

TESINA PARA OPTAR POR EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

*Tratamientos para minimizar las pérdidas
por *Penicillium expansum* en poscosecha de
manzanas*

María Cecilia González Caravadossi

Tutora: Silvana Vero

Co-Tutora: Fernanda Zaccari

2022

Agradecimientos

Quiero agradecer a mis tutoras por su apoyo, guía y paciencia infinita que han tenido en este largo y complejo proceso.

A la Facultad de Química y de Agronomía por abrirme las puertas para poder realizar este trabajo.

A la Facultad de Ciencias por haber sido mi segunda casa, permitirme estudiar y desarrollar mi pasión

A Dios por su gracia, por la vida llena de amor y bendiciones que me ha regalado

A mis padres los cuales desde el comienzo me apoyaron incondicionalmente en la aventura de esta carrera poco conocida sabiendo que era mi vocación y que hicieron lo imposible para que la pudiera realizar de la mejor forma.

A Gerardo, sabes que sin tu apoyo, perseverancia, paciencia y amor incondicional, culminar este proceso no hubiera sido posible.

A toda mi familia y amigos leales. Son pilares en mi vida que me brindan su amor y contención a diario sin importar las circunstancias.

¡Muchas gracias!

“Soñar con lo que más queremos, aquello difícil de lograr es ofrecer llevar la meta a su fin y creer que la veremos cumplir. Arriesgar de una vez lo que soy por lo que puedo ser.

Puedes llegar, lejos. A las estrellas alcanzar, hacer de sueños realidad.

Y puedes volar, alto, sobre las alas de la fe, sin más temores por vencer.”

Canción puedes llegar

Resumen

El cultivo del manzano en Uruguay representa la fruta de hoja caduca de mayor importancia. Se estima que en nuestro país, el 41,4% de la producción de frutales de hoja caduca se pierde en poscosecha. Esto se traduce en pérdidas económicas estimadas en el entorno de los 32 millones de dólares al año.

Las podredumbres causadas por hongos constituyen la principal problemática de la protección en la etapa de poscosecha de las manzanas. De ellas se destacan las podredumbres ocasionadas por hongos patógenos de heridas. Las más importantes son el moho azul ocasionado principalmente por *Penicillium expansum*, el moho gris ocasionado por *Botrytis cinerea* y la podredumbre por *Alternaria* spp.

El control de estos patógenos se ve limitado debido a las restricciones existentes al uso de fungicidas, a la falta de efectividad de los mismos y a la aparición de cepas de los patógenos resistentes a los escasos principios activos autorizados. A su vez, el uso de fungicidas se restringe cada vez más por razones toxicológicas, problemas de aceptación por parte de los mercados compradores y del propio consumidor.

Las normas de Producción Integrada de nuestro país indican que el proceso de tratamiento poscosecha incluye un primer baño de desinfectante seguido por un tratamiento con fungicidas para las manzanas que recibirán un almacenamiento prolongado en cámara (más de 3 meses). El desinfectante más comúnmente utilizado es el hipoclorito de sodio y el uso de este ha sido cuestionado por la gran dependencia que existe entre el pH de la solución y la actividad antimicrobiana.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la actividad de desinfectantes alternativos al hipoclorito para su uso sobre manzanas, la búsqueda de alternativas químicas y físicas al uso de fungicidas en poscosecha para la reducción del desarrollo de *Penicillium expansum* en manzanas.

ÍNDICE

Agradecimientos

Resumen

ÍNDICE.....	1
1 Introducción.....	3
1.1 Situación de la producción de manzana en Uruguay	3
1.2 Principales patógenos en poscosecha de manzanas	3
1.3 Formas de control de los patógenos	7
2 Objetivos del trabajo	9
2.1 Objetivo General.....	9
2.2 Objetivos Específicos	9
3 Materiales y métodos	10
3.1 Ensayos in vitro.....	10
3.1.1 Comparación del efecto de diferentes desinfectantes sobre patógenos de manzana.....	10
3.1.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de conservadores sobre patógenos de manzana	11
3.1.3 Concentración inhibitoria mínima de quitosano sobre patógenos de manzana.....	11
3.2 Ensayos sobre fruta	12
3.2.1 Evaluación de desinfectantes en heridas de fruta.....	12
3.2.2 Evaluación de la acción curativa de diferentes sustancias y tratamientos físicos sobre <i>P. expansum</i> en heridas de manzana	13
3.2.3 Evaluación de la Acción preventiva del quitosano y de tratamientos físicos.....	14
3.2.4 Estudio de indicadores de calidad y madurez de las manzanas sometidas a tratamientos térmicos	15
3.3 Análisis estadístico	16
4 Resultados.....	17
4.1 Ensayos in vitro.....	17
4.1.1 Comparación del efecto fungicida de diferentes desinfectantes.....	17
4.1.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de conservadores.....	19
4.1.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de quitosano.....	20
4.2 Ensayos sobre fruta	22
4.2.1 Acción curativa de desinfectantes.....	22
4.2.2 Acción curativa de conservadores y quitosano	22
4.2.3 Acción curativa de tratamientos térmicos.....	23
4.2.4 Acción preventiva del Quitosano	24
4.2.5 Acción preventiva de los tratamientos térmicos.....	24
4.3 Estudio de indicadores de calidad y maduración de las manzanas sometidas a tratamientos térmicos.....	25

5	Discusión.....	27
6	Conclusiones y perspectivas	36
	Bibliografía	38
	Anexo 1	43
	Lista de contenidos	44

1 Introducción

1.1 Situación de la producción de manzana en Uruguay

En Uruguay, la producción de manzana es la de mayor importancia dentro de los árboles de hoja caduca. El cultivo de manzano ocupa la mayor superficie plantada (2275 ha) alcanzando el mayor volumen de cosecha (42322 t) dentro de los árboles de hoja caduca, representando el 58% de la producción total de este tipo de frutas. Las variedades que más se destacan son las Red y Gala, correspondiéndose al 53% y 10%, respectivamente, del total de variedades de manzanas producidas en Uruguay (MGAP-DIEA, 2020). El 85,2% de la producción de manzana se destina a consumo en fresco, el 8,5% a la industria y el 6,2% a la exportación (MGAP-DIEA, 2016).

En Uruguay, se estima que el 41,4% de la producción de frutales de hoja caduca se pierde en poscosecha (FAO, 2017). Esto se traduce en pérdidas económicas estimadas en el entorno de los 32 millones de dólares al año (FAO, 2017). Por estos motivos es de vital importancia el control de las enfermedades que afectan a la fruta en esta etapa.

1.2 Principales patógenos en poscosecha de manzanas

Las podredumbres ocasionadas por hongos constituyen la principal problemática de la protección en la etapa de poscosecha de las manzanas (Falchi, 2001). A nivel mundial, las enfermedades fúngicas en poscosecha significan pérdidas económicas muy importantes en la producción de manzana, las cuales se estiman entre un 30 y 40% de la producción en países en desarrollo, pudiendo llegar en casos extremos hasta el 60% (Patriarca, 2019). Entre ellas se destacan el moho azul ocasionado principalmente por *Penicillium expansum*, el moho gris ocasionado por *Botrytis cinerea* y la podredumbre por *Alternaria* spp. (Leoni y Mondino, 2003; Pianzzola, 2004; Colodner, 2014; Patriarca, 2019).

Penicillium expansum pertenece al Filo Ascomycota. Es un hongo saprofito, cosmopolita y es el principal causante de las pérdidas por podredumbre en manzanas durante el almacenamiento poscosecha. Los síntomas iniciales de la infección por *P. expansum* sobre la fruta son manchas marrón claras y acuosas de borde definido, sobre las cuales, en condiciones favorables de temperatura y humedad, se forman masas de esporas de color azulado (Imagen 1) (Carrillo, 2003; Leoni y Mondino, 2003; Silva *et al*, 2015).



Imagen 1: Podredumbre de *Penicillium expansum* en manzanas. Extraído de Silveira 2010

P. expansum puede crecer en un rango de temperatura de -3° a 35°C , aunque su temperatura óptima es de $25 - 26^{\circ}\text{C}$ (Corry, 1987; Lacey, 1989). Este rango de temperatura le permite desarrollarse (aunque más lentamente) en las cámaras refrigeradas de almacenamiento en donde la temperatura está en el entorno de 0°C .

En su ciclo de reproducción asexual forma conidióforos en forma de pincel de los cuales emergen las conidias (esporas), que son estructuras fácilmente dispersables tanto por el aire como por el agua. La infección de las manzanas por este hongo se inicia cuando las esporas se ponen en contacto con aberturas naturales (lenticelas) o con las heridas ocasionadas por la manipulación de la fruta durante y después de la cosecha. Las conidias pueden provenir del campo o estar presentes en el aire de las cámaras de frío, en el agua de los baños de la fruta o adheridas a los cajones infectados por cosechas anteriores. Si bien *P. expansum* se encuentra en la mayoría de los suelos en donde se cultiva manzana, no es común que la enfermedad se desarrolle en el campo previo a la cosecha (Leoni y Mondino, 2003). La susceptibilidad de las manzanas a la infección depende de la variedad de esta fruta y del grado de madurez de las mismas; siendo las más susceptibles las pertenecientes a la variedad Red Delicious y las de mayor grado de madurez (Leoni y Mondino, 2003).

Además de ser la principal causa de pérdidas de fruta durante el almacenamiento en las cámaras refrigeradas (Pianzzola *et al*, 2004), la infección por *P. expansum* tiene como consecuencia la contaminación de la fruta infectada con patulina. La patulina es una micotoxina (producida por el hongo) que se conoce por tener actividad citotóxica,

genotóxica e inmunotóxica y puede alcanzar niveles inaceptables en la fruta destinada a procesamiento industrial. La ingesta de esta micotoxina puede causar en humanos problemas gastrointestinales, náuseas y vómitos (Pianzzola *et al*, 2004; Lima *et al*, 2011; Silva *et al*, 2015).

Botrytis cinerea es el causante del llamado “moho gris” y el segundo patógeno de poscosecha más importante en manzana (Thurechek, 2004). Al igual que *P. expansum* es un hongo saprofita que se encuentra comúnmente en el suelo y sus esporas se dispersan también tanto por el aire como por el agua. La infección se inicia a través de las aberturas naturales de las manzanas, de las heridas provocadas en el manejo del fruto o incluso a través de las estructuras florales, pudiendo quedar en estado de latencia hasta desarrollarse en la etapa de almacenamiento en frío de la fruta (Benito *et al*, 2000; Leoni y Mondino, 2003; Jijakli y Lepoivre, 2004; Elad, 2007). Los síntomas iniciales causados por la infección de este hongo en manzanas son podredumbres marrones claras, sin bordes definidos y más firmes que las producidas por *P. expansum*. A medida que la infección va en aumento las podredumbres se vuelven más oscuras y en condiciones de alta humedad se puede observar en las heridas y lenticelas el micelio blanco y la esporulación gris que le da el nombre a la enfermedad (Imagen 2). Sin embargo, en las cámaras de refrigeradas se observa generalmente poca esporulación. Además también se pueden observar estructuras oscuras denominadas esclerocios. Los esclerocios son estructuras de resistencia que forma el patógeno ante condiciones adversas y le permite permanecer en latencia hasta que las mismas cambien (Leoni y Mondino, 2003; Thurechek, 2004). Esta enfermedad se desarrolla más rápidamente en almacenamiento en frío que la descrita para *P. expansum* (Silveira, 2010). La infección por *B. cinerea* (al igual que la causada por *P. expansum*) tiene la capacidad de propagarse de la fruta enferma a la sana en el almacenamiento formando los llamados “nidos” que son cúmulos grandes de esporas (Leoni y Mondino, 2003; Jijakli y Lepoivre, 2004; Silveira, 2010).



Imagen 2: Podredumbre causada por *Botrytis cinerea* en manzanas. Extraído de Jijakli y Lepoivre, 2004

Alternaria es un género, al igual que las especies mencionadas anteriormente, saprofita y cosmopolita. Posee un micelio algodonoso gris verdoso, el cual produce conidióforos con conidias septadas. Es capaz de crecer entre 0 y 35°C, aunque su temperatura óptima de esporulación es 27°C (Leoni y Mondino, 2003; Carrillo, 2003).

En las manzanas causa podredumbres de color marrón oscuro, firmes con bordes circulares bien definidos (Imagen 3) que crece lentamente en las cámaras refrigeradas desde la superficie al interior de la fruta pudiendo llegar a tomar toda la fruta. La manzana puede contraer la infección estando aún en la planta, a través de heridas o de las lenticelas de la fruta estando en el almacenamiento refrigerado (Leoni y Mondino, 2003; Jijakli y Lepoivre, 2004; Silveira, 2010). Las especies de *Alternaria* también pueden producir micotoxinas algunas de las cuales son tóxicas para mamíferos y aves. Dentro de las especies más relevantes en este sentido en manzanas, se encuentra *Alternaria alternata* (Leoni y Mondino, 2003; Carrillo, 2003).



Imagen 3: Podredumbre causada por *Alternaria sp.* en manzanas. Extraído de Silveira, 2010

1.3 Formas de control de los patógenos

Los patógenos de poscosecha causan importantes pérdidas y su control se ve limitado debido a las restricciones existentes al uso de fungicidas, a la falta de efectividad de los mismos y a la aparición de cepas de patógenos resistentes a los escasos principios activos autorizados (Monteiro *et al.*, 1997; Delgado y Pérez, 1998).

La minimización de los daños en la fruta, así como la limpieza y sanitización de las superficies de contacto, constituyen prácticas fundamentales para disminuir la aparición de las diferentes podredumbres en la manzana. A su vez, la sanitización del agua de lavado o volcado de frutas también resulta imprescindible para evitar la contaminación cruzada de las misma (Garmendia y Vero, 2006).

Las normas de Producción Integrada de nuestro país indican que el proceso de tratamiento poscosecha incluye un primer baño de desinfectante seguido por un tratamiento con fungicidas para las manzanas que recibirán un almacenamiento prolongado en cámara (más de 3 meses) (Mondino *et al.*, 2018). A la salida de cámara la fruta se vuelca sobre agua para ser luego clasificada y empacada. El agua de volcado resulta un vehículo eficiente para la contaminación cruzada de frutas por lo cual, en general se agrega un sanitizante para disminuir la carga microbiana. De los desinfectantes recomendados por las normas de producción integrada, el hipoclorito de sodio es el más comúnmente utilizado. Sin embargo, el uso del mismo ha sido cuestionado por la gran dependencia que existe entre el pH de la solución y la actividad

antimicrobiana. Además, la reacción del mismo con materia orgánica puede dar lugar a la formación de trihalometanos tóxicos (Garmendia y Vero, 2006; Gil *et al.*, 2009).

Con respecto a los fungicidas son sólo tres los principios activos autorizados (Iprodione, Imazalil y Captan) lo cual dificulta el manejo para evitar la aparición de cepas de patógenos resistentes y esto disminuiría su efectividad (Mondino *et al.*, 2018). A su vez, el uso de fungicidas se restringe cada vez más por razones toxicológicas, problemas de aceptación por parte de los mercados compradores y del propio consumidor. Esto se debe a que el concepto de calidad de la fruta se ha modificado por parte de los consumidores donde no se limita solamente al producto en sí mismo sino también a cómo fue producido y a las posibles consecuencias que los procesos involucrados pueden generar tanto en la salud como en el medio ambiente (Galvéz, 2006; Lima *et al.*, 2011).

Por estas razones cada vez más se están buscando alternativas a estos tratamientos. Se plantea como sanitizantes alternativos al hipoclorito el uso del dióxido de cloro, el peróxido de hidrógeno o el ácido peracético (Garmendia y Vero, 2006; Gil *et al.*, 2009; Aguayo *et al.*, 2017; Bridges *et al.*, 2018; De Siqueira *et al.*, 2018; Zoellner *et al.*, 2018). Además, como alternativa al uso de fungicidas se plantean, entre otros, la utilización de tratamientos físicos, entre los cuales se destacan los tratamientos térmicos (aire o agua caliente) para erradicar las diferentes enfermedades de poscosecha (Fallik *et al.*, 1995; Fallik *et al.*, 2001; Fallik, 2004). A su vez, conservantes de alimentos tales como el benzoato de sodio y el sorbato de potasio, aceptados según el Reglamento Bromatológico Nacional (Uruguay, 2017), han demostrado tener efectos controladores de patógenos del género *Penicillium* en diferentes frutas (D'Aquino *et al.*, 2013; Fadda *et al.*, 2015; Zhelifonova *et al.*, 2017). La aplicación de quitosano también puede considerarse como un método complementario o alternativo para disminuir las podredumbres en fruta durante el almacenamiento poscosecha. El quitosano es un polímero de origen natural derivado de la desacetilación parcial de la quitina (segundo polímero natural más importante del mundo) (Rinaudo, 2006). Es biodegradable y no tóxico (Gutierrez *et al.*, 2018). Tiene propiedades que lo hacen capaz de formar films de recubrimiento y se ha demostrado su efectividad como antifúngico, antibacteriano y como inductor de la resistencia vegetal al ataque por patógenos (Rinaudo, 2006; Li *et al.*, 2015; Gutiérrez *et al.*, 2018).

Cualquiera de estas alternativas al tratamiento actual debe cumplir con el doble requisito de actuar como protector frente a las infecciones fúngicas y a la vez no afectar negativamente la calidad de la fruta tratada.

Debido al escenario anteriormente expuesto, la búsqueda de alternativas al hipoclorito de sodio como desinfectante y a los fungicidas químicos como protectores frente a infecciones fúngicas, se presenta como un importante desafío para la generación de conocimiento aplicable a la industria frutícola en Uruguay y el mundo.

2 Objetivos del trabajo

2.1 Objetivo General

El objetivo de este trabajo es estudiar la actividad de desinfectantes alternativos al hipoclorito de sodio y la búsqueda de alternativas químicas y físicas al uso de fungicidas para la reducción del desarrollo de *P. expansum* en manzanas luego de la cosecha.

2.2 Objetivos Específicos

Comparar la acción desinfectante del dióxido de cloro, el dióxido de cloro estabilizado (solución de clorito de sodio) y el peróxido de hidrógeno con la acción del hipoclorito de sodio sobre conidias de *P. expansum*, en el agua de lavado y sobre manzanas variedad Red Delicious.

Estudiar el efecto inhibitor del sorbato de potasio, benzoato de sodio y del quitosano sobre el desarrollo de *P. expansum* en manzanas variedad Red Delicious.

Evaluar el efecto curativo y preventivo de 2 tratamientos térmicos por inmersión en agua caliente a 53 °C y 56 °C y 2 tratamientos por curado con aire caliente a 38 °C y 44 °C sobre heridas inoculadas con *P. expansum* y su efecto en la calidad de las manzanas de la misma variedad anteriormente mencionada.

3 Materiales y métodos

A fin de lograr los objetivos planteados se realizaron ensayos *in vitro* y en fruta que se detallan a continuación.

3.1 Ensayos *in vitro*

En todos los casos los inóculos de los patógenos se prepararon de la siguiente forma: en primer lugar, se obtuvo una suspensión de conidias en solución estéril de Tween 80 al 0,1%, agregando 4 mL de dicha solución a un tubo conteniendo un cultivo esporulado del hongo en el medio papa dextrosa agar (PDA) de 4 días de incubación a 25 °C. La suspensión se centrifugó y el pellet obtenido se suspendió en agua destilada estéril, luego de ser lavado una vez, para extraer los restos de Tween.

La concentración de la suspensión se evaluó en cámara de Neubauer y se determinó la concentración exacta de conidias viables por recuento en superficie en placa de PDA.

3.1.1 Comparación del efecto de diferentes desinfectantes sobre patógenos de manzana

Los desinfectantes estudiados fueron: soluciones de hipoclorito de sodio (25, 50, 100 y 200 ppm); soluciones de dióxido de cloro (1, 2, 3 y 5 ppm); soluciones de dióxido de cloro estabilizado (clorito de sodio) pH=6 (2,5; 5; 10 y 20 ppm) y peróxido de hidrógeno (0,5; 1 y 3%). Las soluciones de los desinfectantes se prepararon en agua destilada estéril y se llevaron a pH=6 utilizando solución esterilizada 0.2 M de HCl.

A su vez, se prepararon suspensiones de conidias *P. expansum* en agua estéril, de forma de alcanzar una concentración de 10^6 conidias/mL.

Para evaluar la actividad fungicida, se agregaron 50 microlitros de esta suspensión a un tubo conteniendo 5 mL de la solución desinfectante a evaluar. Como control se utilizó un tubo de agua destilada estéril, pH=6. Las conidias se dejaron en contacto con el desinfectante o el agua (control) durante 2 minutos. Pasado ese tiempo, se tomó un volumen conocido de la suspensión en estudio y se agregó a igual volumen de solución estéril de tiosulfato de sodio (4 g/L), para neutralizar la acción del desinfectante contenido en la muestra. Luego de 10 minutos se inoculó 0,1 mL de dicha suspensión en placas de PDA para realizar el recuento en superficie. Así se determinó la concentración de conidias sobrevivientes luego del tratamiento. Las placas se incubaron 4 días a 25 °C.

Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron como el número de conidias viables por mililitro, calculado como el promedio del recuento de las repeticiones.

De esta forma se determinó la mínima concentración de cada una de las soluciones desinfectantes con la cual se lograba una disminución de la carga microbiana a valores no detectables. A partir de estos resultados y a modo comparativo, se determinó también el efecto *in vitro* de dichas soluciones sobre conidias de *B. cinerea* y *A. alternata*, utilizando la misma metodología explicada anteriormente.

Todas las cepas utilizadas pertenecen a la colección del laboratorio de Microbiología de Facultad de Química de la UDELAR. Para este trabajo se seleccionaron de dicha colección, cepas con capacidad patogénica probada en heridas de manzana.

3.1.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de conservadores sobre patógenos de manzana

Se determinó la concentración mínima de sorbato de potasio y benzoato de sodio necesaria para inhibir la germinación y el crecimiento de conidias de *P. expansum*, *B. cinerea* y *A. alternata*. Tubos con 5 mL de jugo de manzana Conaprole, sin conservantes, (pH=5) conteniendo cuatro diferentes concentraciones de sorbato de potasio y de benzoato de sodio (30, 125, 500 y 1000 ppm) esterilizados por filtración (filtro de 0,2 micras de poro), se inocularon con suspensiones de conidias de forma de alcanzar una concentración de 10^4 conidias/mL de cada patógeno en forma individual. Se prepararon 3 tubos para cada concentración de conservante y para cada patógeno ensayado.

Se realizó un blanco en jugo de manzana sin conservador para cada patógeno. Todos los tubos se incubaron a 25 °C durante cuatro días. Al finalizar el período de incubación se determinó macroscópicamente la presencia o no de crecimiento del micelio del hongo correspondiente, obteniéndose así la mínima concentración de cada conservador que inhibió el crecimiento de cada patógeno.

3.1.3 Concentración inhibitoria mínima de quitosano sobre patógenos de manzana

Se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la acción del quitosano sobre el crecimiento de *P. expansum*, *B. cinerea* y *A. alternata*. Para ello se prepararon placas de PDA y Agar Jugo de manzana (AJM) conteniendo diferentes concentraciones de

quitosano (1,25%, 1%, 0,5%, 0,25%). Para la preparación de estos medios la fuente de quitosano fue el producto comercial Biorend (solución de quitosano al 2,5%, en la cual no se especifica el peso molecular ni el grado de desacetilación del quitosano utilizado). En el centro de cada placa se sembraron 10 microlitros de suspensiones de conidias de los mencionados patógenos (10^5 conidias/mL). Las placas sembradas se incubaron a 25 °C durante 4 días. Se determinó la concentración inhibitoria mínima de quitosano en las condiciones del ensayo como la mínima concentración de quitosano que inhibió el crecimiento de cada hongo. Como controles se sembraron placas de PDA y AJM de la misma manera.

3.2 Ensayos sobre fruta

En base a los resultados obtenidos *in vitro* se realizaron las pruebas de inhibición de crecimiento de patógenos en manzanas Red Delicious. En todos los casos se desinfectaron superficialmente las frutas con una solución de alcohol 70% antes de realizar los procedimientos que se describen a continuación. Todas las heridas se realizaron artificialmente en la zona ecuatorial de manzanas sanas con un punzón que asegura un diámetro de 2 mm y una profundidad de 4 mm.

3.2.1 Evaluación de desinfectantes en heridas de fruta

Se realizaron ensayos en fruta con heridas inoculadas, para determinar efecto curativo de diferentes soluciones de desinfectantes. Para ello se inocularon con 10 microlitros de una suspensión de conidias de *P. expansum* (10^4 conidias/mL) en las heridas generadas. Los frutos inoculados se dejaron secar por 2 horas a temperatura ambiente y luego se sumergieron en las soluciones a ensayar durante 2 minutos. La fruta tratada se almacenó a 25 °C por cuatro días. Se provocaron 5 heridas por manzana, utilizándose 5 manzanas por tratamiento. Como control se utilizaron manzanas inoculadas y posteriormente sumergidas en agua en las condiciones descritas anteriormente.

Las soluciones desinfectantes ensayadas fueron las siguientes: hipoclorito de sodio 50 ppm, dióxido de cloro 3 ppm, dióxido de cloro estabilizado (preparado comercial) 10 ppm y peróxido de hidrógeno 3%. Estas concentraciones fueron las mínimas concentraciones que en los ensayos *in vitro* evidenciaron una disminución de la carga a valores no detectables luego de 2 minutos de exposición.

3.2.2 Evaluación de la acción curativa de diferentes sustancias y tratamientos físicos sobre *P. expansum* en heridas de manzana

3.2.2.1 Conservadores y quitosano

Se realizaron ensayos en fruta con heridas generadas artificialmente, e inoculadas con conidias de *P. expansum*, para determinar si los conservadores usados anteriormente y el quitosano poseen efecto inhibidor del desarrollo del hongo. Se ensayaron soluciones acuosas de sorbato de potasio y benzoato de sodio de 125 ppm, ajustados a pH= 5 (que fue la concentración que logró inhibir a *P. expansum* en los ensayos *in vitro*). Como fuente de quitosano se utilizó la formulación comercial Biorend (2,5% de quitosano) ajustada a pH=5. Para ello se inocularon con 10 microlitros de una suspensión de conidias de *P. expansum* (10^4 conidias/mL) las heridas realizadas artificialmente. Los frutos inoculados se dejaron secar por 2 horas a temperatura ambiente y luego se sumergieron en las soluciones a ensayar durante 2 minutos.

Una parte de la fruta tratada se almacenó a 25 °C por 4 días, la otra parte se almacenó en cámara fría (0-1 °C y 90-95% HR) durante 3 meses. En el primer caso se utilizaron 5 frutas por tratamiento con 5 heridas por manzana y en el segundo caso 15 frutas por tratamiento 5 heridas cada una. Como control se utilizaron las mismas cantidades de manzanas inoculadas y posteriormente sumergidas en agua, se almacenaron en las mismas condiciones descritas anteriormente para cada caso.

En el caso del quitosano se realizó un ensayo adicional que consistió en inocular las heridas previamente contaminadas, con 10 microlitros de la solución comercial de quitosano. Se utilizaron la misma cantidad de frutas las cuales se almacenaron de la misma forma que la descrita anteriormente.

3.2.2.2 Tratamientos térmicos

Se determinó la eficiencia curativa de tratamientos térmicos utilizando agua caliente y aire caliente. Se inocularon heridas de manzana con una suspensión de conidias de *P. expansum*, en la misma forma que la detallada anteriormente, se dejaron secar 2 horas a temperatura ambiente y se sometieron a los siguientes tratamientos térmicos: a) Inmersión en agua caliente a 53 °C durante 3 minutos y a 56 °C durante 3 minutos b) Curado por almacenamiento en estufa a 38°C durante 96 horas y a 44 °C durante 20 horas. Como control se utilizó fruta inoculada sumergida durante 3 minutos en agua fría en un caso y fruta inoculada, sin curado, en el otro. Se realizaron 5 heridas por manzana,

en 15 manzanas distribuidas en grupos de 5 frutos. Luego de los tratamientos las frutas se almacenaron en cámara refrigerada (0-1 °C y 90-95% HR) durante 3 meses.

3.2.3 Evaluación de la Acción preventiva del quitosano y de tratamientos físicos

3.2.3.1 Acción preventiva del quitosano

Se realizaron ensayos en fruta para determinar si el quitosano poseía efecto preventivo. Se ensayó la misma formulación comercial, con la misma concentración mencionada anteriormente. Para ello se les refectuó un baño en la solución de quitosano a las manzanas con las heridas realizadas, luego se dejó secar la fruta por 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente se inocularon las heridas con 10 microlitros de una suspensión de conidias de *P. expansum* (10^4 conidias/mL).

Para el control se realizó el mismo procedimiento descrito, pero se sustituyó el baño en quitosano por un baño de agua.

Las condiciones de almacenamiento, la cantidad de la fruta utilizada tanto para la prueba como para el control fueron las mismas que las realizadas para el ensayo del efecto curativo del quitosano en fruta.

3.2.3.2 Acción preventiva de los tratamientos térmicos

En este caso se realizó el mismo procedimiento que para el ensayo del efecto curativo de los tratamientos térmicos (mismos tiempos, temperaturas, cantidad de heridas por fruta, cantidad de frutas por ensayo y métodos físicos) la diferencia radica en que primero se realizó el tratamiento térmico correspondiente y posteriormente la inoculación con la misma concentración de conidias de *P. expansum*.

Para los controles se utilizó la misma cantidad de fruta con la misma cantidad de heridas inoculadas con el patógeno por fruto, pero sin someterlas a ningún tratamiento.

Todos los ensayos y controles se almacenaron en cámara refrigerada a 0-1 °C y 90-95% HR) durante 3 meses, al igual que se mencionó anteriormente.

3.2.4 Estudio de indicadores de calidad y madurez de las manzanas sometidas a tratamientos térmicos

Para analizar los efectos que tienen los tratamientos térmicos sobre algunos parámetros de la calidad y estado de madurez de las manzanas se evaluó la firmeza de la pulpa, los sólidos solubles totales (SST), la acidez titulable y se realizó el test de yodo en dos momentos: previo al ingreso a la cámara (T0) y luego de 3 meses de almacenamiento (T3). El diseño experimental consistió en parcelas al azar con tres repeticiones por tratamiento, con un tamaño de muestra de 10 frutos/repetición y las condiciones de refrigeración fueron las mismas detalladas anteriormente.

3.2.4.1 Determinación de la firmeza de la pulpa

Se pelaron superficialmente las manzanas sobre la región ecuatorial y en caras opuestas, con distinta pigmentación de la cáscara, la zona de sobre-color (más roja) y la zona de color de fondo (más clara). La firmeza fue medida como la resistencia de la fruta a la presión con un presionómetro manual tipo Effegi (Effegi, Italia) utilizando una sonda cilíndrica de puntal convexo con 8 mm de diámetro, expresando los datos en Newton (N).

3.2.4.2 Determinación de los sólidos solubles totales (SST)

Los SST fueron medidos con una gota de jugo de cada zona pelada de las manzanas colocado en un refractómetro manual (Atago, Japón) auto-compensado por temperatura siendo los valores expresados en grados Brix (°Brix).

3.2.4.3 Determinación de la Acidez titulable total

Se cortaron las manzanas por el plano ecuatorial, una de las mitades se reservó para realizar la determinación de la madurez mediante el test de yodo. Con la otra mitad se preparó jugo con una juguera doméstica. El jugo se puso en dos vasos de bohemia (10 mL en cada uno) y se les agregó 3 gotas del reactivo fenolftaleína al 1% y por último se lo tituló con NaOH 0,1 N. Los valores se expresaron en gramos de ácido málico cada 100 mL de jugo (g ácido málico/100 mL de jugo).

3.2.4.4 Determinación del estado de madurez de la fruta utilizando el Test de yodo

Las mitades se colocaron con la cara del corte hacia abajo en una bandeja con aproximadamente 1 cm de alto de una solución de yodo (1,2% de yodo metálico y 2,4% de yoduro potásico). Luego de pasado 1 minuto se retiraron y se colocaron sobre papel

con la cara teñida expuesta hacia arriba durante diez minutos. Una vez transcurrido el tiempo se les asignaron números del 1 al 6 según la tinción que presentaba la pulpa indicando fruta inmadura (1) y sobremadura (6) de acuerdo con la escala de madurez de las manzanas rojas descripta por Feippe (2003) (Anexo 1).

3.3 Análisis estadístico

En los ensayos *in vitro* sobre la acción de diferentes desinfectantes sobre *P. expansum* se calculó la concentración media de supervivientes y se determinó el intervalo de confianza para cada tratamiento. Los datos fueron sometidos a análisis de varianza y las medias se compararon mediante Tukey ($p \leq 0,05$). El análisis estadístico de la incidencia de daño por *P. expansum* en fruta sometida a tratamientos térmicos o tratada con quitosano 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 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).

Los datos obtenidos en cada variable de los atributos de calidad y estado de madurez de la fruta se analizaron estadísticamente mediante un Modelo Lineal Generalizado (GLM), realizando un análisis de varianza, y cuando correspondió se compararon las medias utilizando el test de Tukey ($p \leq 0,05$). El software utilizado fue el mismo mencionado anteriormente. Las medias de cada variable se presentan con los desvíos estándar de cada tratamiento.

4 Resultados

4.1 Ensayos in vitro

4.1.1 Comparación del efecto fungicida de diferentes desinfectantes

Los Gráficos 1 a, b, c y d muestran el logaritmo de conidias viables de *P. expansum*, en función de la concentración de los diferentes desinfectantes, luego de 2 minutos de contacto.

El peróxido de hidrógeno al 3% tuvo la misma actividad desinfectante que 50 ppm de hipoclorito (pH=6), 3 ppm de dióxido de cloro y 10 ppm de dióxido de cloro estabilizado (pH=6). Cuando las conidias de *A. alternata* y *B. cinerea* fueron sometidas a las mismas condiciones descritas (iguales concentraciones de cada uno de los desinfectantes e igual tiempo) se observó la inhibición del crecimiento de dichas conidas, a valores no detectables, en las mismas concentraciones que fueron inhibidas las de *P. expansum* para cada desinfectante.

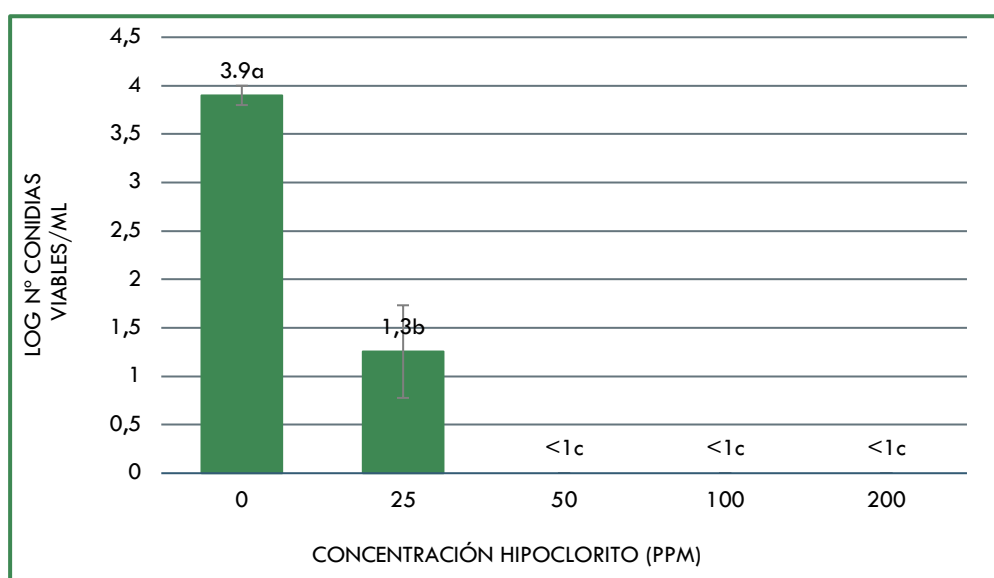


Gráfico 1a: Concentración de conidias de *P. expansum* viables promedio luego de 2 minutos de contacto con hipoclorito de sodio con diferentes concentraciones (0; 25, 50, 100 y 200 ppm). Las barras corresponden al intervalo de confianza (n=3, $\alpha=0,05$). Valores seguidos seguidos de la misma letra no se diferencian estadísticamente ($p\leq 0,05$)

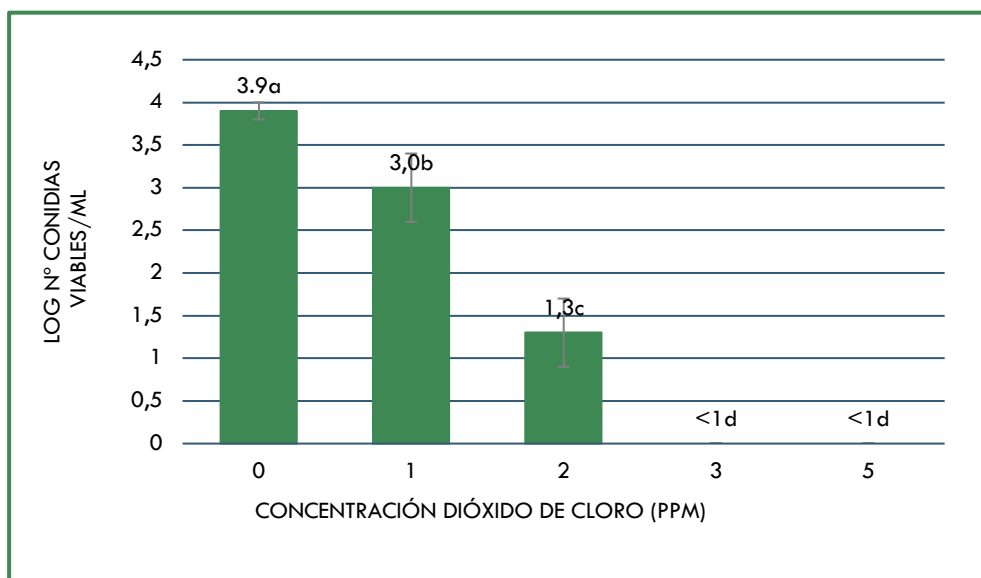


Gráfico 1b: Número de conidias de *P. expansum* viables promedio luego de 2 minutos de contacto con dióxido de cloro con diferentes concentraciones (0; 1; 2; 3 y 5 ppm). Las barras corresponden al intervalo de confianza de (n= 3, $\alpha =0,05$). Valores seguidos seguidos de la misma letra no se diferencian estadísticamente ($p \leq 0.05$)

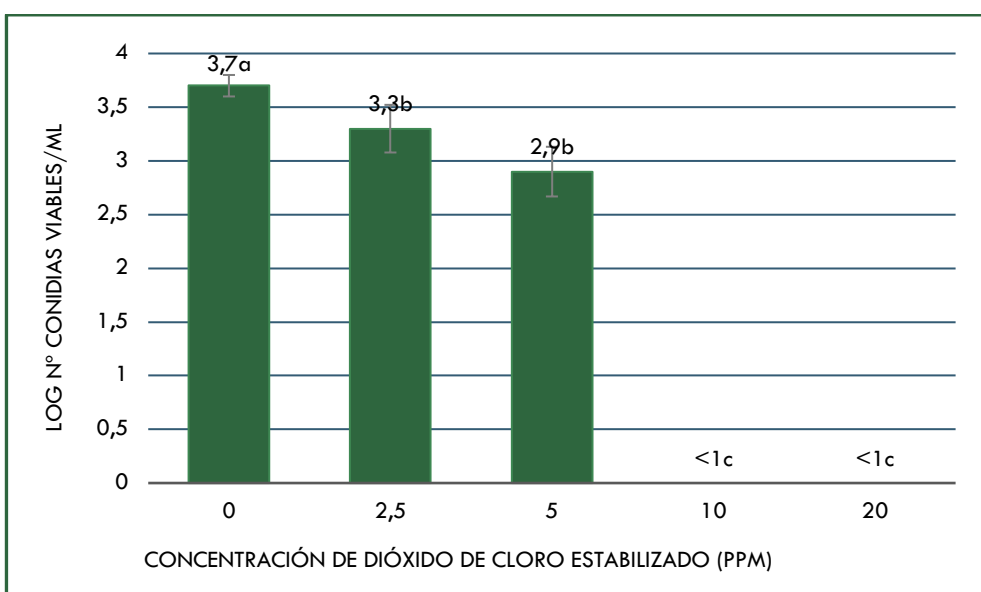


Gráfico 1c: Número de conidias de *P. expansum* viables promedio luego de 2 minutos de contacto con dióxido de cloro estabilizado con diferentes concentraciones (0; 2,5; 5; 10 y 20 ppm). Las barras corresponden al intervalo de confianza (n=3, $\alpha =0,05$). Valores seguidos seguidos de la misma letra no se diferencian estadísticamente ($p \leq 0.05$)

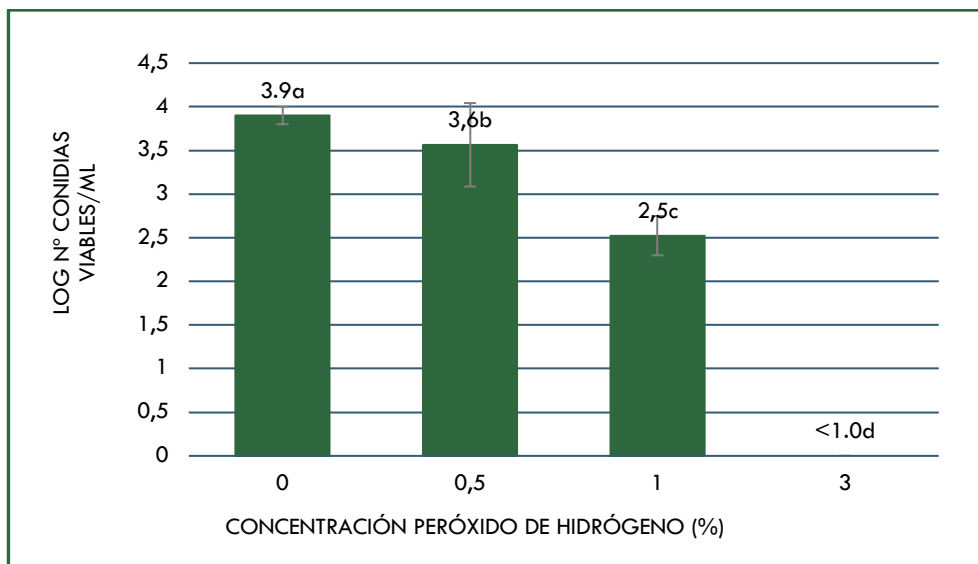


Figura 1d: Número de conidias de *P. expansum* viables promedio luego de 2 minutos de contacto con peróxido de hidrógeno con diferentes concentraciones (0; 0,5; 1 y 3 %). Las barras corresponden al intervalo de confianza (n=3, $\alpha=0.05$). Valores seguidos seguidos de la misma letra no se diferencian estadísticamente ($p \leq 0.05$)

4.1.2 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de conservadores

La concentración de sorbato de potasio que logró inhibir *in vitro* a los tres patógenos fue de 125 ppm, en cambio el benzoato de sodio tuvo diferente efecto en los diferentes hongos ensayados. La CIM para *P. expansum* fue de 125 ppm, sin embargo, *A. alternata* y *B. cinerea* se inhibieron con todas las concentraciones ensayadas. Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2.

Tabla 1				
Presencia (+) y ausencia (-) de <i>crecimiento fúngico</i> en jugo de manzana con agregado de concentraciones de Sorbato de potasio (30, 125, 500 y 1000 ppm).				
	Concentraciones de Sorbato de potasio ensayadas			
	30 ppm	125 ppm	500 ppm	1000 ppm
<i>Penicillium expansum</i>	+	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	+	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	+	-	-	-

Tabla 2

Presencia (+) y ausencia (-) de crecimiento fúngico en jugo de manzana en con agregado de concentraciones de Benzoato de sodio (30, 125, 500 y 1000 ppm).

	Concentraciones de Benzoato de sodio ensayadas			
	30 ppm	125 ppm	500 ppm	1000 ppm
<i>Penicillium expansum</i>	+	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	-	-	-	-
<i>Botrytis cinerea</i>	-	-	-	-

4.1.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM) de quitosano

Los resultados de los ensayos *in vitro* demostraron que la concentración mínima de quitosano capaz de inhibir el crecimiento de los tres patógenos es diferente en PDA y en Agar Jugo de manzana (AJM). La inhibición en este último medio resultó mayor que en PDA. De esta forma la CIM en AJM que se muestra en la Imagen 4a fue menor o igual a 0,25% (concentración más baja evaluada), mientras que en PDA la CIM fue de 0,5% (Imagen 4b). Las CIM para *A. alternata* y *B. cinerea* no mostraron diferencias con los resultados obtenidos para *P. expansum*.

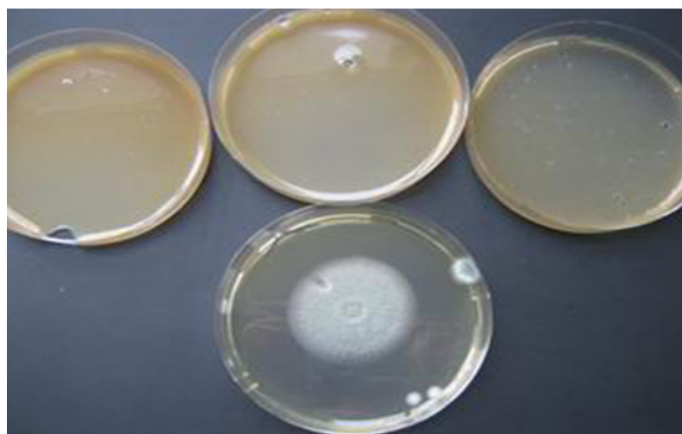


Imagen 4a: Arriba: *Penicillium expansum* en Agar Jugo de Manzana (AJM) con 1%, 0,5% y 0,25% de quitosano de izquierda a derecha. Abajo: *Penicillium expansum* en AJM sin quitosano.

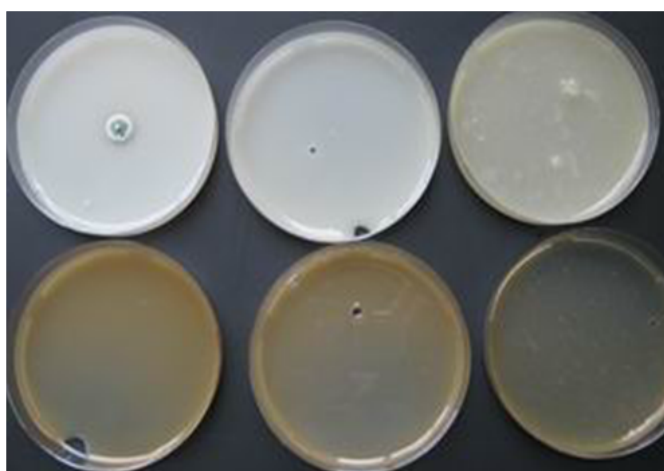


Imagen 4b: Arriba: *Penicillium expansum* en PDA con 0,25%, 0,5% y 1% de quitosano de izquierda a derecha. Abajo: *Penicillium expansum* en AJM conteniendo las mismas concentraciones de quitosano

4.2 Ensayos sobre fruta

4.2.1 Acción curativa de desinfectantes

A pesar de los buenos resultados obtenidos *in vitro*, ninguno de los desinfectantes ensayados fue capaz de tener acción curativa en heridas previamente infectadas como se muestra en la Imagen 5. El 100% de las heridas tratadas con desinfectantes evidenció síntomas de podredumbre en las condiciones del ensayo.



4.2.2 Acción curativa de conservadores y quitosano

El 100% de las heridas inoculadas y sometidas al tratamiento con los conservantes evidenciaron signos de podredumbre en los períodos de almacenamiento y temperaturas estudiadas.

Si bien los resultados *in vitro* del quitosano fueron alentadores, en fruta, al igual que en los ensayos anteriores, no se evidenció inhibición del patógeno. El 100% de las heridas inoculadas sometidas a un tratamiento por inmersión con quitosano evidenció síntomas de podredumbre, independientemente de la temperatura en las que se almacenó. Sin embargo, cuando el quitosano se inoculó en las heridas directamente, los síntomas de podredumbre aparecieron solamente en el 20% de las heridas tratadas y almacenadas

a 0-1 °C durante 3 meses. En las manzanas almacenadas 4 días a 25 °C el 100% de las heridas mostraron síntomas de podredumbre.

4.2.3 Acción curativa de tratamientos térmicos

La inmersión en agua caliente no resultó un tratamiento eficiente para curar heridas previamente inoculadas. El 100% de las heridas tratadas evidenció síntomas de podredumbre luego del almacenamiento en frío. Sin embargo, los tratamientos con aire caliente (curado) resultaron efectivos. Todas las heridas tratadas resultaron protegidas cuando se sometió la fruta a un tratamiento a 38 °C durante 4 días, y sólo un 1,3% presentaron síntomas de podredumbre cuando se trató la fruta inoculada con aire caliente a 44 °C por 20 horas, previo a tres meses de almacenamiento en frío (Imagen 6).

La Tabla 3 resume los resultados de los tratamientos térmicos sobre fruta y sus resultados como medida curativa en fruta almacenada 3 meses a 0-1°C en cámara fría.

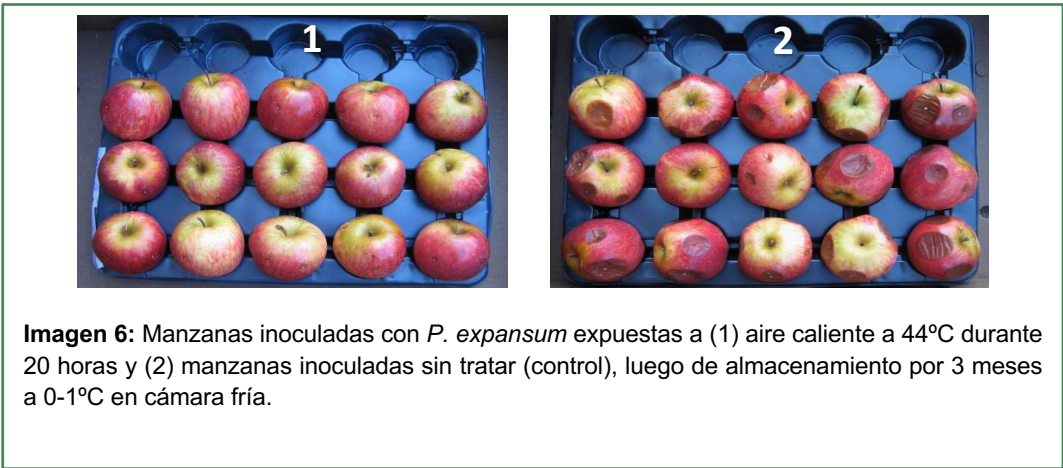


Tabla 3		
Incidencia de podredumbre en heridas de fruta inoculadas con <i>P. expansum</i> sometidas a diferentes tratamientos (efecto curativo). Valores seguidos de la misma letra no se diferencian estadísticamente ($p \leq 0.05$)		
Tratamiento	Heridas con podredumbre (%)	
	Tratamiento	control
Agua caliente 53 °C (3 min.)	100 a	100 a
Agua caliente 56 °C (3 min.)	100 a	100 a
Aire caliente 38°C (96 horas)	0 b	95 a
Aire caliente 44°C (20 horas)	1,3 b	95 a

4.2.4 Acción preventiva del Quitosano

En los que respecta a los ensayos realizados para evaluar la acción preventiva del quitosano, el 100% de las heridas de la fruta almacenada a 25 °C evidenciaron síntomas de podredumbre. Sin embargo, cuando la fruta se almacenó en cámara refrigerada sólo el 8% de las heridas tratadas presentaron signos de podredumbre. Por otra parte el 100% de las heridas de las frutas control desarrollaron la enfermedad, demostrando la acción preventiva del quitosano en el desarrollo de *P. expansum* a baja temperatura.

En la Gráfico 2 se muestra una comparativa entre los resultados del tratamiento con quitosano como curativo vs el tratamiento como preventivo, en heridas de frutas inoculadas artificialmente con *P. expansum* y almacenadas 3 meses a 0-1 °C

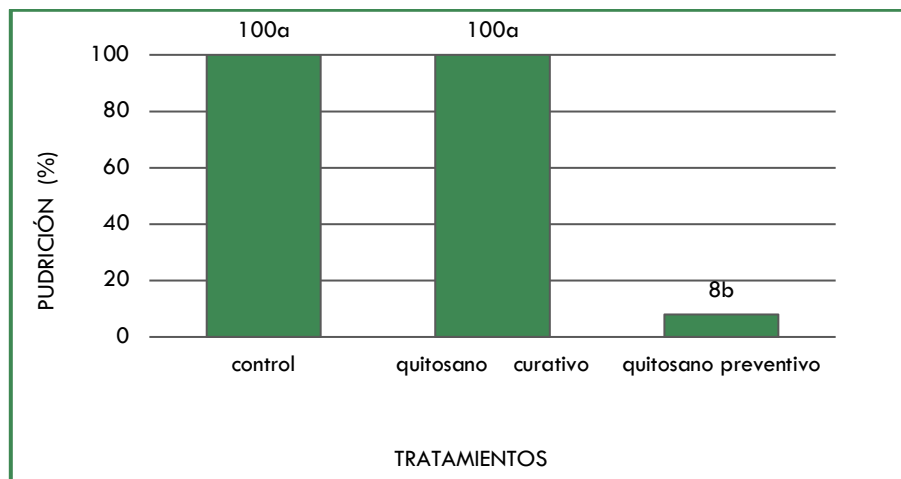


Gráfico 2: Porcentaje de incidencia de pudrición en manzanas control y tratadas por inmersión con quitosano en forma curativa y preventiva, luego del almacenados por 3 meses a 0-1 °C en cámara refrigerada. Valores seguidos seguidos de la misma letra no se diferencian estadísticamente ($p \leq 0.05$).

4.2.5 Acción preventiva de los tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos realizados tanto por inmersión como por “curado” no lograron causar efectos preventivos, ya que en todos los casos ensayados se obtuvo síntomas de podredumbre en el 100% de las heridas. En el Gráfico 3 se muestra un comparativo con los resultados obtenidos en los tratamientos térmicos realizados por “curado” tanto en sus acciones preventivas y curativas.

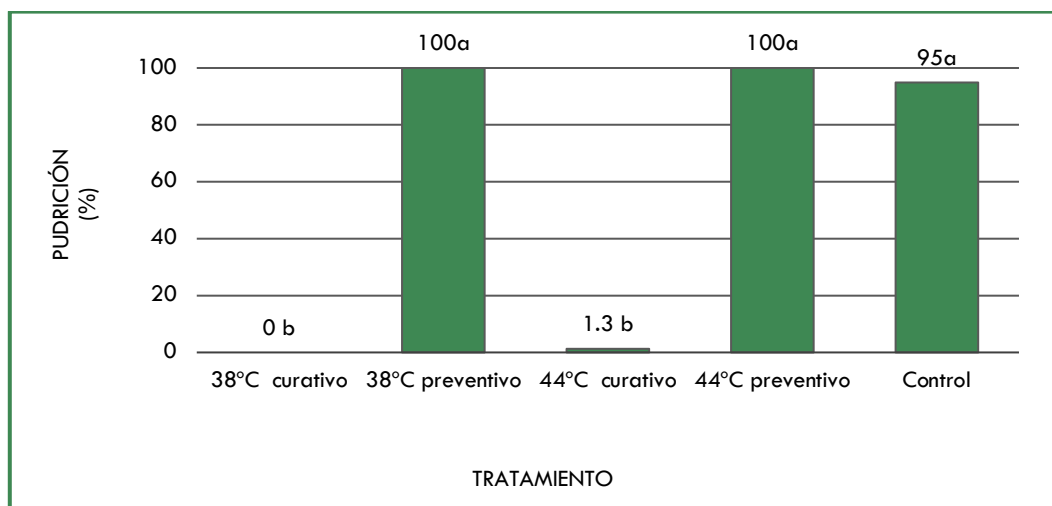


Gráfico 3: Porcentaje de pudrición en heridas para cada uno de los tratamientos térmicos ensayados por “curado” y el control correspondiente luego de almacenar las manzanas 3 meses a 0-1°C en cámara refrigerada. Valores seguidos de la misma letra no se diferencian estadísticamente ($p \leq 0,05$).

4.3 Estudio de indicadores de calidad y maduración de las manzanas sometidas a tratamientos térmicos.

En la Tabla 4 y 5 se muestran los resultados de los análisis de calidad de las manzanas luego de los tratamientos térmicos evaluados previo al ingreso a la cámara (T0) y luego de los 3 meses de almacenamiento (T3). Inmediato a los tratamientos térmicos (T0) se evidencia que las frutas tratadas a 38 °C durante 4 días y 44 °C 20 h presentaron un estado más avanzado como se observa claramente en los resultados del test de yodo. A los 3 meses de almacenamiento (T3) el tratamiento a 38 °C durante 4 días determinó mayor madurez que 44 °C 20 h. Sin embargo, éste fue el único tratamiento que al inicio (T0) tuvo una firmeza de pulpa menor respecto al tratamiento testigo. Luego de los 3 meses de almacenamiento el testigo mostró una firmeza superior que el resto de los tratamientos térmicos (Tabla 5). En lo relativo a la acidez titulable y a los SST para el tratamiento de 38 °C y 44 °C se registraron resultados estadísticamente comparables con los testigos, previo (T0) y después de tres meses de almacenamiento refrigerado (T3). Por su parte, a los 3 meses de almacenamiento (T3) los tratamientos por inmersión durante 3 min en agua caliente (53 °C ó 56 °C) se observó similar estado de madurez (test de yodo), contenido de SST y acidez titulable, y menor firmeza que el testigo.

Tabla 4 Acidez titulable, Sólidos Solubles Totales (SST), Firmeza y Test de Yodo en los diferentes tratamientos térmicos previo al almacenamiento en cámara (T0). Media $\pm$ desvío estándar.				
Tratamiento	SST ($^{\circ}$Brix)	Firmeza (N)	Test Yodo (Escala 1 a 6)	Acidez titulable (g ac.málico/100 mL jugo)
Testigo	15,9 $\pm$ 0,63 b	55,1 $\pm$ 6,1 a	3,4 $\pm$ 0,73 b	0,253 $\pm$ 0,083 ab
38°C 96 h	15,7 $\pm$ 1,25 b	55,5 $\pm$ 5,4 a	4,4 $\pm$ 0,53 a	0,228 $\pm$ 0,033 b
44°C 20 h	16,1 $\pm$ 0,79 ab	47,9 $\pm$ 8,0 b	4,7 $\pm$ 0,57 a	0,216 $\pm$ 0,023 b
53°C 3 min	16,8 $\pm$ 1,13 a	54,4 $\pm$ 6,5 a	3,8 $\pm$ 0,63 b	0,312 $\pm$ 0,014 a
56°C 3 min	16,0 $\pm$ 1,32 b	56,2 $\pm$ 6,4 a	3,8 $\pm$ 0,68 b	0,303 $\pm$ 0,011 a
Valor p	0,0025	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV (%)	6,4	11,8	15,6	19,8
Medias seguidas de la misma letra, dentro de la misma columna, no se diferencian estadísticamente				

Tabla 5 Acidez titulable, Sólidos Solubles Totales (SST), Firmeza y Test de Yodo en los diferentes tratamientos térmicos luego del almacenamiento en cámara (T3). Media $\pm$ desvío estándar.				
Tratamiento	SST ($^{\circ}$Brix)	Firmeza (N)	Test yodo (Escala 1-6)	Acidez titulable (g ac-málico/100 mL jugo)
Testigo	16,1 $\pm$ 0,16 ab	58,8 $\pm$ 1,3 a	4,9 $\pm$ 0,1 bc	0,1742 $\pm$ 0,0024 a
38°C 96 h	16,2 $\pm$ 0,19 ab	51,9 $\pm$ 1,1 bc	5,5 $\pm$ 0,1 a	0,1642 $\pm$ 0,0034 ab
44°C 20 h	15,8 $\pm$ 0,16 b	48,4 $\pm$ 1,5 c	4,5 $\pm$ 0,1 c	0,1496 $\pm$ 0,0014 b
53°C 3 min	16,8 $\pm$ 0,22 a	50,4 $\pm$ 0,9 bc	5,2 $\pm$ 0,1 ab	0,1731 $\pm$ 0,0044 a
56°C 3 min	16,6 $\pm$ 0,17 a	53,3 $\pm$ 0,9 b	4,7 $\pm$ 0,1 c	0,1653 $\pm$ 0,0051 a
Valor p	0,0125	<0,0001	<0,0001	0,0004
CV %	6,03	11,48	9,91	5,32
Medias seguidas de la misma letra, dentro de la misma columna, no se diferencian estadísticamente				

5 Discusión

Este trabajo se centró en ensayar diferentes tratamientos para las manzanas previo al almacenamiento poscosecha de forma de reducir las pérdidas causadas por patógenos fúngicos, en especial *P. expansum*, sin recurrir al uso de fungicidas.

Se ensayó la acción de diferentes desinfectantes sobre los patógenos que más frecuentemente causan daños en la fruta en esta etapa.

Se obtuvo la misma acción fungicida para el hipoclorito de sodio 50 ppm a pH= 6 (desinfectante recomendado por las normas de producción integrada) que para una solución acuosa de dióxido de cloro 3ppm (pH=6), y para las soluciones de dióxido de cloro estabilizado (10 ppm, pH=6) y de peróxido de hidrógeno 3%. En los cuatro casos se constató la capacidad de destruir conidias de los patógenos de manzana ensayados (*P. expansum*, *B. cinerea* y *A. alternata*) en solución acuosa. Sin embargo, ninguno de los desinfectantes fue capaz de impedir el desarrollo de estos hongos en heridas previamente inoculadas, es decir no se obtuvo efecto curativo. Este resultado podría deberse a problemas de penetración del desinfectante en las heridas o a una disminución de la concentración en el sitio de acción por reacción con los tejidos de la herida, ya que se trata de desinfectantes oxidantes que reaccionan, justamente, oxidando materia orgánica.

El uso de cualquiera de estos desinfectantes en la línea de empaque sería un buen sustituto del hipoclorito de sodio. Estas alternativas tienen ventajas frente al hipoclorito de sodio por ejemplo, no producen residuos tóxicos y tienen un rango de efectividad menos dependiente del pH. La utilización de estos desinfectantes evitaría la contaminación cruzada de frutas sanas con conidias de patógeno que pudieran pasar al agua proveniente de frutas infectadas, pero no impediría que manzanas ya infectadas desarrollaran la pudrición durante el almacenamiento.

Estudios como el de Zhang y Fu (2018) muestran que utilizando dióxido de cloro en manzanas con heridas inoculadas con *P. expansum*, en concentraciones de 50 mg/L sólo se logró un 10% aproximadamente de reducción del diámetro de pudrición de las heridas respecto al control y recién a una concentración de 200 mg/L se logró obtener un 48% de reducción. Este ensayo evidenció que para lograr tener efectos curativos significativos en la fruta se necesitan concentraciones de dióxido de cloro mucho mayores a las testeadas en este ensayo.

En esta línea se han estudiado diversos mecanismos de desinfección superficial para frutas y hortalizas tanto con componentes químicos como físicos. Algunos estudios han investigado el efecto con ozono, ácido peracético, rayos gamma, técnicas ultrasónicas, rayos UV, agua electrolizada entre otros (Gil *et al.*, 2009; Feliziani *et al.*, 2016; Aguayo *et al.*, 2017; De Siqueira *et al.*, 2018). Se obtuvieron resultados prometedores pero la utilización de las mismas a nivel de la línea de empaquetado y su eficiencia dependerá del tipo de fruta u hortaliza que se trate, ya que algunos tratamientos podrían alterar la calidad de los mismos. Por otra parte, la implementación de algunas de estas tecnologías dependerá de la posibilidad económica de cada establecimiento. Desde ese punto de vista los compuestos ensayados en este trabajo tienen la gran ventaja que son de fácil implementación y de bajo costo.

En cuanto al estudio para utilizar conservadores de alimentos como el benzoato de sodio y sorbato de potasio para prevenir las podredumbres en poscosecha, no se obtuvieron resultados curativos en baño para fruta inoculada con *P. expansum* independientemente de la temperatura a la que se almacenara la fruta. Hay diferentes estudios que analizan el efecto de estos conservantes en hongos. El estudio de Fadda *et al.* (2015) no logra la inhibición total del *P. expansum* en placas de PDA con concentraciones de hasta 2000 ppm de sorbato de potasio. Esta diferencia con respecto a los resultados aquí presentados se puede deber a la variación del medio de cultivo utilizado, cuya interacción con el producto químico puede influir en el desarrollo del patógeno. En un medio líquido el contacto del conservante con las conidias es mayor que en un medio sólido. Por otro lado, el trabajo mencionado no señala a que pH se utilizó la solución del conservante el cual tiene un conocido efecto sobre la acción del mismo. Los ácidos orgánicos, tales como el sórbico o benzoico se aplican como sales de sodio o potasio, pero son activos en su forma no dissociada, ya que es de esa forma que pueden ingresar al interior celular del microorganismo a controlar. Por ello, para lograr actividad antimicrobiana, deben ser utilizados en soluciones que tengan un pH cercano o inferior al pKa del conservador. En el caso del ácido sórbico el pKa es de 4.8 por lo cual a pH inferior o cercano a 5 (como el utilizado en este trabajo) tiene incidencia sobre el crecimiento de los hongos (Rivas, 2018). En el caso de Zhelifonova *et al.* (2017) se estudió el efecto tanto del benzoato de sodio como el del sorbato de potasio sobre el crecimiento de 3 especies diferentes del género *Penicillium* en medio sólido a pH= 5.4, obteniéndose inhibición a concentraciones superiores a 500 ppm para ambos conservantes. A pesar de los resultados que Fadda *et al.* (2015) obtuvieron *in vitro*, en fruta lograron tener algún efecto curativo disminuyendo al 43% la pudrición en una

variedad de manzana y al 68,3% en otra con respecto a los controles. Aquí hay varios puntos que se pueden considerar. Primeramente en la fruta se utilizó una concentración de 1% de sorbato de potasio, concentración 80% mayor que la utilizada en este trabajo. Otro punto a tener en cuenta es que el conservante se inoculó directamente en la herida por lo que también puede existir un factor de penetración del conservante a la herida como se mencionó anteriormente en el caso de los desinfectantes. Por último, se evidencia como la variedad de las manzanas, debido a su variabilidad biológica, que incluye variación en el pH de la pulpa, influyen notoriamente en los resultados obtenidos para un mismo tratamiento. Cabe destacar que las variedades utilizadas por el autor no son Red Delicious.

Como un estudio a futuro para indagar más sobre la acción de los conservantes y su posible aplicación directamente en el almacenamiento, se podría realizar la misma prueba con al menos 2 variedades diferentes de manzanas de importancia económica en nuestro país y con concentraciones de conservantes cercanas las utilizadas por Fadda *et al.* (2015). Si bien no existe un límite máximo para la cantidad de estos conservantes sobre fruta en el Reglamento Bromatológico Nacional (RBN), existen valores máximos admisibles en pulpa de fruta. Por ello sería importante, luego del tratamiento, determinar la cantidad de conservantes que queda sobre la fruta, de forma tal que no se supere la concentración admitida por el RBN por gramo de pulpa de fruta, en caso de que la fruta fuera consumida directamente sin lavar.

Además, se podrían realizar los ensayos en fruta para *B. cinerea* y *A. alternata* a modo comparativo, ya que en los resultados *in vitro* los mismos fueron inhibidos en casi todas las concentraciones ensayadas.

Para quitosano se realizaron pruebas de inhibición de los hongos patógenos, tanto *in vitro* como en fruta y en éstas últimas se quiso evaluar no sólo su efecto curativo sino también su efecto como preventivo de la infección.

En cuanto a las pruebas *in vitro* se observó una inhibición del patógeno a concentraciones menores en AJM que en PDA (0,25 y 0,50% respectivamente). Este resultado reafirma la idea de la acción inhibidora depende de la matriz y sobre del pH en el cual se da la interacción con el hongo. El AJM tiene un pH más bajo que el PDA por la naturaleza intrínseca más ácida de la manzana que la de la papa (Casaubon *et al.*, 2018).

En estudios como el de Darolt *et al.* (2016) se obtuvieron resultados con algunas diferencias con respecto a los tratamientos con quitosano evaluados en este trabajo. Ellos analizaron *in vitro* la inhibición de la germinación de *P. expansum* enfrentado a

concentraciones de 0,1; 0,25; 0,5 y 1% de quitosano y tuvieron una disminución de la germinación entre el 70 y 80% en las concentraciones evaluadas pero sin diferencias significativas entre las mismas. En el presente trabajo se logró inhibir completamente el crecimiento del hongo enfrentado a concentraciones mayores o iguales a 0.5% y 0.25% en PDA y AJM respectivamente. Esta diferencia entre ambos trabajos podría deberse a diferencias en el pH de los tratamientos (no mencionado en el trabajo de Darolt *et al.*, 2016) o a diferencias en el peso molecular y el grado de desacetilación del quitosano utilizado, variable desconocida en ambos trabajos. En el estudio de Liu *et al.* (2007) se logró la inhibición del crecimiento del patógeno en PDA a una concentración del 0,5% de quitosano exactamente igual como en el presente estudio.

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 (Verlee *et al.*, 2017). 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 dependen 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 sobre *Aspergillus niger* no se vio afectada por el peso molecular o el grado de desacetilación. De acuerdo a estos antecedentes, todas estas variables deben tenerse en cuenta al comparar resultados de diferentes formulaciones de quitosano en el mismo patosistema.

Al realizarse las pruebas sobre fruta se pudo observar la incidencia de diferentes factores en la efectividad de los tratamientos como son la temperatura de almacenamiento y la forma de aplicación del producto.

El quitosano no logró controlar al patógeno en ninguno de los tratamientos (ni preventivo ni curativo) ensayados cuando la fruta tratada se almacenó a 25 °C. Esto podría deberse a que se trabajó a la temperatura óptima de crecimiento del hongo (Carrillo, 2003) y por ende presenta una complejidad mayor poder controlarlo por la velocidad de su desarrollo.

En el caso de los tratamientos curativos la forma de aplicación del producto fue determinante a la hora de obtener resultados que detuvieran la infección del patógeno.

En los tratamientos por inmersión, el quitosano no fue capaz de impedir el crecimiento del hongo y se registró 100% de pudrición para ambas temperaturas de almacenamiento. Estos resultados son congruentes con lo obtenido por el trabajo de Darolt *et al.* (2016). Estos autores sumergieron las manzanas, previamente con las heridas inoculadas con una suspensión de *P. expansum*, en una solución de 0,5% de quitosano por diferentes períodos de tiempo y las almacenaron por 12 días a 25 °C. Los resultados fueron de 100% de pudrición al igual que en este trabajo en el cual se utilizó una concentración mayor de quitosano.

En el presente estudio, el único caso donde se logró obtener efecto curativo, con sólo un 20% de pudrición en la fruta, fue en el tratamiento en el cual se realizó la aplicación directa del quitosano en las heridas y la fruta fue almacenada en cámara refrigerada. Este resultado fortalecería nuevamente la hipótesis de la dificultad de acceso de las sustancias inhibitorias al sitio de acción (interior de las heridas), al igual que se planteó anteriormente.

A la hora de evaluar los resultados obtenidos con quitosano como preventivo de la infección en manzanas los resultados fueron diferentes. Se logró una clara acción preventiva en las manzanas almacenadas en cámara de frío. Este resultado también coincide con lo publicado por Darolt *et al.*, (2016) quienes habiendo realizado el tratamiento con una concentración de 1% de quitosano lograron una reducción del 24% de la incidencia del patógeno y 45% de la severidad de la infección. Esto demuestra que el quitosano tiene acción preventiva y que la concentración utilizada influye en la capacidad protectora de la sustancia.

Nuevamente, la capacidad de penetración del quitosano aparece como un factor que influye en la capacidad protectora. Esto quedó verificado con los resultados del estudio de Darolt *et al.* (2016) y en de Liu *et al.* (2007) en donde se ensayaron, para probar el efecto preventivo, por inoculación directa en la herida, obteniendo así con una concentración del 1%, 93% de reducción de la incidencia y 87% de la severidad de la infección en el primer caso y en el segundo estudio una reducción en el entorno del 40% aproximadamente de reducción de la infección. Si bien este último estudio está realizado en tomate, claramente el factor de penetración de la sustancia es de relevante importancia y sería necesario seguir investigándolo más a fondo. A modo de ejemplo, se puede intentar hacer pruebas de inmersión en combinación con agentes tensoactivos que faciliten la penetración y/o con concentraciones mayores de quitosano para evaluar qué concentración termina efectivamente causando un efecto preventivo en el punto de acción.

Están ampliamente documentados los efectos fungicidas del quitosano en poscosecha en diferentes frutas y para diferentes patógenos (Liu *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2014; Darolt *et al.*, 2016; Singh y Sharma, 2018), así como los posibles mecanismos de acción del mismo para disminuir las incidencias de la infección. Estos mecanismos de acción van desde una barrera física, como la formación de un film protector por el cual se dificulta el acceso del patógeno a los tejidos del huésped; a la inducción de los mecanismos de resistencia propios de la fruta tal como son la estimulación de expresión de genes de resistencia, aumentando la producción de enzimas tales como: catalasa, peroxidasa, gluconasa y quitinasa, la producción de especies reactivas del oxígeno (Li *et al.*, 2015) y la inducción de la producción de fitoalexinas que son compuestos con acciones antimicrobianas (Singh y Sharma, 2018).

Por todos estos antecedentes, el quitosano es una sustancia con muchísimo potencial y en la cual habría que seguir ahondando en sus posibles formas de introducción a la cadena productiva en poscosecha. Además posee grandes atributos para la sustitución y/o reducción del uso de los fungicidas. Destacándose principalmente por ser una sustancia inocua para el consumidor y un compuesto natural (por ende biodegradable) por lo que no implicaría un alto impacto ambiental a considerar.

Todas estas cualidades cada vez son más requeridas, tanto por los consumidores como por los mercados internacionales.

Los tratamientos térmicos en poscosecha poseen varios de los atributos anteriormente expuestos para el quitosano. Son inocuos, ecológicamente amigables, no dejan residuos, de relativo bajo costo y fácil aplicación en la línea de producción (Fallik, 2004; Usall *et al.*, 2016). Por estos motivos, han sido ampliamente estudiados como opción para poder bajar la incidencia de los patógenos que atacan la fruta en esta etapa del ciclo productivo de la misma.

Al analizar los resultados obtenidos en los tratamientos térmicos utilizados en este trabajo se pueden observar diferentes efectos. En otros trabajos, los tratamientos realizados por inmersión en agua caliente no fueron efectivos ni de forma preventiva ni de forma curativa, a pesar de utilizar tiempos y temperaturas que están dentro de los rangos recomendados para este tipo de tratamiento (Fallik, 2004; Usall *et al.*, 2016). Sin embargo, otros estudios han tenido éxito en controlar la infección por *P. expansum* con tratamientos curativos por inmersión en manzanas. En estos expusieron la fruta 10 minutos a 45 °C sin tener consecuencias en la calidad y apariencia de la fruta (Usall, *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2020). Esto podría implicar que la combinación tiempo-temperatura utilizada no fue la adecuada en las condiciones intrínsecas de nuestro

experimento. La combinación “adecuada” de temperatura-tiempo de exposición depende de la conjunción de varios factores y cambia en cada caso según varias causas. La variedad de manzana y el tamaño de la fruta a tratar son parámetros a considerar. En particular hay variedades como las Deliciosas que son relativamente más resistentes al daño térmico por inmersión (Lurie *et al.*, 1998) y, en general, a mayor tamaño de fruta se admiten mayores tiempos de exposición. La naturaleza del patógeno que se quiere controlar también debe ser considerada. *B. cinerea* es más sensible a las temperaturas que *A. alternata* y *P. expansum* es relativamente resistente a las altas temperaturas (Schirra *et al.*, 2000). También hay otros factores que se han evidenciado en estudios realizados para controlar la ocurrencia de *P. expansum* y *Penicillium digitatum* descubriendo que hay una clara incidencia en el éxito del tratamiento entre el tiempo transcurrido desde la inoculación y en el que se le realiza el tratamiento de inmersión térmico. Si el tratamiento se realiza a las 24 horas posteriores a la inoculación, el tratamiento reduce la incidencia de la infección, pero si se realiza a las 2 horas postinoculación (tal como se realizó en este trabajo) no logra controlar al patógeno (Usall *et al.*, 2016). A nivel productivo también forma parte de la “combinación adecuada” la posible rapidez de la aplicación del tratamiento en la línea de empaque ya que, por motivos comerciales, cuanto más rápido sea el tratamiento, mayor cantidad de fruta se podrá tratar en menos tiempo y esto es mejor para el negocio. Los tratamientos por inmersión en agua caliente, (de poder replicar los resultados obtenidos por los autores mencionados), serían una buena alternativa de control ya que debido a que el agua tiene mejor transferencia de calor que el aire, estos tratamientos llevan menor tiempo de exposición, y suelen ser más económicos que otros, como por ejemplo los que consisten en mantener la fruta a determinada temperatura por varios días (Schirria *et al.*, 2000; Fallik, 2004; Usall *et al.*, 2016; Kabelitz *et al.*, 2019). Por otro lado, los excelentes resultados curativos obtenidos en los tratamientos por el proceso de curado son consistentes con los estudios realizados por Fallik (2003) donde inoculó manzanas con *P. expansum* y luego las trató a 38, 42 y 46°C por 96, 24 y 12 h respectivamente y posteriormente mantuvo las manzanas tratadas 14 días a 20°C obteniendo en el primer caso 0% de pudrición y en los otros 2 casos porcentajes de pudrición menores al 2,5%. En el presente trabajo, luego del tratamiento realizado a 44°C durante 20 h, el porcentaje de pudrición fue del 1,3%, siendo resultados muy similares.

El éxito del curado de la fruta a 38 °C por 72 o 96 h como tratamiento curativo para controlar la incidencia de *P. expansum* está ampliamente descripta y parece ser el tratamiento más exitoso (Klein and Lurie, 1992; Lurie *et al.*, 1998; Fallik *et al.*, 2001).

No obstante, con el mismo método estudiado como tratamiento preventivo, no se obtuvo éxito controlando al patógeno con una prevalencia del 100% de pudrición de los frutos. Otros estudios como el de Tu *et al.* (2006), han obtenido resultados diferentes donde realizaron un tratamiento preventivo por curado en manzanas Red Fuji a 38 °C por 4 días y luego almacenado 16 semanas a 0 °C y posteriormente 1 semana a 20 °C logrando una reducción del 16,67% en la pudrición por *P. expansum* y un 22,8% en la reducción del área de incidencia en el fruto, y con el mismo método, pero como tratamiento curativo, obtuvo un 100% de efectividad coincidiendo con este trabajo y los otros mencionados anteriormente.

La diferencia en los resultados obtenidos entre los trabajos con respecto a los porcentajes de protección con tratamientos preventivos podría deberse a la variedad de manzana utilizada, ya que, como se mencionó anteriormente, las variedades Deliciosas son las más susceptibles al patógeno (Leoni y Mondino, 2003).

Los mecanismos por los cuales resultan efectivos algunos tratamientos térmicos son multifactoriales. El calor provoca un desencadenamiento de reacciones metabólicas en la fruta que activan los mecanismos de defensa intrínsecos, incrementando la actividad de diversas enzimas como la catalasa, peroxidasa, glucanasa y quitinasa; y a su vez se inhibe la síntesis de etileno (hormona responsable de la maduración de la fruta), entre otros (Fallik, 2004; Yu *et al.*, 2020). Los tratamientos también pueden incidir en la misma inactivación de la germinación de las esporas y/o desarrollo del micelio del patógeno que esté presente en el fruto (Fallik *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 2020).

Pensando en aplicar los tratamientos curativos en escala productiva, se presenta un tema fundamental a discutir que es el efecto que los mismos tuvieron en la calidad de las manzanas.

Todos los tratamientos térmicos realizados tuvieron en mayor o menor medida incidencia en la calidad y madurez de la fruta. Inmediato a los tratamientos térmicos (T0) la fruta se observó más madura (test de yodo), Tabla 4. De los tratamientos que demostraron tener la capacidad de controlar al patógeno, el candidato a seguir investigándolo para implementarlo a escala productiva pareciera ser el de curado a 38 °C durante 96 horas. Ya que fue el que menos afectó la calidad de las frutas, siendo la firmeza, los SST y la acidez titulable estadísticamente comparables al tratamiento

testigo, aunque con un mayor grado de madurez (test de yodo). No obstante, el curado a 44° no obtuvo resultados tan disímiles con el tratamiento a 38 °C en las variables de calidad de las manzanas, siendo los frutos menos firmes.

Los resultados del presente trabajo se aprecian como razonablemente equiparables con los obtenidos por Klein y Lurie (1992) en cuanto a lo alcanzado en SST, (si bien los estudios no son idénticos en cuanto al momento de medición de indicadores ni variedad de manzana utilizada), no así en cuanto a la acidez titulable ni la firmeza para el tratamiento de 38 °C por 96 h, obteniendo los autores para este último indicador incluso valores mayores que los testigos. En otros trabajos donde también se evaluó la firmeza de la fruta luego de un tratamiento de 38 °C durante 72 o 96 h y posterior almacenamiento a 0 °C también se obtuvo mayor firmeza en las frutas tratadas que en las testigos (Sams *et al.*, 1993; Lurie *et al.*, 1998) e incluso en el trabajo de Klein y Lurie (1991) se reporta que las manzanas tratadas mantuvieron la firmeza aún hasta 6 meses en almacenamiento a 0 °C.

Las causas que pudieran explicar los resultados obtenidos por los autores en relación a la firmeza de la pulpa pueden ser de diferentes índoles. Sin embargo los investigadores sostienen que debido al efecto de la temperatura elevada, las enzimas responsables de la degradación de la pared celular se ven afectadas por los tratamientos térmicos induciendo a una pulpa más firme (Klein y Lurie, 1991; Pongener *et al.*, 2018). Por otro lado, también se corroboró que se produce un empaquetamiento más cercano de las hebras de pectina, lo que conlleva a frutos que, en algunos casos, mantienen la firmeza o incluso la aumentan según otros estudios (Pongener *et al.*, 2018).

En el presente trabajo, tal como se señaló, los resultados obtenidos no coincidieron con los recientemente citados respecto a la firmeza. Esto podría explicarse, quizá, en la variedad de manzanas utilizadas en la bibliografía descripta, ya que cabe destacar que ninguno de los trabajos mencionados anteriormente se realizó en la variedad Red Delicious como en este trabajo. Además, tal como señala DeEll *et al.* (1999), no todas las variedades de manzanas responden positivamente al tratamiento térmico en cuanto a la firmeza, sosteniendo por ejemplo que la variedad McIntosh con tratamiento de 38° a 40° durante 1 a 3 días, evidenció una disminución de la firmeza en relación al grupo testigo.

A su vez es interesante señalar que, más allá de las divergencias mencionadas, los datos obtenidos en el presente trabajo son coherentes entre sí, correlacionándose una menor firmeza con un mayor grado de madurez obtenido en el test de yodo.

Dado que la variedad de manzana se presenta como un factor muy influyente en el comportamiento de los diferentes tratamientos, sería de relevancia repetir el tratamiento realizado en el presente trabajo para corroborar esta hipótesis. También se podrían reproducir las condiciones de los autores citados en la variedad Red Delicious, para comprobar si el comportamiento reportado para la firmeza también aplicaría en ésta variedad específica.

Debido a lo anteriormente expuesto, los tratamientos térmicos tienen un excelente potencial para controlar patógenos, pero deben ser estudiados a medida ya que su capacidad de controlar los mismos y no afectar la calidad de la fruta depende de varios factores como son la tolerancia térmica de la variedad de la fruta, el patógeno que se quiere controlar, el grado de madurez de la fruta al momento de la cosecha, entre otros (Lurie *et al.*, 1998).

Como estudio a futuro podrían probarse nuevas combinaciones de tiempo y temperatura para poder optimizar tiempo-resultados a nivel de la línea productiva para esta variedad de manzana.

6 Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se pudo determinar que los desinfectantes ensayados resultaron efectivos en contacto directo con suspensiones de conidias del patógeno. Sin embargo, no evidenciaron efecto curativo en heridas de manzana inoculadas con el patógeno cuando la fruta era tratada por inmersión en la solución desinfectante. De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que el uso de cualquiera de estos desinfectantes en la línea de empaque evitaría la contaminación cruzada de frutas sanas, con conidias de patógeno que pudieran pasar al agua proveniente de frutas infectadas. Esto no impediría que manzanas ya infectadas desarrollaran la pudrición durante el almacenamiento.

Los conservantes estudiados tampoco tuvieron efecto curativo al ser aplicados como baño de fruta. Para el quitosano se demostró que posee un efecto preventivo al aplicarlo como baño de fruta. Los tratamientos térmicos que utilizan aire caliente resultan muy prometedores como tratamientos curativos.

Debido a estos resultados se concluye que tanto el quitosano como los tratamientos térmicos son opciones alentadoras para implementar en la línea de empaque, dado al potencial demostrado uno como preventivo y otro como curativo en heridas inoculadas.

Sin embargo, en el caso de los tratamientos térmicos la calidad de la fruta tratada se vio afectada. A futuro se debería intentar nuevas combinaciones temperatura-tiempo de forma de poder optimizar y conseguir un tratamiento curativo que no afectara la calidad de la fruta. Así como también se podrían estudiar más indicadores de la calidad de la fruta para tener más cantidad de parámetros para comparar y relacionar entre sí. También habría que seguir estudiando el efecto preventivo del quitosano con mayores concentraciones para obtener mejores resultados.

El enfoque tanto en tratamientos térmicos como en el quitosano es fundamental, dado que son tratamientos inocuos para los consumidores, de fácil implementación en la línea de empaque y relativamente de bajo costo.

Bibliografía

- Aguayo, E; Gomez, P; Artes-Hernandez, F; Artes, F. 2017. Tratamientos químicos desinfectantes de hortalizas de IV gama: ozono, agua electrolizada y ácido peracético. *Agrociencia Uruguay*. 21:7-14.
- Benito, E; Arranz, M; Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Rev Iberoam Micol*, 17, S43-S46.
- Bridges, D; Wu, V. 2018. Gaseous Chlorine Dioxide for Postharvest Treatment of Produce. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, 243- 252
- Carrillo, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta, Argentina, 61-69; 81-86.
- Casaubon, P; Lamshing, P; Isoard, F; Casaubon, S; Delgado, D, Pérez, A. 2018. pH de los alimentos: ¿una herramienta para el manejo de los pacientes con reflujo gastroesofágico?. *Rev Mex Pediatr* 85 (3) 89-94
- Colodner, A. 2014. Monitoreo en las cámaras frigoríficas. *Fruticultura y Diversificación* N° 73, 23-25.
- Corry, J. 1987. Relationships of water activity to fungal growth. *Food and Beverage Mycology*, 51-99.
- Darolt JC; Rocha, AC; Di Piero RM. 2016. Effects of the protective, curative, and eradivative applications of chitosan against *Penicillium expansum* in apples. *Braz J Microbiol.*;47(4):1014-1019.
- D'Aquino, S; Fadda, A; Barberis, A; Palma, A; Angioni, A; Schirra, M. 2013. Combined effects of potassium sorbate, hot water and thiabendazole against green mould of citrus fruit and residue levels, *Food Chemistry*, 141 (2), 858-864,
- DeEll, J R; Fadia, S; Shahrokh, K. 1999 Factors influencing apple fruit firmness, *Compact Fruit Tree* 32.2, 56-58.
- Delgado R; Pérez, G. 1998. Características biológicas de *Penicillium digitatum*, *P. italicum* y *P. ulaiense* en postcosecha de citrus. Facultad de Agronomía. Montevideo. Tesis de Ing. Agr.
- De Siqueira L; Sitonio, K; Cardoso de Aquino, A; Barros, L. 2018. Hydrogen Peroxide (H₂O₂) for Postharvest Fruit and Vegetable Disinfection. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, 91-99.

Elad, Y; Williamson,B; Tudzynski P; Denle, N. 2007. Botrytis spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems – An Introduction. Botrytis: Biology, Pathology and Control. 1-8.

Fadda, A; Barberis, A; D'Aquino, S; Palma, A; Angioni, A; Lai, F; Schirra, M. 2015. Residue levels and performance of potassium sorbate and thiabendazole and their co-application against blue mold of apples when applied as water dip treatments at 20 or 53°C. Postharvest Biology and Technology, 106, 33-43.

FAO. 2017. Estimación de pérdidas y desperdicio de alimentos en el Uruguay: alcance y causas. (en línea). Consultado 20 de agosto de 2020. Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/FAO-countries/Uruguay/docs/INFORME_FINAL_-_Estimacion_de_p%C3%A9rdidas_y_desperdicio_de_alimentos_en_Uruguay.pdf [consultado: 15/10/20]

Falchi, E.G. 2001. Elaboración de manuales de procedimientos para mejorar la calidad comercial en Manzana, Pera, Durazno. Informe de Consultoría. Programa de Mejoramiento de la Calidad Comercial de Frutas y Hortalizas para consumo en fresco MGAP - PREDEG – DPAV. 163 p.

Fallik, E; Grinberg, S; Gambourg, M; Lurie, S. 1995. Prestorage heat treatment reduces pathogenicity of *Penicillium expansum* in apple fruit. Plant Path 45, 92-97.

Fallik, E; Sharon, T; X Feng; Lurie, S. 2001. Ripening characterization and decay development of stored apples after a short pre-storage hot water rinsing and brushing. Innovative Food Science & Emerging Technologies 127-132.

Fallik, E. 2004. Prestorage hot water treatments (immersion, rinsing and brushing), Postharvest Biology and Technology 125–134.

Feippe, A. 2003. Evaluación de la madurez de la manzana sobre la base del contenido y degradación de almidón (test de yodo). Disponible en http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/pol/2003/madurez_yodo.pdf [consultada: 18/04/20]

Feliziani, E; Lichter, A; Smilanick, J; Ippolito, A. 2016. Disinfecting agents for controlling fruit and vegetable diseases after harvest. Postharvest Biology and Technology. 112. 53-63.

Galvez, E. 2006. Calidad e inocuidad en las cadenas latinoamericanas de comercialización de alimentos. FAO, Rome. Dirección de Sistemas de Apoyo a la Agricultura. Disponible: <http://www.fao.org/3/a0843s/a0843s01.pdf> [Consultado: 10/02/20].

Garmendia, G; Vero, S. 2006. Métodos para la desinfección de frutas y hortalizas. Revista Horticultura, N° 197: 18-27.

Gil, M; Selma, M; López, F; Allende, A. 2009. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. International Journal of Food Microbiology 134: 37–45.

- Gutiérrez, P; Ramos, A; Rodríguez, C; Coronado, L; Angulo, J; González, R. 2018. Chitosan for Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. *Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables*, 231-241
- Hongpattarakere, T.; Riyaphan, O. 2008. Effect of deacetylation conditions on antimicrobial activity of chitosans prepared from carapace of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 1–9
- Jijakli, M.H; Lepoivre P. 2004. State of the Art and Challenges of Post-harvest Disease Management in Apples. In: Mukerji K.G. (eds) *Fruit and Vegetable Diseases. Disease Management of Fruits and Vegetables*, vol 1. Springer, Dordrecht
- Kabelitz, T; Schmidt, B; Herppich, W B; Hassenberg, K. 2019. Effects of hot water dipping on apple heat transfer and post-harvest fruit quality. *LWT*. Vol 108, 416-420
- Klein, J. D; Lurie, S. 1991. Postharvest heat treatment and fruit quality. *Postharvest news and information*. 2, 15-19
- Klein, J. D; & Lurie, S. 1992. Prestorage Heating of Apple Fruit for Enhanced Postharvest Quality: Interaction of Time and Temperature, *HortScience HortSci*, 27(4), 326-328.
- Lacey, J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Supplement 11S - 25S.
- Lurie, S; Fallik, E; Klein, J; Kozar, F; Kovacs. 1998. Postharvest Heat Treatment of Apples to Control San Jose Scale (*Quadraspidiotus perniciosus* Comstock) and Blue Mold (*Penicillium expansum* Link) and Maintain Fruit Firmness. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. American Society for Horticultural Science. 123 (1) 110-114.
- Leoni, C.; Mondino, P. 2003. Enfermedades de poscosecha en frutales de hoja caduca, uva de mesa y citrus. *Actualización técnica en fisiología y manejo poscosecha de frutas y hortalizas*.
- Li, H; Wang, Y; Liu, F; Yang, Y; Wu, Z; Cai, H; Zhang, Q.; Wang,Y; Li, P. 2015. Effects of chitosan on control of postharvest blue mold decay of apple fruit and the possible mechanisms involved. *Scientia Horticulturae*, 186, 77-83.
- Lima, G; Castoria, R; De Curtis, F; Raiola, A; Ritieni, A; De Cicco, V. 2011. Integrated control of blue mold using new fungicides and biocontrol yeast lowers levels of fungicide residues and patulin contamination in apples. *Postharvest Biology and technology*. 6:64-172
- Liu, J; Tian, S; Meng, X; Xu, Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 44(3), 300-306.
- MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). 2016. Encuesta Frutícola de Hoja Caduca zafra 2016. Serie de encuestas N° 338. (en línea). Montevideo. 12 p. Consultado 7 de enero de 2020. Disponible en

<https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/datos-y-estadisticas/estadisticas/encuesta-fruticola-hoja-caduca-zafra-2016>.

MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). 2020. Anuario estadístico agropecuario 2020. (en línea). Montevideo. 270 p. Consultado 7 de enero de 2020. Disponible en <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2020/ANUARIO2020.pdf>

Mondino, P; Fourment, M; Severino, V; Silveira, A; Leoni, C; Mujica, V; Cabrera, D; Rabellino, F; Cescato, I; Buschiazzi, M; Carrega, E. 2018. Actualización 2018 (DIGEGR, FAGRO, INIA, AFRUPI). Normas para la producción integrada del manzano. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/normas-produccion-integrada-para-manzana-2018>

Monteiro, C; Rebellato, L.; Díaz, L. 1997. Servicio de detección de resistencia a fungicidas en *Penicillium spp* en plantas de empaque de citrus de Uruguay. Período 1984 - 1996. En Congreso Latinoamericano de Fitopatología 1997, Montevideo, Uruguay. 110.

Patriarca, A. 2019. Fungi and mycotoxin problems in the apple industry. Food Science, 29:42-47.

Pianzola, M.J; Moscatelli, M; Vero, S. 2004. Characterization of *Penicillium* isolates associated with blue mold on Apple in Uruguay. Plant Disease, 88: 23-28.

Pongener, A; Sharma, S; Purbey, S. 2018. Heat Treatment of Fruits and Vegetables. Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables, Pages 179-196.

Rinaudo, M. 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in Polymer Science (Oxford), 31: 603-632

Rivas, E. 2018. Interacción sorbato-levaduras en alimentos: modelización de su efecto en medio sólido, biología molecular y detección de su transformación en 1, 3-Pentadieno por MWIR. Tesis Doctoral

Sams, C; Conway, W; Abbott, J; Lewis, R; Ben-Shalom, N. 1993. Firmness and Decay of Apples following Postharvest Pressure Infiltration of Calcium and Heat Treatment. Journal of the American Society for Horticultural Science. American Society for Horticultural Science, 118 (5): 623-627.

Schirra, M; D'hallewin, G; Ben-Yehoshua, S; & Fallik, E. 2000. Host-pathogen interactions modulated by heat treatment. Postharvest Biology and Technology, 21(1): 71-85.

Silva, M; Freitas, K; Regina, M; Terumi, A; Clemente, E; Stangarlin, J. 2015. Control of apple postharvest blue mold by natural products. Idesia (Arica), 33(2), 57-63.

Silveira, A. C. 2010. "Problemas observados durante el transporte de frutas en Uruguay" En: Escalona Contreras, V. H. (et al.) "Evaluación no destructiva de la calidad e implementación en

la industria frutícola”. Reunión Científico Técnica FRUTURA. Vol. 3, Santiago, diciembre 2010. Madrid: CYTED, pp. 142. (en línea). Consultado el 03 de febrero del 2020. Disponible: http://oa.upm.es/23292/1/Vol_III_FRUTURA_CHILE.pdf#page=6.

Singh, D. y Sharma, R. 2018. Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables and Their Management. Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables, 1-52

Thurechek, W. 2004. Apple diseases and their management. Diseases of Fruits and Vegetables, I: 1-108

Tu, K; Shao, X.F; Chen, L; Jing, W; Wang, H; Chen, Y.Y; Pan, L.Q. 2006. Effects of pre-storage hot air treatments on the post-harvest quality and blue mold control of “Red Fuji” Apple fruit. Acta Hortic. 712, 793-798

Uruguay. Ministerio de Salud Pública (MSP). Reglamento Bromatológico Nacional. 2017. Decreto 315/94. (en línea) Consultado 20 agosto de 2020. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-reglamento/315-1994>.

Usall, J; Ippolito, A; Sisquella, M; Neri, F. 2016. Physical treatments to control postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. Postharvest Biology and Technology, 122, 30-40.

Verlee, A.; Mincke, S.; Stevens, C. V. 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. Carbohydrate Polymers, 164, 268–283.

Wang, L; Wu, H; Qin, G; Meng, X. 2014. Chitosan disrupts *Penicillium expansum* and controls postharvest blue mold of jujube fruit. Food Control 41, 56–

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

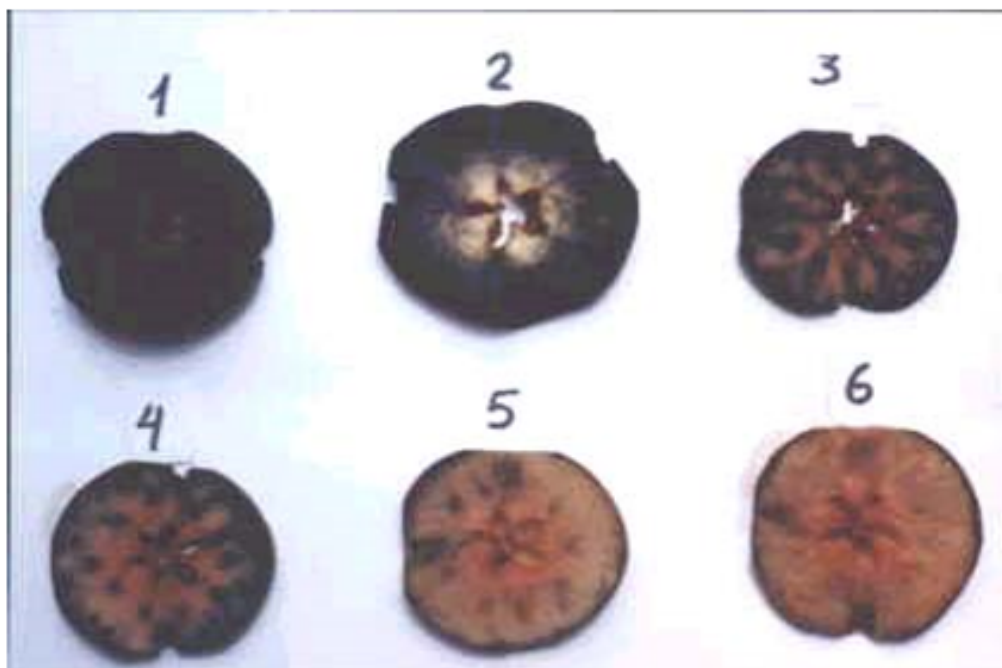
Yu, L; Qiao, N; Zhao, J; Zhang, H; Tian, F; Zhai, Q; Chen, W. 2020. Postharvest control of *Penicillium expansum* in fruits: A review. Food Bioscience, 36. 1-11

Zhang, X; Fu, M. 2018. Inhibitory effect of chlorine dioxide (ClO₂) fumigation on growth and patulin production and its mechanism in *Penicillium expansum*. LWT. 96. 335-343

Zhelifonova, V. P; Antipova, T. V; Kozlovskii, A. G. 2017. Effect of potassium sorbate, sodium benzoate, and sodium nitrite on biosynthesis of cyclopiazonic and mycophenolic acids and citrinin by fungi of the *Penicillium* genus. Applied biochemistry and microbiology, 53(6), 711-714

Zoellner, C; Aguayo, A; Wasim, A; Dávila, J. 2018. Peracetic Acid in Disinfection of Fruits and Vegetables. Postharvest Disinfection of Fruits and Vegetables. 53-66

Anexo 1



Test de yodo. Grado de madurez de la fruta, referida a la reacción almidón-yodo, en una escala de 1-6. Fotografía: Edison Bianchi UTT INIA "Las Brujas". Feippe (2003).

1 corresponde a fruta inmadura y el 6 a fruta sobremadura: **1:** totalmente oscuro (todo almidón) **2:** área del corazón clara **3:** bandas claras desde el corazón **4:** mitad de la corteza clara **5:** sólo almidón debajo de la piel **6:** toda la pulpa clara (azúcar) o libre de almidón

Lista de contenidos

- Anexo 1: Escala de madurez de las manzanas según el test de yodo
- Gráfico 1A: Número de conidias de *Penicillium expansum* viables luego de contacto con diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio
- Gráfico 1B: Número de conidias de *Penicillium expansum* viables luego de contacto con diferentes concentraciones de dióxido de cloro
- Gráfico 1C: Número de conidias de *Penicillium expansum* viables luego de contacto con diferentes concentraciones de dióxido de cloro estabilizado
- Gráfico 1D: Número de conidias de *Penicillium expansum* viables luego de contacto con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno
- Gráfico 2: Porcentaje de pudrición de los tratamientos con quitosano como efecto curativo, preventivo y el control. Almacenados 3 meses a 0-1°C en cámara refrigerada
- Gráfico 3: Porcentaje de pudrición de heridas para cada uno de los tratamientos térmicos ensayados por “curado” y el control correspondiente luego de almacenados 3 meses a 0-1°C en cámara refrigerada.
- Imagen 1: Podredumbre de *Penicillium expansum* en manzanas
- Imagen 2: Podredumbre causada por *Botrytis cinerea* en manzanas
- Imagen 3: Podredumbre causada por *Alternaria sp.* en manzanas
- Imagen 4A: Concentración inhibitoria mínima de quitosano ante *P. expansum* en AJM
- Imagen 4B: Concentración inhibitoria mínima de quitosano ante *P. expansum* en PDA
- Imagen 5: Resultados de la acción curativa de los desinfectantes ensayados en fruta ante *Penicillium expansum*
- Imagen 6: Resultados del curado con aire caliente a 44°C por 20 hs inoculado con *P. expansum*
- Tabla 1: Presencia o ausencia de crecimiento de *P. expansum*, *B. cinerea* y *Alternaria sp* en jugo de manzana con diferentes concentraciones de Sorbato de potasio
- Tabla 2: Presencia o ausencia de crecimiento de *P. expansum*, *B. cinerea* y *Alternaria sp* en jugo de manzana con diferentes concentraciones de benzoato de sodio
- Tabla 3: Resultados de los tratamientos térmicos como curativos en fruta inoculada con *P. expansum*
- Tabla 4: Resultados a tiempo 0 de los análisis de calidad de las manzanas sometidas a los diferentes tratamientos térmicos
- Tabla 5: Resultados luego de 3 meses de almacenamiento de los análisis de calidad de las manzanas sometidas a los diferentes tratamientos térmicos