄..... 3 g

Ácido cítrico..... 1 g

Sacarosa..... 20 g

Agar..... 15 g

Agua destilada..... 1 L

Suplementar con tiamina (2 mg), CuSO₄.5H₂O (0,005 mg), MnSO₄.H₂O (0,035 mg), ZnSO₄.7H₂O (2 mg) y MgSO₄.7H₂O (80 mg).

Solución colorante

Preparar por separado y en el orden indicado las siguientes soluciones:

Solución 1:

CAS..... 30,2 mg

Agua destilada..... 20 mL

FeCl₃, 1mM en HCl 10 mM..... 5 mL

Solución 2:

CTAB..... 36,5 mg

Agua destilada..... 20 mL

Mezclar las dos soluciones anteriores para formar la solución colorante

Preparación

Para preparar el medio CAS, se preparan 90 mL de medio base con buffer pipes en lugar de agua y se autoclava. Se prepara la solución colorante, se autoclava y se agregan 11 mL de dicha solución a 100 mL de medio base.

YES (Yeast Extract Sucrose)

Extracto de levadura..... 4 g

Sacarosa.....20 g

Agua destilada.....1 L

ANEXO 2 – PUBLICACIÓN



Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples



E. Arrarte^{a,*}, G. Garmendia^a, C. Rossini^b, M. Wisniewski^c, S. Vero^a

^a Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay

^b Laboratorio de Ecología Química, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay

^c U.S. Department of Agriculture-Agricultural Research Service (USDA-ARS), 2217 Wiltshire Road, Kearneysville, WV, United States

HIGHLIGHTS

- Psychrotrophic yeasts isolated from Antarctica were used as biocontrol agents.
- VOCs produced by *Candida sake* strains inhibited apple pathogens.
- The VOCs produced by *C. sake* 41E were identified using SPME GC–MS.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 December 2016

Revised 28 February 2017

Accepted 1 March 2017

Available online 3 March 2017

Keywords:

Antifungal VOCs

Biocontrol

Penicillium expansum

Candida sake

Postharvest

Apples

ABSTRACT

In this study the strategy of isolating psychrotrophic, non-pectinolytic yeasts able to grow in apple juice as potential biocontrol agents was a successful approach. Thirty-four yeasts isolated from Antarctic were able to maintain rot incidence caused by *P. expansum* and *B. cinerea* under 25% on apples stored at 0–1 °C. Two of the isolates, identified as *Candida sake*, produced antifungal volatile organic compounds (VOCs) which inhibited the growth of five pathogens of apple (*P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, and *A. arborescens*). This is the first report of VOCs produced by *C. sake*, as well as the first study of the inhibitory activity of VOCs produced by yeasts against species of *Alternaria* that cause postharvest apple rot.

In vitro studies were performed on Apple Juice Agar at 0 °C and 25 °C due to the importance of evaluating antifungal activity in similar conditions to where the biocontrol agent are intended to be used. The VOCs produced by *Candida sake* strain 41E were also effective on *in vivo* assays to control *P. expansum* in Red Delicious apples.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

In the southern hemisphere, apples are harvested from February to April. In order to provide fruit throughout the whole year, maintain quality and reduce spoilage, apples are stored at low temperature (0–1 °C). The development of fungal rots, mainly by *Penicillium expansum* (Romano et al., 1983), however, cannot be avoided. Other fungal pathogens such as *Botrytis cinerea* (Rosenberger, 1990) and *Alternaria* spp. (*A. alternata*, *A. tenuissima*, and *A. arborescens*) (Serdani et al., 2002; Kou et al., 2014; Jurick II et al., 2014) have also been reported to cause fruit decays in cold storage. The application of postharvest fungicides to apples prior to being placed in storage is the main management strategy used

to decrease fruit losses due to decay. In Uruguay, integrated production guidelines (Scatoni et al., 2005) recommend the use of three synthetic fungicides (iprodione, imazalil, and captan) to control postharvest diseases of apples when fruit is to be stored for more than 3 months. Due to consumer demands to reduce chemical residues in food and concern about the environment, there has been great interest in developing alternative control methods. In this regard, biological control has received considerable attention as a potential alternative (Wisniewski et al., 2016; Droby et al., 2016; Vero et al., 2009).

In order to prevent the development of fungal pathogens on apples during cold storage a biocontrol agent must be able to grow and colonize fruits at low temperatures. Thus, the strategy of isolating psychrotrophic microorganisms from cold environments and evaluating them for their biocontrol potential is a logical approach. Other characteristics, such as the ability to readily

* Corresponding author.

E-mail address: earrarte@fq.edu.uy (E. Arrarte).

colonize apple wounds, which are the main infection court of necrotrophic, decay pathogens, and the inability of the biocontrol agent to produce pectinolytic enzymes that could degrade apple tissue should be taken into account in the selection of an antagonist. Other mechanisms, including nutrient competition, the production of soluble or volatile inhibitory metabolites, direct hyphal parasitism, and the induction of host resistance have also been demonstrated to play a meaningful role in the biocontrol of postharvest pathogens by microbial antagonists (Wisniewski et al., 1991; Vero et al., 2002; Droby et al., 2002; Mohamed & Saad, 2009; Tongsri and Sangchote, 2009; Huang et al., 2011; Romanazzi et al., 2016; Spadaro and Droby, 2016; Liu et al., 2017).

Among the various modes of action of postharvest biocontrol agents, the production of antifungal volatile organic compounds (VOCs) by postharvest biocontrol agents (Batista Fialho et al., 2010; Huang et al., 2012, 2011; Di Francesco et al., 2015; Mari et al., 2016) has been receiving increased attention. VOC-producing microorganisms have the potential to be used as biofumigants direct or their active constituents can be used independently. The use of VOC-producing microbes thus represents an attractive and logical strategy as an alternative approach for the control of postharvest diseases of produce, especially since commodities are stored in closed containers during storage and shipment. VOCs are low molecular weight, carbon-containing compounds with a low polarity, and a high vapor pressure (Vespermann et al., 2007; Bennett et al., 2012). They are produced by a wide range of microorganisms, including bacteria, molds and yeasts. Some VOCs have antimicrobial activity and some are involved in microbial interactions, acting as signaling and quorum sensing compounds (Bennett et al., 2012). Kanchiswamy et al. (2015) reported that there is evidence to suggest that microbial VOCs are ecofriendly and thus could be used in agricultural practices to prevent fungal pathogen development. The composition of the mixture of antifungal volatiles produced by a biocontrol agent needs to be comprehensively analyzed in order to ensure that they do not cause any known or perceived threats to humans, and the environment in general.

The present study focused on the identification and evaluation of psychrotrophic yeasts, isolated from water and soil samples from King George Island in the sub-Antarctic region, for their potential use as postharvest biocontrol agents for the control of postharvest diseases of apple stored at low temperature. In the course of the evaluation, the production of antifungal VOCs of all the selected isolates was examined. Additionally, the composition of VOCs were also evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Pathogens, biocontrol strains and biocontrol assay

Native strains of *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea*, previously isolated and identified from rotting apples (Pianzola et al., 2004; Gepp et al., 2012) were used in the current study, this strains were kept in agar slants covered with mineral oil at 4 °C. Additionally, isolates of *Alternaria alternata* CBS916.96, *Alternaria tenuissima* CBS 124.277, and *Alternaria arborescens* CBS 102.605 were obtained from the Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS, Wageningen, The Netherlands) and used in the present study.

2.1.1. Origin and selection of potential biocontrol agents

Sixty-one yeast strains isolated from soil and water samples collected in King George Island, South Shetland Islands, Antarctica, (62°02'558°21'W) in 2012 and 2013 were used in this study (Martínez et al., 2016). All strains were evaluated for their ability

to produce pectinolytic enzymes using the method described by Merin et al. (2011) with modifications. Briefly, Yeast Nitrogen Base (YNB) (Difco, Detroit, MI, USA) supplemented with 1% pectin as the only carbon source was used to detect enzymatic activity. Each strain was point inoculated on the medium and incubated at 25 °C for 48–72 h. Enzymatic activity was indicated by the formation of a clear halo around the colonies against a purple background after flooding the plate with Lugol's solution. Strains that produced pectinases were not subjected to any further evaluation. The non-pectinase-producing strains were then evaluated for their ability to grow in apple juice at low temperature (0 °C). Sterile apple juice was inoculated with each yeast suspension to reach a final concentration of 1×10^4 cell/mL and incubated at 0 °C for 4 days. Microbial growth was evaluated daily by measuring optical density (OD) at 600 nm.

2.1.2. Biocontrol assay

The selected yeast strains that were negative for pectinolytic activity and positive for growth at 0 °C were further evaluated for their biocontrol ability against *Penicillium expansum* and *Botrytis cinerea* in wounded 'Red Delicious' apples stored at 0–1 °C. Apples were first surface-disinfected with 70% ethanol. After drying, five wounds (4 mm deep \times 2 mm wide) were made along the equator of each apple. Each wound was then inoculated with 10 μ L of a yeast suspension made from a two-day-old PDA culture, that had been pelleted and added to sterile water to obtain a final concentration of 1×10^7 cell/mL. Cell concentrations were determined, adjusted, and confirmed by microscopic count in a Neubauer chamber. Control wounds were inoculated with 10 μ L of sterile water. Wounds were allowed to dry at room temperature for two hours and then subsequently inoculated with 10 μ L of a 1×10^4 conidia/mL conidial suspension of either *B. cinerea* or *P. expansum*. Six apples were used per treatment (n = 30). Apples were stored in a cold chamber at 0–1 °C for 3 months after which disease incidence (measured as the percentage of infected wounds) was evaluated. The statistical analysis of disease incidence was performed using a generalized linear model, assuming a binomial distribution, with a logit transformation (maximum likelihood). Treatments were compared by the DGC test (Di Rienzo et al., 2002) at a significance level of 0.05 using the InfoStat software package (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009).

2.2. Production of antifungal volatile compounds

Production of antifungal volatile compounds was determined as described by Huang et al. (2011) with some modifications. The center of petri plates (5 cm diameter) containing 5 mL of Apple Juice Agar (sterile apple juice at pH = 5 with 2% agar) (AJA) were inoculated with a mycelial agar plug (5 mm diameter) removed from a non-sporulating, one-day-old AJA culture of *P. expansum*. At the same time, another petri plate containing 5 mL of AJA was surface inoculated with 50 μ L of a yeast suspension of 1×10^7 cell/mL, evenly spread across the surface of the medium with a sterilized glass spreader. The lids of both petri plates (pathogen and yeast inoculated) were removed. The double dish sets (DDS) were joined and sealed using double layers of Parafilm® to make closed chambers. Negative controls consisted of DDSs prepared from plates inoculated with *P. expansum* covered with uninoculated AJA plates. All DDSs were incubated at 25 °C for 3 days. Three replicates for each treatment were used (n = 3). The pathogen colony diameter was measured after the incubation period. The percentage of inhibition of mycelial growth of *P. expansum* by the volatile compounds produced by the yeasts was calculated on the basis of the difference with the fungal colony diameter in control plates.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{\text{mycelial diameter in control} - \text{mycelial diameter in treatment}}{\text{mycelial diameter in control}} \times 100$$

The production of antifungal volatiles was also assayed at 25 °C against the following pathogens: *Botrytis cinerea*, *Alternaria tenuis-sima*, *Alternaria alternata*, and *Alternaria arborescens*. Production of antifungal volatiles at 0 °C was also evaluated for all of the listed pathogens. Strains that produced the greatest inhibition of pathogen mycelial growth were selected for further study.

2.3. Identification of the strains producing antifungal VOCs

The selected strains were identified to species level by sequencing and analyzing the D1/D2 variable domains of the large subunit of the rRNA gene in each strain. DNA extraction and amplification of the D1/D2 region was performed as described by Pereyra et al. (2014). Sequencing of the purified PCR products was performed at Macrogen Inc. (Seoul, Korea). The sequences obtained were queried against the GenBank database using the BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL (BLAST at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul et al., 1997). A difference <0.5% with a type-strain sequence was used as an identification criterion (Kurtzman, 2006).

2.4. Efficacy of the volatile organic compounds produced by selected yeast strains against *P. expansum* in apples

The ability of VOCs produced by the selected yeasts to inhibit *P. expansum* rot in Red Delicious apples was evaluated. The assay was conducted in sterilized, closed plastic boxes (13 × 10 × 9.5 cm, 1.2 L in volume). The box lids were filled with 40 mL of AJA, and 200 µL of a cell suspension of the selected strain (1 × 10⁷ cells/mL) was spread onto the surface of the culture medium with a sterilized glass spreader. Apples were first surface-disinfected with a 70% ethanol solution and then five wounds were made along the equator of each apple. Each wound was inoculated with 10 µL of a conidial suspension (1 × 10⁴ conidia/mL) of *P. expansum*. The apples were then placed in the box (one fruit per box) and a dish containing sterile water was placed in the bottom of the box to maintain high relative humidity. Controls consisted of inoculated apples placed in boxes and covered with lids containing AJA that had not been inoculated with any of the selected yeast strains. The boxes were sealed with triple layers of Parafilm® and incubated at either 25 °C or 0 °C for 7 or 30 days, respectively, after which disease incidence and severity were evaluated. Severity was measured as:

$$\text{Severity (\%)} = \frac{\text{lesion diameter in VOC treatment}}{\text{lesion diameter in control}} \times 100$$

Each treatment consisted of three replicates (n = 15). Incidence was determined as previously described in the biocontrol assay. Determination of statistical differences in severity were analyzed using a one-way ANOVA and differences between means were tested by a least significant difference (LSD) test, using InfoStat (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina, 2009).

2.5. Identification of volatile compounds produced by the selected yeast

The organic volatile compounds produced by the selected strain at 25 °C were identified. Four sets of DDSs containing AJA were prepared as described in section 2.2. One DDS was prepared using the selected yeast and the pathogen, as previously described. Two

DDSs were constructed using an uninoculated petri dish combined with a dish inoculated with the selected yeast or the pathogen. A final set of DDS, consisting of uninoculated AJA in both plates served as a control for the analysis of VOCs. Each treatment consisted of three replicates (n = 3). A 100 µm solid-phase microextraction polydimethylsiloxane fiber (Supelco) was used to capture and concentrate volatile compounds present in the headspace between the dishes. Fibers were conditioned prior to analyses according to the manufacturer's recommendations. After conditioning, the fiber was inserted between the dishes for 40 min at 25 °C in order to adsorb the volatile compounds. The fiber was then removed and the adsorbed volatile compounds were desorbed into the injection port of a Shimadzu QP2010 Plus gas chromatograph equipped with a DB-5MS column and coupled to a mass spectrometer (MS). GC was used in a splitless mode with the injector temperature set at 250 °C. The column temperature was set as follow: 40 °C for 1 min, and then increased at 5 °C/min to 270 °C, held at 270 °C for 1.3 min at 15 °C/min. Ultra-high purity helium, set at a flow rate of 1 mL/min, was used as a carrier gas. MS was operated in an electron ionization mode at 70 eV and 230 °C. Mass spectra were obtained using a scan modus with the total ion counts within the range of 50 to 550 m/z. Identification of the compounds was done by comparing the mass spectra and arithmetic retention times of the individual compounds with those for the standard compounds deposited in the database of the National Institute of Standards and Technology (NIST)/EPA/NIH library (NIST084) and Adams (2007).

3. Results

3.1. Selection of biocontrol agents

Twenty-five of the original sixty-one yeast isolates were discarded due to their ability to produce pectinases. The remaining 36 were all able to grow in apple juice at low temperature during 4 days of incubation at 0 °C, and were subsequently evaluated as biocontrol agents against *P. expansum* and *B. cinerea* in wounded 'Red Delicious' apples. All of the tested yeasts significantly reduced the disease incidence relative to the control (pathogen inoculation alone) (Figs. 1 and 2). In case of *B. cinerea*, all the isolates were able to reduce disease incidence below 25%, while with *Penicillium expansum*, disease incidence with two yeast isolates was above 25%.

3.2. Production of antifungal volatile compounds

Only two strains (41E and F36A) were capable of inhibiting mycelial growth of *P. expansum* by the production of volatile compounds in the DDSs incubated at 25 °C. The average percentage inhibition of mycelial growth was 60.3 ± 1.3% and 45.1 ± 1.4% with strains 41E and F36A, respectively. The inhibition exhibited by strain 41E was significantly higher (p = 0.05) than that of F36A (Fig. 3). Inhibition was also observed when the dual cultures in the DDSs were incubated at 0 °C, percentage inhibition values being 68.4 ± 4.7% and 28.7 ± 2.4% with the 41 E and F36A strains, respectively. The volatile compounds produced by strain 41E also inhibited the *in vitro* growth of *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. tenuis-sima* and *B. cinerea* when the DDSs were incubated at either 25 °C or 0 °C. Collectively, the percentage inhibition observed in colony

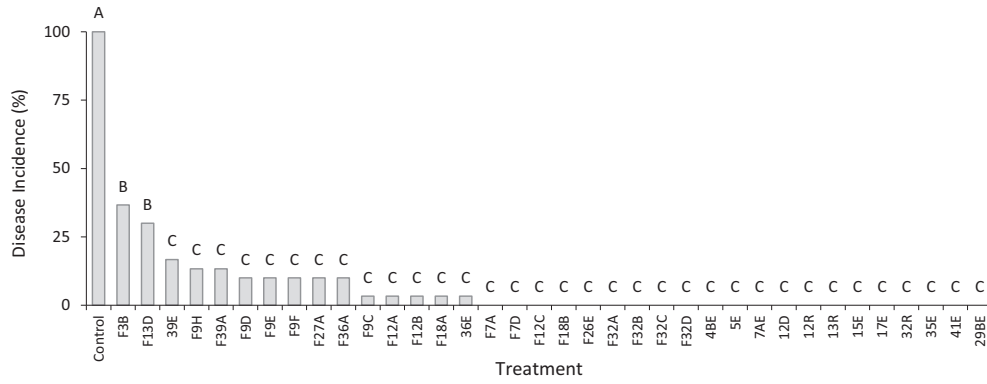


Fig. 1. Average percentage disease incidence in 'Red Delicious' apples inoculated with 10 μ L (1×10^7 cell/mL) suspension of a yeast strain (x axis) followed by inoculation of 10 μ L (1×10^4 conidia/mL) of a *Penicillium expansum* conidial suspension. The control was not treated with a yeast. Treatments with the same letter are not significantly different ($p = 0.05$), $n = 30$.

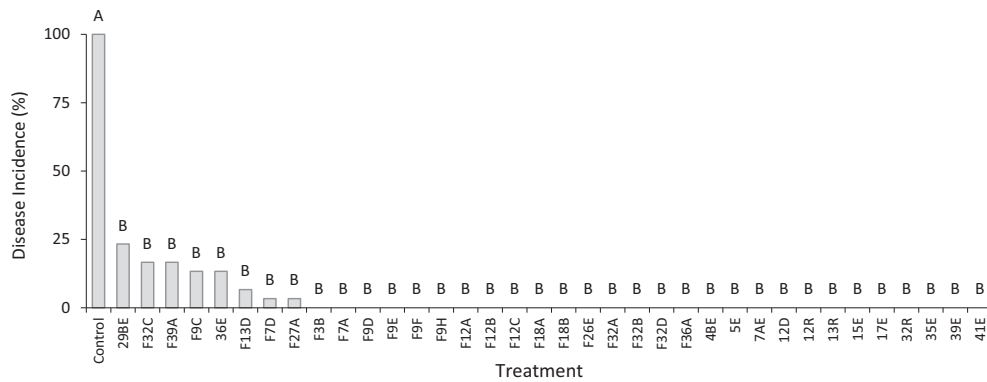


Fig. 2. Average percentage disease incidence in 'Red Delicious' apples inoculated with 10 μ L (1×10^7 cell/mL) suspension of a yeast strain (x axis) followed by inoculation of 10 μ L (1×10^4 conidia/mL) of a *Botrytis cinerea* conidial suspension. The control was not treated with a yeast. Treatments with the same letter are not significantly different ($p = 0.05$), $n = 30$.

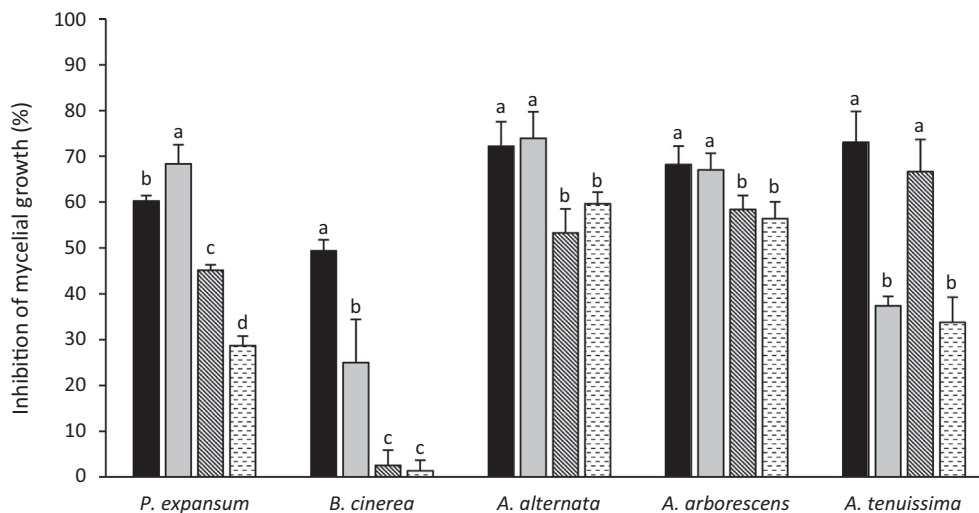


Fig. 3. Inhibition (%) of mycelial growth by VOCs produced by two yeast strains when the yeast and pathogen were co-cultured in double dish sets (DDS) containing apple juice agar (AJA). (■) Strain 41E at 25 °C, (□) strain 41E at 0 °C, (▨) strain F36A at 25 °C, (▩) strain F36A at 0 °C. For the same pathogen, values represented by the columns with the same letters are not significantly different ($p = 0.05$).

growth (diameter) of the pathogens ranged between 49 and 73% at 25 °C and between 25 and 74% at 0 °C (Fig. 3). In regards to strain F36A, *in vitro* growth of *A. alternata*, *A. arborescens*, and *A. tenuissima* was inhibited in the range of 53 to 67% at 25 °C and between

33 and 60% at 0 °C (Fig. 3). In the case of *Botrytis cinerea*, however, only a slight inhibition was observed at either temperature, and in each case was not significantly different from the control. In all cases, the level of inhibition resulting from the VOCs of strain

41E was significantly greater than the level obtained with the strain F36A.

3.3. Identification of selected strains

Both strains were identified as *Candida sake* based on using the obtained D1-D2 sequence as a query against the GenBank database (NCBI). In the case of strain F36A, the D1-D2 sequence was 100% homologous to the corresponding D1-D2 sequence of the type strain of *Candida sake* NRRL Y-1622, while strain 41E exhibited a difference of 2 nucleotides in its sequence. In both cases, the second nearest species identified was *Candida subhashii*, with sequences of the two yeast strains (F36A and 41 E) exhibiting a 93% homology to the D1-D2 sequence of the type strain of *C. subhashii*.

3.4. Efficacy of volatile organic compounds produced by *Candida sake* strain 41E against *P. expansum* infection of apples

The disease incidence on apples in the presence of the volatile compounds produced by *C. sake* 41E at 25 °C after seven days was 100% (Fig. 4A), however, the severity was reduced to 62% compared to the control (Fig. 4B). At 0 °C, the disease incidence after 30 days was reduced to 53% and the severity to 20% relative to the control (Fig. 4A and B).

3.5. Identification of volatile compounds produced by *Candida sake* strain 41E

Volatile compounds that were present in the headspace of three-day-old DDSs (containing AJA) of *C. sake* 41E were identified by GC–MS (Fig. 5). The VOCs present in the DDSs of *P. expansum* growing alone or DDS containing just AJA without any yeast or pathogen, were not considered to be produced by *C. sake*. Production of VOCs by *P. expansum* was not detected, since the chromatogram obtained from the DDS containing just AJA and the DDS inoculated with *P. expansum* were virtually identical (Fig. 5, c and d). The VOCs released by the yeast in the presence or absence of the pathogen were similar (Fig. 5, a and b). The identification of the 11 volatile compounds released by *C. sake* 41E are listed in Table 1. The most abundant compounds were 3-methylbutyl hexanoate, 3-methylbutylpentanoate, 2-methylpropyl hexanoate, and pentylhexanoate.

4. Discussion

The selection of psychrotrophic, non-pectinolytic yeasts able to grow in apple juice represents an efficient approach to identifying potential biocontrol agents for use in preventing postharvest diseases of apples placed in cold storage (0–1 °C). The yeasts identified using this approach were able to grow and colonize apple

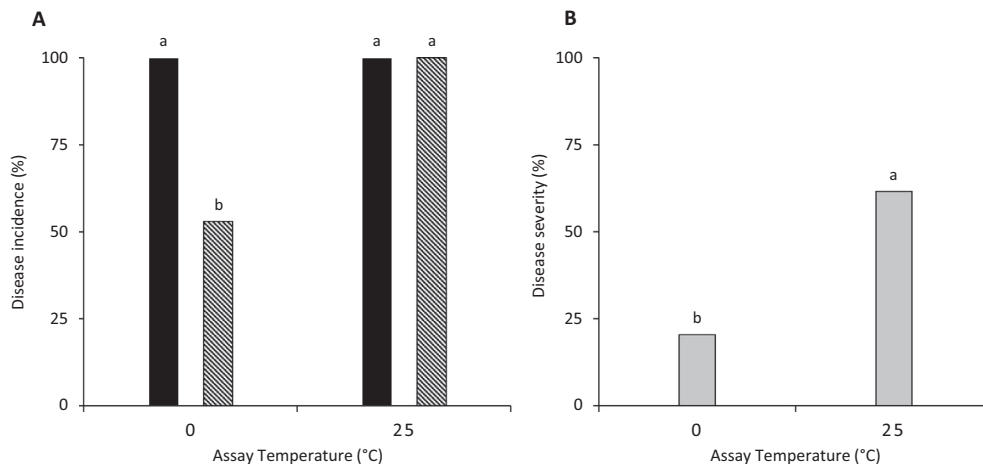


Fig. 4. A. (▨) *P. expansum* disease incidence (%) in the presence of volatiles compounds produced by *C. sake* 41E at 0 °C and 25 °C. (■) *P. expansum* disease incidence in absence of VOCs. B. *P. expansum* disease severity (%) in presence of volatiles compounds produced by *C. sake* 41E at 0 °C and 25 °C. Treatments with the same letters are not significantly different ($p = 0.05$).

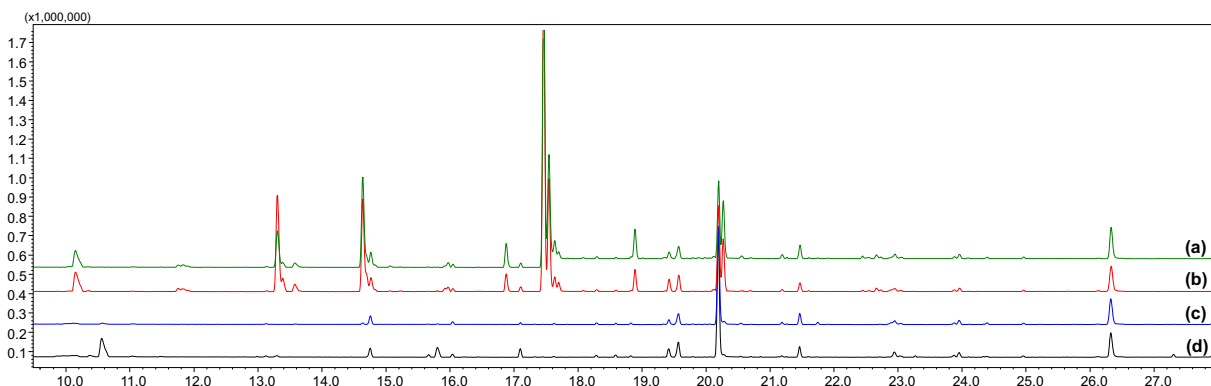


Fig. 5. Typical gas chromatography-mass spectrometry traces (total ion chromatograms) of VOCs collected in SPME. (a) double dish set (DDS) with *C. sake* 41E and *P. expansum*, (b) DDS with only *C. sake* 41 E, (c) DDS with only *P. expansum*, (d) DDS with just apple juice agar (AJA).

Table 1List of volatile compounds produced by apple juice agar cultures of *C. sake*, strain 41E.

RT (min) ^a	Rt ^b	% Similitude ^c	Possible compound	RA (%) ^d	MW ^e
10,153	1001	90	Ethyl hexanoate	3.45	144
13,304	1108	94	3-Methylbutyl pentanoate	29.05	172
13,575	1117	92	Phenylethyl Alcohol	2.09	122
14,640	1153	96	2-Methylpropyl hexanoate	11.16	172
16,878	1231	88	3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol	1.16	156
17,464	1252	96	3-Methylbutyl hexanoate	37.08	186
17,547	1256	95	Pentylhexanoate	9.68	186
17,704	1261	86	2-Phenylethyl acetate	0.47	228
18,894	1305	81	3-Methylbutyl Cyclopentanecarboxylate	1.24	184
20,270	1356	91	6-Octen-1-ol, 3,7-dimethyl-, propionate	3.80	212
22,660	1449	87	3-methylbutyl octanoate	0.82	214

^a Retention time in the GC.^b Arithmetic retention time (calculated following Adams, 2007).^c % similitude NIST.^d Relative peak area (%) based on the 11 compounds identified.^e Molecular weight.

wounds at low temperatures (0–1 °C), reducing the growth of fungal pathogens and inhibiting fruit decay. A similar strategy was previously used by Vero et al. (2012) in the isolation of five potential biocontrol yeasts from among isolates of psychrotrophic microflora of Antarctic soils, using a selective enrichment approach in 8–10 °C apple juice.

In the present study, 34 isolates, out of an original screening of 61 isolates, were able to exhibit a 75% reduction in the incidence of rots, relative to untreated controls, caused by *P. expansum* and *B. cinerea* in wounds of apple stored at 0 °C. Only two of the isolates, later identified as *Candida sake*, produced antifungal VOCs at both 25 °C and 0 °C, and which inhibited the growth of five pathogens of apple (*P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternata*, *A. tenuissima*, and *A. arborescens*) growing *in vitro* on apple juice agar (AJA). The level of inhibition of pathogen growth was strain dependent since the inhibition of all of the fungal pathogens by VOCs produced by *C. sake* strain 41E was significantly greater than the inhibition by *C. sake* F36A, except in the case of *A. tenuissima* which was inhibited equally by both yeasts at both temperatures. For example, *C. sake* F36A produced only a slight (2–3%), and statistically insignificant inhibition of mycelial growth of *B. cinerea*, while *C. sake* 41E inhibited greater than 25% of the pathogen growth at 0 °C and almost 50% at 25 °C. Differences in the inhibition of mold growth by VOCs produced by different strains of the same yeast species has been previously reported (Masoud et al., 2005). They reported significant differences in growth inhibition of *Aspergillus ochraceus* by VOCs produced by different strains of *Pichia anomala*. They also observed that inhibition of fungal growth depended on the media in which the yeasts were grown. Additionally, an effect of incubation temperature on the level of pathogen inhibition by VOCs produced by yeasts was reported by Huang et al. (2011). They observed that in dual cultures of *Candida intermedia* and *B. cinerea*, inhibition of the fungal pathogen was greater at 20 °C than at 4 °C. These results, and data from the current study, demonstrate the importance of evaluating the production of VOCs and the desired antifungal activity in environmental conditions similar to where the biocontrol agent and/or VOCs are intended to be used. Thus in the present study, inhibition studies were performed on AJA plates at both 0 °C and 25 °C in order to determine whether or not VOC production could be involved in the biocontrol activity of *C. sake* on apples placed in cold storage or at room temperature. In all cases, a greater level of fungal inhibition was observed at 25 °C, except in the inhibition of *P. expansum* by *C. sake* 41E. In this case, the inhibition of *P. expansum* was about 10% greater at 0 °C than at 25 °C. The VOCs produced by *Candida sake* 41E that were inhibitory to *P. expansum* *in vitro* were also confirmed to be antifungal *in planta* on wounded 'Red Delicious' apples. In that experiment, fungal inhibition was also greater at 0 °C, where a reduction

of approximately 50% in disease incidence was observed. Moreover, the severity of lesions caused by the pathogen were also significantly lower in apples exposed to the *C. sake* 41E VOCs at both temperatures.

The mixture of VOCs produced individually by both *C. sake* strains (41 E and F36A) did not affect the growth of all pathogen to the same extent. For example, *B. cinerea* was significantly less sensitive than the other fungal species assayed. This result was in accordance with the results obtained by Di Francesco et al. (2015), who reported that the level of inhibition caused by VOCs produced by two strains of *Aureobasidium pullulans* was significantly greater for *Penicillium expansum*, *P. digitatum*, and *P. italicum* than it was for *B. cinerea* and *C. acutatum*.

In vitro and *in planta* (on strawberries) inhibition of spore germination and mycelial growth of *B. cinerea* by VOCs produced by yeasts identified as *Candida intermedia* (Huang et al., 2011) and *Sporidiobolus pararoseus* (Huang et al., 2012) has been previously reported. Di Francesco et al. (2015) have also previously reported that the VOCs produced by two *Aureobasidium pullulans* strains inhibited the *in vitro* growth of *P. expansum*. The present study, however, is the first report of a yeast producing VOCs with inhibitory activity against species of *Alternaria* that cause postharvest apple rot.

The *Candida sake* strains identified and evaluated in the present study were isolated from water samples collected in Antarctica. Strain 41E was collected in 2012 from marine water obtained along the coast of Drake Bay (69°09'S 58°56'W), and strain F36A was isolated in 2013 from melt water at Norme Cove (69°11'S 58°55'W). *Candida sake* has been previously identified from Antarctica in 1980 (Hurst et al., 1984). It can be considered a psychrotrophic species since although 25 °C is the optimum temperature for its growth (Hurst et al., 1984), it can also grow at lower temperatures, even at 0 °C. *Candida sake* has also been previously reported as a good biocontrol agent of postharvest pathogens of apple during cold storage (Viñas et al., 1998; Usall et al., 2000). In fact, a commercial biofungicide (Candifruit) has been developed based on a selected *Candida sake* strain. Production of VOCs by *C. sake*, however, has not been previously reported. The VOCs produced by *C. sake* 41E were mainly esters, of which ethyl hexanoate and 2-phenylethyl acetate have been reported as components of the antifungal VOCs produced by yeasts (Di Francesco et al., 2015; Huang et al., 2011; Masoud et al., 2005). The major constituent of the mixture was also an ester and was identified as 3-methylbutyl hexanoate, a registered flavoring ingredient permitted for use as a food additive by the U.S. Food and Drug Administration (21CFR172.515). Two alcohols, 3,7-Dimethyl-6-octen-1-ol (citronellol) and phenylethyl alcohol were also detected. Both alcohols have been previously reported to have antifungal activity.

Citronellol has been described as a constituent of Myrtaceae essential oils which exhibit antifungal activity against various molds including dermatophytes (Park et al., 2007) and *Aspergillus* species (Kim and Park, 2012). Phenylethyl alcohol has been described as an effective antifungal volatile compound produced by many yeasts and fungi, including *Muscodor albus* (Spadoni et al., 2015). Both alcohols are minor components of the volatile mixture produced by *Candida sake* 41E, however, the antifungal properties of VOCs mixtures could be the result of additive or synergistic actions of the various components of the VOC mixture, as was demonstrated by Strobel et al. (2008). There is no published information on the inhibitory activity of the other compounds that were produced, however, additive or synergistic activity cannot be ruled out.

The present study demonstrated, that the production of VOCs by a psychrotrophic strain of *C. sake* could play a significant role in preventing blue mold on Red Delicious apples stored at low temperatures. New experiments are necessary to evaluate the contribution of each compound of the VOCs mixture in the biocontrol activity against fungal pathogens on fruit.

Acknowledgments

This research was supported by the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-Uruguay), Instituto Antártico Uruguayo (IAU) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).

References

- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, Shimadzu.
- Altschul, S., Madden, T., Schaffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402.
- Batista Fialho, M., Toffano, L., Pozzobon Pedroso, M., Augusto, F., Florentino Pascholati, S., 2010. Volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* inhibit the in vitro development of *Guignardia citricarpa*, the causal agent of citrus black spot. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 925–932.
- Bennett, J.W., Hung, R., Lee, S., Padhi, S., 2012. Fungal and bacterial volatile organic compounds: an overview and their role as ecological signaling agents. In: Hock (Ed.), *Fungal Associations, The Mycota IXB*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L., Mari, M., 2015. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biol. Control* 81, 8–14.
- Di Rienzo, J.A., Guzmán, A.W., Casanoves, F., 2002. A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 7 (2), 1–14.
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixido, N., Spadaro, D., Jijakii, M.H., 2016. The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 22–29.
- Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Goldsmith, E., Porat, R., 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Biol. Control* 92, 393–399.
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M.E., Romero, G., Silvera, E., González, P., Rebollato, J., Ferreira, Y., 2012. Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia* 161, 97–107.
- Huang, R., Li, G.Q., Zhang, J., Yang, L., Che, H.J., Jiang, D.H., Huang, H.C., 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology* 101, 859–869.
- Huang, R., Che, H.J., Zhang, J., Yang, L., Jiang, D.H., Li, G., 2012. Evaluation of *Sporidiobolus pararoseus* strain YCXT3 as biocontrol agent of *Botrytis cinerea* on post-harvest strawberry fruits. *Biol. Control* 62, 53–63.
- Hurst, J.L., Pugh, G.J.F., Walton, D.W.H., 1984. The effect of temperature on the growth of *Candida sake* isolated from the leaves of a subantarctic grass. *Microb. Ecol.* 10, 89–93.
- Jurick II, W.M., Kou, L., Gaskins, V., Luo, Y., 2014. First report of *Alternaria alternata* causing postharvest decay on apple fruit during cold storage in Pennsylvania. *Plant Dis.* 98 (5), 690.
- Kanchiswamy, C.N., Malnoy, M., Maffei, M.E., 2015. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front. Plant Sci.* 6, 151.
- Kim, E., Park, I., 2012. Fumigant antifungal activity of myrtaceae essential oils and constituents from *Leptospermum petersonii* against three *Aspergillus* species. *Molecules* 17, 10459–10469.
- Kou, L.P., Gaskins, V.L., Luo, Y.G., Jurick II, W.M., 2014. First report of *alternaria tenuissima* causing postharvest decay on apple fruit from cold storage in the United States. *Plant Dis.* 98 (5), 690.
- Kurtzman, 2006. Yeast species recognition from gene sequence analyses and other molecular methods. *Mycoscience* 47 (2), 65–71.
- Liu, J., Siu, Y., Wisniewski, M., Xie, Z., Liu, Y., You, Y., Zhang, X., Sun, Z., Li, W., Li, Y., Wang, Q., 2017. The impact of the postharvest environment on the viability and virulence of decay fungi. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1279122>.
- Mari, M., Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., 2016. Decay control in the postharvest system: role of microbial and plant volatile organic compounds. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 70–81.
- Martínez, A., Cavello, I., Garmendia, G., Rufo, C., Cavallito, S., Vero, S., 2016. Yeast from sub-Antarctic region: biodiversity, enzymatic activities and their potential as oleaginous microorganisms. *Extremophiles* 20 (5), 759–769.
- Masoud, W., Poll, L., Jakobsen, M., 2005. (2005) Influence of volatile compounds produced by yeasts predominant during processing of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *Yeast* 22, 1133–1142.
- Merin, M.G., Mendoza, L., Fariás, M., Morata de Ambrosini, V., 2011. Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *Int. J. Food Microbiol.* 147, 144–148.
- Mohamed, H., Saad, A., 2009. The biocontrol of postharvest disease (*Botrydiodiplodiathobromae*) of guava (*Psidiumguajava* L.) by the application of yeast strains. *Postharvest Biol. Technol.* 53, 123–130.
- Park, M.J., Gwak, K.S., Yang, I., Choi, W.S., Jo, H.J., Chang, J.W., Jeung, E.B., Choi, I.G., 2007. Antifungal activities of the essential oils in *Syzygiumaromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their constituents against various dermatophytes. *J. Microbiol.* 45, 460–465.
- Pereyra, V., Martínez, A., Rufo, C., Vero, S., 2014. Oleaginous yeasts from Uruguay and Antarctica as renewable raw material for biodiesel production. *Am. J. Biosci.* 2, 251–257.
- Pianzola, M.J., Moscatelli, M., Vero, S., 2004. Characterization of *Penicillium* Isolates Associated with Blue Mold on Apple in Uruguay. *Plant Dis.* 88, 23–28.
- Romanazzi, G., Smilanick, J.L., Feliziani, E., Droby, S., 2016. Integrated management of postharvest gray mold on fruit crops. *Postharvest Biol. Technol.* 113, 69–76.
- Romano, M.L., Gullino, M.L., Garibaldi, A., 1983. Evaluation of the sensitivity to several fungicides of post-harvest pathogens in North-western Italy. *Meded. Fac. Landbouww. Univ. Gent* 48, 591–602.
- Rosenberger, D.A., 1990. Gray mold. In: Jones, A.L., Aldwinckle, H.S. (Eds.), *Compendium of Apple and Pear Diseases*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA, pp. 55–56.
- Scatoni, I., Mondino, P., Leoni, C., Nuñez, S., Buschiazio, M., De Lucca, R., Moizo, A., Rabbellino, F., Martínez, N., 2005. Normas para la producción integrada de manzano. [http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/PI/doc/Version final Normas 2005-2006/MANZANA PI 2005.pdf](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/PI/doc/Version%20final%20Normas%202005-2006/MANZANA%20PI%202005.pdf).
- Serdani, M., Kang, J.C., Andersen, B., Crous, P.W., 2002. Characterization of *Alternaria* species-groups associated with core rot of apples in South Africa. *Mycol. Res.* 106, 561–569.
- Spadaro, D., Droby, S., 2016. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeasts antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47, 39–49.
- Spadoni, A., Neri, F., Mari, M., 2015. Physical and chemical control of postharvest diseases. In: *Advances in Postharvest Fruit and Vegetable Technology*, pp. 89–116.
- Strobel, G.A., Spang, K., Kluck, K., Hess, W.M., Sears, J., Livinghouse, T., 2008. Synergism among volatile organic compounds resulting in increased antibiosis in *Oidium* sp. *FEMS Microbiol. Lett.* 283, 140–145.
- Tongsri, V., Sangchote, S., 2009. Yeast metabolites inhibit banana anthracnose fungus *Colletotrichum musae*. *J. Food Agro. Industry.* 2, 807–816.
- Usall, J., Teixido, N., Fons, E., Viñas, I., 2000. Biological control of blue mold on apple by a strain of *Candida sake* under several controlled atmosphere conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 83–92.
- Vero, S., Garmendia, G., González, M.B., Bentancur, O., Wisniewski, M., 2012. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of Apple (*Malus x domestica*). *FEMS Yeast Res.* 13, 189–199.
- Vero, S., Garmendia, G., González, M.B., Garat, M.F., Wisniewski, M., 2009. *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Sci. Technol.* 19, 1033–1049.
- Vero, S., Mondino, P., Burgeño, J., Soubes, M., Wisniewski, M., 2002. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Uruguay against blue mold of apple. *Postharvest Biol. Technol.* 26, 91–98.
- Vespermann, A., Kai, M., Piechulla, B., 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 17, 5639–5641.
- Viñas, I., Usall, J., Teixido, N., Sanchis, V., 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 9–16.
- Wisniewski, M., Droby, S., Norelli, J., Liu, J., Schena, L., 2016. Alternative management technologies for postharvest disease control: the journey from simplicity to complexity. *Postharvest Biol. Technol.* 122, 3–10.
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin Wilson, C., Chalutz, E., 1991. Mode of action of the postharvest yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 245–258.