

## **COLLETOTRICHUMIZACIÓN DE RUBUS GLAUCUS BENTH**

### **CAMPO TÉCNICO**

[001] La presente divulgación se desarrolla en el campo de la biotecnología, mediante el uso de técnicas de adecuación de sustratos para la generación de compuestos bioactivos de alto valor agregado a partir de materias primas naturales nativas colombianas. Específicamente se empleó la inoculación bajo condiciones controladas del hongo filamentoso *Colletotrichum acutatum* en frutos de *Rubus glaucus* Benth.

### **DESCRIPCION DEL ESTADO DE LA TECNICA**

[002] Durante los últimos años, se ha prestado gran atención al uso y consumo de metabolitos, disponibles en frutas y verduras y sus propiedades, terapéuticas, nutraceuticas y fitotóxicas. Los arbustos frutales del género *Rubus* son una rica fuente de tales compuestos. Estos se sintetizan en pequeñas cantidades en función de la etapa fenológica de la planta, los servicios ecosistémicos y el estrés biótico o abiótico que experimenta. En general, cuando los microorganismos patógenos están presentes, se activa el mecanismo de defensa de las plantas y el proceso fisiológico y bioquímico (relacionado con la patogénesis) puede conducir a la síntesis de proteínas.

[003] *Rubus glaucus* Benth se conoce como mora de los andes o mora de castilla, es una especie única que combina características de los black raspberry (Subgénero *Idaeobatus*) y de los blackberry (subgénero *Rubus*) es un anfidiplóide fértil (alelotetraploide, que fusiona los dos genomas) (Jennigs, 1988). *Rubus glaucus* es una de las nueve especies comestibles del género, nativa de los andes colombianos, es la única especie del género *Rubus* cultivada comercialmente; esta especie tiene mucha demanda en el mercado nacional e internacional y existe mucho interés en su cultivo para satisfacer la demanda de la agroindustria e incrementar la oferta comercial (Ramírez, 1989). Se cultiva por sus frutos, que se consumen crudos, en jaleas y refrescos. Es como la mayoría de los *Rubus* una planta perenne que emite ramas o cañas de un tallo corto, formando una macolla hasta de cinco metros de diámetro. Las ramas y hojas están provistas de espinas curvas, los tallos jóvenes y el reverso de las hojas están cubiertos de una cera blancuzca que le da el color característico a la especie (León, 1987).

[004] Los frutos de *Rubus glaucus* Benth además de ser ricos en nutrientes, vitaminas y minerales, contienen compuestos fenólicos a los cuales se les reconoce como agentes antioxidantes. Dentro de

estos compuestos fenólicos, las antocianinas son un grupo importante y se encuentran en altas concentraciones particularmente en el género *Rubus*. Entre los compuestos fenólicos se destacan los ácidos fenólicos, por ejemplo, el ácido gálico y sus derivados, el ácido cafeico, el ácido cumárico, los derivados del ácido ferúlico, la epicatequina y los derivados del ácido elágeno. También se han descrito flavonoles y antocianinas en frambuesa andina; los primeros incluyen derivados de quercetina, glucósidos y glucuronidos de quercetina [7-8], y los segundos incluyen cianidina-3-glucósido, cianidina-3-rutinosido, cianidina-3-xilosidinosido, pelargonidina-3 glucósido y pelargonidina-3-rutinosido. Este tipo de compuestos puede variar por acción de los microorganismos ya que pueden ser degradados o se pueden generar metabolitos secundarios después de que el tejido de la planta es expuesto a la infección microbiana.

[005] En Colombia, *Rubus glaucus* Benth, es la más popular especie de *Rubus* a cultivar. Colombia produce aproximadamente 116.000 toneladas de un total cultivado área de 13.200 ha (Carvalho & Betancour, 2015). La comercialización de *Rubus glaucus* Benth es oprimida por diversos factores como el exceso de enfermedades fitopatológicas y la calidad deficiente de la fruta por exceso de lluvias. Esta situación se ve agravada por la carencia de nuevos mercados nacionales e internacionales, la falta de investigación, transferencia, capacitación y fomento (Escobar & Iragorri, 2015). Uno de los factores que afectan los cultivos de *Rubus glaucus* Benth consiste en la enfermedad fitopatógena antracnosis causada por varios hongos del género *Colletotrichum*.

[006] *Colletotrichum acutatum* es un patógeno que afecta a numerosos hospederos en climas tropicales, subtropicales y templados (Bernstein et al., 1995). Es el agente causal de la antracnosis en varios cultivos y de la caída prematura del fruto (PFD) en cítricos (Agostini et al., 1992). Es bien sabido que *Colletotrichum acutatum* daña varios órganos vegetales como tallos, hojas, frutos y flores. Aunque puede atacar frutos, principalmente durante las últimas etapas de la madurez, ocurre principalmente en la fase de poscosecha como antracnosis (Rueda et al., 2013). En este momento el hongo primero induce infecciones latentes, al infectar los frutos inmaduros, entra en un estado latente hasta que el fruto alcanza la plena madurez y recomienza su desarrollo. La planta presenta lesiones marrones que se oscurecen con el paso del tiempo (Forcelini et al., 2018). Estas enfermedades causan enormes pérdidas económicas en términos de mala calidad de los cultivos, y minimizan drásticamente la competitividad en el cumplimiento de las normas de exportación (Betancur, 2014).

[007] *Colletotrichum acutatum* ha sido asociado como patógeno a almendras, aguacates, mangos, melocotones, cítricos spp, uvas, fresas (Feménia, 2007) café, manzanas, arándanos, cerezas, guayabas,

aceitunas, peras, melocotón, pimentón, tomate, nueces, calabazas, tomate de árbol, nísperos, feijoa, higos, albaricoques, entre muchos otros (Miles, 2011) (Farr & Rossman, 2017).

[008] Por otra parte, los hongos del género *Colletotrichum* son reconocidos productores de sustancias fitotóxicas de bajo peso molecular y de enzimas que juegan papeles clave en su interacción patogénica con varios cultivos. Es así, que diversos estudios han evaluado su potencial de bioprospección al interactuar con especies vegetales como *Tabernaemontana heyneana* donde se ha evaluado su capacidad como fuente de agentes quimioterapéuticos (Manasa & Nalini, 2014), también, se han estudiado e identificado las moléculas afectantes entre las que se encuentran: quinasas, enzimas hidrolíticas, y enzimas catalíticas que incluyen el grupo de las serina proteasa como las endopeptidasas y exopeptidasas (Armijos et al., 2013) y entre muchos otros, se ha estudiado ampliamente su uso como materia prima para la producción de biodiesel desde cepas caracterizadas (Dey et al., 2011).

[009] Adicionalmente, los cultivos microbianos para uso industrial –también llamados fermentaciones– se realizan desde finales del siglo XIX e inicios del XX, en el desarrollo de diversos procesos para la generación de productos utilizados en la industria química, como al ácido láctico y la acetona. Hoy en día, algunos microorganismos son modificados genéticamente para convertirse en biofábricas y representan una alternativa para obtener de forma sustentable una gran diversidad de productos químicos que necesita nuestra sociedad (Gosset, 2017).

[010] En el mismo sentido, la fermentación en estado sólido (FES) ha ganado credibilidad en las industrias biotecnológicas debido a sus aplicaciones potenciales en la producción de metabolitos secundarios biológicamente activos, además de piensos, combustibles, alimentos, químicos industriales y productos farmacéuticos. Sumado a ello, las mejoras en aspectos de la ingeniería bioquímica, en particular en el modelado matemático y el diseño de biorreactores (fermentadores), ha hecho posible ampliar los procesos de FES haciendo que la tecnología sea económicamente viable (Singhania, 2009). La fermentación FES hoy en día se ha consolidado como una tecnología muy prometedora, debido a, entre otras cosas, su gran facilidad de escalamiento de los procesos (Borrs-Sandoval et al., 2016). Documentos de patente como EP2390345 y US2016235080 divulgan un procedimiento para la preparación de moléculas de interés por fermentación de un sustrato en fase sólida, donde dichas moléculas presentan principalmente actividad antioxidante.

[011] Un ejemplo de fermentaciones y biofábricas, es la denominada podredumbre noble de la uva, que consiste en uvas infectadas con *Botrytis cinerea* en condiciones controladas, en la cual se generan

conversiones enzimáticas complejas y deshidratación simultánea de la uva. De esta biofábrica surgen productos diferenciados denominados vinos botritizados que son vinos dulces de características particulares y que constituyen una categoría distintiva de los vinos de mesa, lo cual se refleja en su precio (Magyar, 2011). Así mismo, otro tipo de sustratos y hongos han sido utilizados para la generación de moléculas de interés por fermentación en fase sólida, dentro de los que se destacan la huperzina A (Jeltsch et al., 2011).

[012] De acuerdo con lo anterior, se evidencia que usando estrategias biotecnológicas como fermentación sólida se obtienen diversos tipos de biofábricas a partir de la interacción de hongos filamentosos con diferentes cultivos vegetales. Para el caso de frutos del género *Rubus*, se ha establecido la generación de compuestos antioxidantes por la presencia de fitopatógenos tal como se observa en **Changes in phenolic compounds and antioxidant capacity of Andean raspberries in response to *Peronospora sparsa*** en el cual se pone en evidencia el aumento en los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante en los frutos afectados por este hongo.

[013] El documento **Effect of *Botrytis cinerea* inoculation on the antioxidant capacity and total phenolic content in *Rubus glaucus* benth** divulga el incremento de compuestos bioactivos fenólicos con actividad antioxidante a partir de la infección bajo condiciones controladas de humedad, temperatura, etc, de frutos de la especie *Rubus glaucus* benth con el hongo filamentoso *Botrytis cinerea*. En este documento se divulgan las características, concentración y condiciones para inoculación del hongo filamentoso y finalmente la evaluación del incremento de compuestos fenólicos y de la actividad antioxidante. Sin embargo, a diferencia del *C. acutatum*, en ambos casos estos microorganismos colonizan fácilmente los frutos, incluso se puede ver su crecimiento en los frutos desde tempranas etapas en los cultivos.

[014] Para el caso del *C. acutatum*, este ha sido estudiado en diversos tipos de cultivos como frutos de tomate (Patiño, 2010), frutos de olivo (Gouvinhas et al., 2019) y frutos de Lulo (Arrieta et al., 2010). Aunque *C. acutatum* se reconoce dentro de la microfauna de *Rubus glaucus* Benth, no hay estudios de su crecimiento como único colonizador en estados de fermentación controlada ya que la Colletotrichumización requiere de condiciones especiales ya que los frutos de *Rubus glaucus* Benth debido a su morfología (múltiples drupas agrupadas), fragilidad, alto contenido de agua, variedad de microorganismos y otros aspectos asociados a las características con las que cuentan los frutos en el momento de su colecta, hacen que el *Colletotrichum acutatum* no se exprese con facilidad.

[015] Teniendo en cuenta lo anterior, uno de los factores que limita el éxito de la colonización de microorganismos y su posterior proceso de fermentación controlada (ya sea sólida o líquida) para la producción de moléculas o productos bioactivos de interés, es la presencia de otro tipo de microorganismos o contaminantes. Por tal razón se hace necesario establecer metodologías de limpieza y sanitización que permitan la remoción total de los contaminantes de tal forma que se tengan las condiciones ideales para la inoculación controlada. En este sentido documentos como US9095152, US2006141111A1, US2015283276A1 y artículos como Strategies for microbial decontamination of fresh blueberries and derived products divulgan métodos que incluyen la desinfección, esterilización y envase de productos agrícolas (frutas, verduras) de manera que estén listos para el uso por parte del consumidor. Estos métodos buscan eliminar la suciedad, la tierra y algunos patógenos, lo cual, en lugar de buscar una inoculación controlada, se enfoca en prolongar la vida útil de las frutas (Munger, 2015), (Bowden & Herdema, 2021), (Bliss, 2006).

[016] Con base en lo anterior, se hace necesario desarrollar procesos biotecnológicos a partir de *Rubus glaucus* Benth fundamentados en la inoculación con algún microorganismo que permita su aprovechamiento y la generación de compuestos de interés. Es así como la presente invención, desarrolló un proceso de la limpieza, desinfección y sanitización profunda de frutos de *Rubus glaucus* Benth y su posterior inoculación con *C. acutatum* en condiciones controladas, que generan una biofábrica controlada que ofrecen aplicaciones alternativas a este material vegetal, mediante la generación de productos con valor agregado que dinamicen la Bioeconomía, mejorando la vida de los agricultores de esta fruta.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

[017] La presente divulgación busca proporcionar un proceso de generación de una biofábrica de compuestos bioactivos de alto valor agregado. Estos compuestos han demostrado tener variadas actividades biológicas dentro de las que se encuentran efectos citotóxicos y/o antioxidantes, a partir de la limpieza, desinfección y sanitización profunda de sustratos de materias primas naturales nativas colombianas junto a la inoculación controlada con el hongo filamentoso *C. acutatum*.

[018] Particularmente, el presente desarrollo se refiere a un proceso de Colletotrichumización de frutos de la especie *Rubus* que comprende: a) limpieza, desinfección y sanitización profunda de sustratos de materias primas naturales colombianas específicamente frutos del *Rubus glaucus* Benth que por sus características morfológicas requieren una limpieza profunda; b) activación de la cepa del

hongo *C. acutatum* mediante fermentación sumergida; c) obtención de propágulos fúngicos del hongo *C. acutatum* y generación de una suspensión fúngica; d) inoculación controlada de frutos de *Rubus glaucus* Benth con la suspensión de esporas de cepa *C. acutatum* e) producción de compuestos bioactivos de alto valor agregado mediante la fermentación sólida en frutos de *Rubus glaucus* Benth en condiciones controladas hasta que los frutos se encuentren infectados al 100% de severidad; f) evaluación del incremento de los compuestos activos y análisis de actividades biológicas.

[019] Una modalidad de la invención se refiere a un proceso para la limpieza, desinfección y sanitización de sustratos de materias primas naturales colombianas, específicamente frutos de *Rubus glaucus* Benth o mora de castilla.

[020] Una modalidad de la invención se refiere a un proceso para la limpieza, desinfección y sanitización profunda de frutos de *Rubus glaucus* Benth o mora de castilla, en donde la primera etapa de limpieza incluye la selección de frutos en estado fisiológico de madurez 4 y 5 según la norma NTC 4106 Icontec, 1997.

[021] Una modalidad de la invención se refiere a un proceso para la limpieza, desinfección y sanitización profunda de frutos de *Rubus glaucus* Benth o mora de castilla, en donde se realiza una limpieza con una solución de detergente o desinfectante anfótero. Una primera desinfección de los frutos por inmersión en solución desinfectante seleccionada entre agentes oxidantes, específicamente solución de desinfectante anfótero o hipoclorito de sodio en concentraciones que varían entre el 0,1 y 5% y un primer tratamiento profundo con ondas de ultrasonido a una frecuencia entre 20 y 50 hertz por un tiempo entre 5 y 20 minutos; una segunda desinfección por inmersión en solución alcohólica en concentraciones entre 70 y 98%, un segundo tratamiento con ondas de ultrasonido a una frecuencia entre 20 y 50 hertz por un tiempo entre 5 y 10 minutos y, después de cada inmersión se realizan enjuagues con agua destilada y tratamiento con ondas de ultrasonido a una frecuencia entre 20 y 50 hertz, una tercera desinfección de los frutos por la exposición a luz ultravioleta a una longitud de onda entre 400 y 500 nm por un tiempo entre 5 y 15 minutos.

[022] En una modalidad adicional, la presente divulgación proporciona un proceso de activación de la cepa del hongo *C. acutatum* mediante fermentación sumergida y la obtención de una suspensión fúngica de entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^8$  esporas/ml de acuerdo con la curva estandarizada de UFC para *C. acutatum*.

[023] Otra modalidad de la invención se refiere a un proceso para la inoculación de frutos de *Rubus glaucus* Benth o mora de castilla, con la suspensión de concentración conocida de esporas de *C. acutatum* en condiciones controladas donde el hongo genera una infección hasta 100 % de severidad en frutos de *Rubus glaucus* Benth.

[024] En una modalidad adicional, la invención se refiere al incremento de compuestos activos y la evaluación de actividades biológicas, que puede incluir la actividad citotóxica y/o antioxidante, a partir de la Colletotrichumización de frutos de la especie *Rubus glaucus* Benth, donde la evaluación se realiza sobre el producto de la fermentación sólida de los frutos infectados con un grado de severidad entre el 50% al 100%, preferiblemente, entre el 80% al 100%, más preferiblemente entre el 90% a 100%.

[025] Finalmente, la presente divulgación reclama un proceso de Colletotrichumización de frutos de la especie *Rubus glaucus* Benth a partir de la limpieza, desinfección y sanitización profunda de sustratos de materias primas naturales colombianas junto con la inoculación controlada del hongo filamentoso *C. acutatum*.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[026] La **Figura 1** enseña la validación de la eficiencia de tratamientos de lavado de *Rubus glaucus* Benth. Columna 1 muestra la validación 1 de A) tratamiento 1, D) tratamiento 2, G) tratamiento 3, J) tratamiento 4. Columna 2 muestra la validación 2 de B) tratamiento 1, E) tratamiento 2, H) tratamiento 3, K) tratamiento 4, M) blanco. Columna 3 muestra la validación 3 de C) tratamiento 1, F) tratamiento 2, I) tratamiento 3, L) tratamiento 4, N) blanco.

[027] La **Figura 2** muestra el cuerpo fructífero de *Colletotrichum acutatum*. A–B. conidiomas (acérvulo). C–D. Conidióforos. Escala bars: A = 200  $\mu\text{m}$ , B = 100  $\mu\text{m}$ , C y D= 10  $\mu\text{m}$ . (Damm et al., 2012). Los acérvulos se desarrollan completamente y rompen la pared celular epidérmica y la cutícula (Cu), conidióforos (Co), conidios (C), hifas (H), (micrografía electrónica) (Wharton & Diéguez, 2004).

[028] La **Figura 3** enseña la amplificación de fragmentos específicos del ADNr usando primers ITS4 y CaInt2 específico para *C. acutatum*.

[029] La **Figura 4** presenta la escala diagramática logarítmica de severidad y clave descriptiva para evaluar la antracnosis causada por *C. acutatum* en *Rubus glaucus* Benth.

[030] La **Figura 5** enseña el contenido de compuestos fenólicos de extractos de *Rubus glaucus* Benth. Frutos sin inocular (FSI), Blanco (BL) y Frutos inoculados (FI).

[031] La **Figura 6** presenta los resultados de capacidad antioxidante de extractos de *Rubus glaucus* Benth. Frutos sin inocular (FSI), Blanco (BL) y Frutos inoculados (FI).

[032] La **Figura 7** enseña los resultados de actividad citotóxica de extractos de *Rubus glaucus* Benth. FSI (mora si inocular tiempo inicio). BL (mora si inocular tiempo final). FI (mora inoculada).

### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[033] **Proceso de selección, limpieza y desinfección de los frutos del género *Rubus***

[034] Debido a las dificultades para inocular los frutos de *Rubus glaucus* Benth se realizaron cuatro (4) tratamientos (ver Tabla 1). Todos se realizaron por triplicado y se usaron frutos sin ningún tratamiento como testigo positivo. En esta etapa se seleccionan los frutos de tamaños similares y sin ningún daño aparente, ya sea por acción mecánica o por microorganismos patógenos. Los frutos deben estar en estado fisiológico de madurez 4 y 5 según lo establecido en la NTC 4106 (ICONTEC, 1997), Durante la permanencia en el laboratorio, los frutos se almacenan en refrigerador a 4°C. El tiempo máximo de refrigeración es de 24 horas.

| Tratamiento 1                                                               | Tratamiento 2                                                                                            | Tratamiento 3                                                                                             | Tratamiento 4                                                                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Inmersiones en hipoclorito de sodio al 5% por 6 min.                        | Inmersiones en hipoclorito de sodio al 3% y agitación en vortex por 6 min                                | Inmersiones en hipoclorito de sodio al 5% y agitación en vortex por 6 min                                 | Inmersiones en hipoclorito de sodio al 5% y exposición a ultrasonido por 5 min                           |
| Inmersiones en etanol al 70% durante 6 min.                                 | Inmersiones en etanol al 70%.                                                                            | Inmersiones en etanol al 70%.                                                                             | Inmersiones en etanol al 70%,                                                                            |
| Los frutos se lavaron después de cada inmersión con agua destilada estéril. | Después de cada inmersión, los frutos se lavaron con agua destilada estéril agitando en vortex por 6 min | Después de cada inmersión, los frutos se lavaron con agua destilada estéril agitando en vortex por 6 min. | Enjuagándose después de cada inmersión con agua destilada estéril en exposición a ultrasonido por 5 min. |

**Tabla 1. Tratamientos para el acondicionamiento aséptico de los frutos.**

[035] Estos frutos son almacenados en frascos de vidrio, previamente esterilizados, los cuales solo se llenan hasta un tercio de su capacidad. Se realiza un lavado para desprender partículas de material vegetal y tierra. Este se lleva a cabo en los mismos frascos en los cuales se encuentran almacenados los frutos y consiste en la inmersión de los frutos en un microbicida (dilución de solución detergente anfotericida (dodecil-diaminoetil glicina) entre 0,1 y 1.5 % en agua destilada estéril) seguida de suaves movimientos del frasco. Los frutos se lavan con agua destilada estéril.

[036] A continuación, se describe solo el tratamiento 4, que corresponde a los mejores resultados. A partir de este momento las etapas restantes se llevan a cabo en cabina de extracción y cualquier elemento a utilizar debe ser estéril. Los frutos se distribuyen individualmente en tubos de vidrio con diámetro de 38 mm, teniendo precaución de no causarles lesiones con las herramientas usadas. Se vierte solución desinfectante oxidante (hipoclorito de sodio) en concentración entre el 1 y 5% hasta cubrir los frutos y se someten a exposición de ultrasonido frecuencia entre 20 y 50 hertz sin calentamiento por un tiempo entre 5 y 20 min. Posteriormente, los frutos se lavan con agua destilada estéril y se someten a exposición de ultrasonido sin calentamiento por un tiempo entre 5 y 20 min.

[037] Posteriormente se realiza una inmersión en etanol al 70% y se someten a exposición de ultrasonido sin calentamiento por 5 min. Nuevamente se lavan con agua destilada estéril y se someten a exposición de ultrasonido sin calentamiento por un tiempo entre 5 y 15 min. Finalmente, los frutos se disponen en luz UV una superficie absorbente estéril de tal forma que no tengan contacto entre ellos, se exponen a por un tiempo entre 5 y 15 min, y se procede a dejarlos secar en cabina de flujo laminar.

#### [038] **Evaluación de eficiencia de lavado y desinfección de los frutos**

[039] Esta etapa permite corroborar la eficiencia del tratamiento de lavado y desinfección. Para ello se evalúa la reducción de carga microbiana usando tres métodos de validación. (Tabla 2.)

[040] Para la primera validación, se toman muestras del agua destilada estéril usado en el último lavado de la etapa 4, y se procede a realizar siembras en placas con agar PDA (Potato Dextrose Agar) usando la técnica de siembra en superficie por extensión. En la segunda validación se evalúa directamente la limpieza de la superficie del fruto, mediante la estimulación del desprendimiento de posibles microorganismos o esporas remanentes. Para esto, se sumergen los frutos lavados en tubos con medio BHI 84 (Brain Heart Infusion), con la técnica de siembra por inmersión. Posteriormente se someten a agitador vortex mixer, por 6 a 10 min a 2000 rpm y finalmente se retiran los frutos. En la

tercera validación, se evalúan posibles endófitos. Para ello se realizan disecciones de frutos y se disponen superficialmente en placas con agar PDA. Todas las validaciones deben contar con placas de control de medio. Además, las validaciones se deben realizar también en frutos testigo sin lavado. Todas las siembras se incuban entre 25°C y 27°C. El crecimiento de microorganismos se verifica diariamente hasta pasados 10 días. En la etapa tres, se evalúan los resultados de la validación de la limpieza y desinfección.

[041]

| Validación 1                                                                                                                                                                  | Validación 2                                                                                                                                                                                                                                            | Validación 3                                                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Siembras en agar PDA (en inglés Potato Dextrose Agar) del último lavado con agua destilada estéril. Para verificar que superficialmente si se eliminaron los microorganismos. | Se estimuló el desprendimiento de microorganismos o esporas remanentes sumergiendo los frutos lavados enteros en tubos con medio BHI (Brain Heart Infusion).<br><br>Los tubos se agitaron en vortex por 6 min y posteriormente se retiraron los frutos. | Se sembraron disecciones de frutos lavados en agar PDA. Para evaluar microorganismos endófitos |

*Tabla 2. Verificación de la eficiencia de los lavados.*

[042] Luego de realizar la validación de los métodos de limpieza, tal como se observa en la figura 1 se tiene que: 1) En cuanto al primer método de validación, el cual corresponde al método convencional, no presenta crecimiento de microorganismos en ninguno de los tratamientos. Sin embargo, en algunos casos estos resultados corresponden a falsos negativos, ya que en la segunda corroboración en medio HBI, la turbidez de los tubos en los tratamientos 1 y 2 es clara evidencia de que aún quedan microorganismos en la parte externa del fruto. Por lo tanto, las siembras en PDA del agua usada en el último enjuague (método tradicional) no son recomendables para corroborar la eficiencia de los lavados. 2) En el segundo método de validación: en los tubos con medio HBI, los tratamientos 3 y 4 no presentaron turbidez, indicando que no se presenta crecimiento de microorganismos. Los tratamientos 1, 2 y el testigo muestran crecimiento. 3) El tercer método de validación, con el cual se esperaba encontrar la biota interna del fruto, evidenció el crecimiento de microorganismos en todos los tratamientos, pero hay una disminución importante en el tratamiento 4. En general las muestras testigo presentaron crecimiento de diversos microorganismos en todas las repeticiones de las tres validaciones. El tratamiento 4 fue el que presentó mejores resultados en las

diferentes repeticiones. Además, se considera que este tratamiento es el que presenta mayor facilidad para escalar el proceso a modos industriales.

[043] **Identificación de *Colletotrichum acutatum* (*C. acutatum*)**

[044] **Material fúngico de *C. acutatum***

[045] El material fúngico a utilizar para la posterior inoculación de *Rubus glaucus* Benth se obtuvo a partir de botones florales de *Rubus glaucus* Benth que presentaban los síntomas característicos de la antracnosis. Posteriormente, se realizó un tratamiento de desinfección y siembra en medio PDA (Agar patata-dextrosa) hasta la identificación de la germinación de los conidios y proceder con la realización de subcultivos sucesivos aproximadamente cada 3 semanas en medio PDA acidificado. La cepa se conservó usando la técnica de anaerobiosis, y se realizó la liofilización del fitopatógeno. A partir de este aislamiento y conservación se procedió a realizar la caracterización macroscópica y microscópica con el fin de identificar que fuera el *C. acutatum*.

[046] **Caracterización macroscópica y microscópica**

[047] Se analizaron aspectos macroscópicos del hongo, tales como: tipo y pigmentación del micelio en ambas caras, y la tasa de crecimiento. Las observaciones microscópicas se realizaron teniendo en cuenta aspectos de las estructuras conidiales como forma y tamaño. Para ello se preparó una suspensión de conidios de  $1 \times 10^6$  conidios/ml usando un hematocitómetro. Se depositó 0.1 ml sobre un portaobjeto y se realizó la tinción con azul de metileno, cubriéndose con un cubreobjeto. Se midió la longitud y ancho de 100 conidios seleccionados al azar. El tamaño y forma de cada conidio se determinó mediante el software ImagenJ.Ink, a partir de imágenes capturadas a través de un microscopio de luz con un micrómetro adaptado al ocular y en el objetivo de 100 aumentos.

[048] A partir de la cepa obtenida se estudió el desarrollo micelial del hongo en medio PDA. Tal como se observa en la figura 2, todos los micelios presentaron formas circulares no onduladas y presentaron en el centro del anverso una coloración salmón propia de las masas conidiales, y micelio moderado de tonalidades grisáceas y bordes blancos. De igual manera en el reverso presentaron color salmón en la parte central. Con el paso del tiempo el micelio se tornó gris y empezaron a aparecer algunos esclerocios. Los conidios presentaron un aspecto fusiforme, con dimensiones promedio de  $12.1 \mu\text{m}$  de largo y  $3.5 \mu\text{m}$  de ancho. De acuerdo con lo anterior, las características macro y micro encontradas coinciden con las descritas por otros autores para *C. acutatum* (Andrade et al., 2007) y (Oliveira et al., 2005).

**[049] Identificación molecular de la especie.**

[050] La obtención del material genético del hongo se realizó de la siguiente forma: el aislado obtenido se sometió a siembras en medio líquido (10g de glucosa y 2.5g de extracto de levadura por litro de agua destilada estéril). Se incubaron durante 4 días a temperatura ambiente con periodos alternos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Pasado este tiempo se colectó el material y se filtró con gasa estéril. La extracción del ADN se realizó usando el kit de Qiagen “DNeasy plant mini kit”.

[051] Para la detección de *C. acutatum* se realizó la amplificación de la región conservada del gen 25/28S del ADNr ITS mediante la técnica PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), utilizando el iniciador específico CaInt2 (5'-GGGGAAGCCTCTCGCGG-3'), junto con el iniciador universal ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La PCR se realizó de acuerdo a (Álvarez et al., 1998) con modificaciones en la visualización de ADN, ya que los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%, adicionándose 15 µL de SYBR Safe-DNA, y utilizándose como positivos 1.7 µL del marcador Hyperladder V de Bioline. Esta tarea se llevó a cabo en un equipo Gel Doc XR+, el cual permite visualizar las bandas de ADN por fluorescencia mediante el software ImagenLab™.

[052] Como se aprecia en la figura 3, la amplificación de la región ITS del ADNr usando el primer ITS 4 y el primer específico CaInt2, mostró un fragmento con un tamaño de 490 pb, lo cual concuerda con lo reportado por (Álvarez et al., 1998) y (Barquero et al., 2013) para identificación de *C. acutatum*. Por lo tanto, la cepa aislada de *Rubus glaucus* Benth, puede ser identificada como *C. acutatum*.

**[053] Preparación y ajuste del inóculo**

[054] La cepa se cultivó en placas Petri con agar PDA acidificado pH 4, y se incubó a 26°C por 7 días. Posteriormente se cubrió el micelio con 10 ml de agua destilada estéril al con tensoactivo polisorbato 20 al 1% de Tween 20, y se llevó a cabo un barrido de la superficie del micelio con la ayuda de un asa de drigalsky estéril. Se realizó la filtración de la suspensión con filtros Fisherbrand PX. El filtrado se recogió en unos tubos estériles. Se evaluó la presencia de fragmentos de hifas y/o cadena de conidios. En casos donde la presencia de hifas fue mayor a 5% se filtró nuevamente, y donde se encontró aglomeraciones el inóculo se agitó en vortex a 2000 rpm por 1 min.

[055] **Barrido espectral del inóculo y medición de densidades ópticas**

Para la estandarización de la curva de UFC para *C. acutatum*. Se inició por el barrido espectral de la suspensión conidial acuosa a diferentes concentraciones, las cuales presentaron máximos principalmente en las longitudes de onda de 585nm, y 590nm. Esta última coincide con la usada por (Miles et al., 2012) para *C. acutatum*. Las mediciones se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-Visible marca Thermo Scientific™ Evolution 60S.

[056] **Prueba de Patogenicidad**

[057] La patogenicidad del microorganismo se evaluó en flores, tallos y frutos de *Rubus glaucus* Benth sin espinas, asperjados con una suspensión conidial de  $1 \times 10^7$  conidios/ml, de la cepa Como control se usaron flores, tallos y frutos asperjados con agua destilada estéril. Se incubaron en cámara húmeda a temperatura ambiente 26 – 30°C, con humedades relativas de 90 - 100%.

[058] Después de cuatro días, en las flores se empezaron a visualizar los primeros signos del patógeno con la producción de acérvulos color naranja-salmón sobre la superficie del tejido, iniciando en los pedúnculos de la flor. Se realizó la observación en el estereoscopio antes de proseguir con la siembra en PDA, lo cual efectivamente confirmó la semejanza de las colonias de *C. acutatum* de la siembra inicial con las nuevas. De igual manera ocurrió con los tallos, excepto por la variación en el tiempo de aparición de acérvulos, proceso que tomó más tiempo. La prueba de patogenicidad comprobó que la cepa puede causar lesiones necróticas en tallos, flores y frutos de *Rubus glaucus* Benth sin espinas.

[059] **Activación de *C. acutatum* y posterior infección de frutos *Rubus glaucus* Benth**

[060] El proceso de activación de *C. acutatum* se realiza mediante fermentación sumergida, usando un concentrado estéril de frutos de *Rubus glaucus* Benth en estado fisiológico de madurez 4 y 5 según lo establecido en la NTC 4106 (ICONTEC, 1997). Para la inoculación del medio líquido se toma una muestra del hongo conservado y se adiciona directamente a los frascos Erlenmeyers con 50 mL de concentrado de fruta estéril. Se incuban a temperatura ambiente con agitación continua a 100 rpm, hasta obtener la suficiente biomasa del hongo, lo cual depende del estado de la cepa. La biomasa se separó con filtros de tela estéril.

[061] Posteriormente se realizan siembras del hongo en cajas Petri con agar PDA acidificado a pH 4 usando el método de punción. Se incuban a 26°C por siete días o hasta obtener esporulaciones del hongo que se visualizan en la tonalidad naranja salmón tal como se observa en la figura 2. Una vez

obtenidos los propágulos fúngicos, se desprenden cubriendo los crecimientos con 10 ml de agua destilada estéril al 1% de polisorbato 20, y haciendo un barrido de la superficie con la ayuda de un asa de Digralsky. La suspensión obtenida se pasa por filtros Fisherbrand PX y se ajusta entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  esporas/ml. Esta concentración se estimó de acuerdo con la curva estandarizada de UFC para *C. acutatum*.

**[062] Inoculación de frutos de *Rubus glaucus* Benth**

[063] Los frutos previamente desinfectados y secos se sometieron a inoculación con una suspensión de concentración entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  esporas/ml, usando un pulverizador de reactivos químicos de vidrio y con bulbo de goma, el cual es necesario para la generación de microgotas que puedan penetrar o introducirse por los canales que se forman entre las drupas agrupadas que componen el fruto, logrando mayor área de contacto entre el inóculo de *C. acutatum* y el fruto.

[064] La inoculación se realiza en una campana de flujo laminar y con todas las garantías de asepsia. Procurando una mínima manipulación, los frutos se acomodan en superficies inertes evitando el contacto entre ellos. Los frutos se impregnan por ambas caras con la suspensión de esporas.

[065] Es importante establecer que la presencia de diversas especies luego del lavado exhaustivo es un indicador de que el patosistema de esta especie vegetal es muy amplio, situación que podría ocasionar la inhibición de *C. acutatum* por antagonismo. Por otra parte, la morfología del fruto dada por multiplex drupas agrupadas, hace de la labor de desinfección una tarea compleja. Además de su alto contenido de agua, y otros aspectos intrínsecos a *Rubus glaucus* Benth como las características propias con las que cuentan los frutos, la morfología puede influir en el crecimiento micelar *in vitro* de *C. acutatum*. Estudios realizados por (Miles et al., 2012) en los que se evalúa la relación del contenido de azúcar, pH y acidez titulable (TA) respecto a la esporulación en frutos y la gravedad de la infección, demuestran que la resistencia de la fruta a la antracnosis se correlaciona negativamente de forma lineal con el porcentaje de azúcar soluble en el fruto, es decir, cuanto mayor es el contenido de azúcar, más resistente es el fruto. Además, el peso de las bayas, la acidez titulable y la firmeza de la fruta frente a la severidad de la infección tienen correlaciones negativas significativamente marginales. Así mismo, en medios artificiales con pH por debajo o por encima de 4 disminuye el crecimiento micelar. En el fruto el pH específico de la epidermis puede ser crítico para el establecimiento de *C. acutatum* debido a que es la primera barrera física encontrada por el patógeno (Diéguez et al., 2008). Es por ello que la modificación del pH por *Colletotrichum spp.* desempeña un papel importante en la colonización de otros huéspedes vegetales (Prusky et al., 2001). Razones como

estas obligan a que los frutos de *Rubus glaucus* Benth seleccionados para inoculación con *C. acutatum* cumplan con unas características específicas, particularmente relacionadas con el pH y el azúcar, encontradas principalmente en frutos de mediana calidad.

[066] Los frutos ya inoculados se incuban en cámaras húmedas estériles entre 90 a 100% de humedad relativa, las cuales consisten en cajas de plástico translúcido de aproximadamente 23 x 22 x 33 cm, equipadas con una rejilla plástica para contener los frutos y un termohigrómetro para el control de ambiente. Este proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente hasta que los frutos se encuentren entre el 50% al 100% de severidad. Se realizó una escala de severidad publicada bajo el título “A diagramatic scale to quantify severity of antracnose in *Rubus glaucus* Benth” (González et al, 2019) para la cual en su estandarización y desarrollo se emplearon frutos inoculados con el método anteriormente descrito.

[067] En una realización específica, la escala logarítmica diagramática para evaluar la antracnosis causada por el hongo *C. acutatum* en *Rubus glaucus* Benth se desarrolló con un máximo de severidad de 100% como se muestra en la figura 4. Se determinaron seis clases, constituidas por los intervalos: 1 = sana, 2 = 1-6%, 3 = 7-25%, 4 = 26-50%, 5 = 51-75%, 6 = 76-100% de afectación.

**[068] Evaluación de actividad biológica del producto de fermentación de los frutos de *Rubus glaucus* Benth afectados por *Colletotrichum acutatum***

**[069] Preparación de las muestras**

[070] Los frutos se lavaron inicialmente con solución microbicida (dilución de solución detergente anfoterica (dodecil-diaminoetil glicina) entre 0,1 y 1.5 % en agua destilada estéril, posteriormente se realizaron inmersiones en hipoclorito de sodio entre el 1 y el 5% con posterior exposición a ultrasonido por 5 a 20 minutos, seguidas de inmersiones en etanol al 70%, enjuagándose después de cada inmersión con agua destilada estéril en exposición a ultrasonido por 5 a 15 minutos. Se prepararon tres muestras. La primera muestra se conformó con frutos sin inocular (denominada en adelante fruto sin inocular, FSI). La segunda muestra consistió en frutos sin inocular conservados hasta el final del estudio, constituyéndose como el blanco (denominado en adelante blanco, BL). Finalmente, la tercera muestra se conforma con frutos inoculados con *C. acutatum* (denominada en adelante fruto inoculado, FI), conservados hasta el final del estudio (100% de afectación de los frutos de acuerdo con la escala de severidad).

[071] **Inoculación de los frutos de *Rubus glaucus* Benth y fermentación en estado sólido.**

[072] La inoculación de los frutos se realizó con la suspensión de esporas o conidios de la cepa de *C. acutatum*, en concentración entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^7$  esporas/ml y su incubación bajo condiciones controladas como descrito previamente. Luego de obtener una infección de los frutos con una severidad del entre el 50 y el 100% se realizó la evaluación y caracterización de los productos obtenidos por la fermentación en estado sólido. En la figura 5 se muestra los productos de la fermentación obtenidos para las tres muestras a partir del congelamiento de los frutos con nitrógeno líquido y posterior pulverización, se tomaron 2g de muestra del fruto pulverizado, y se procedió a la determinación de contenido total de compuestos fenólicos mediante inmersión de los frutos pulverizados en metanol.

[073] **Determinación de compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante**

[074] Para la determinación de la capacidad antioxidante del producto obtenido por fermentación sólida, se empleó el método de reducción del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

[075] La Tabla 3 presenta los resultados del contenido de compuestos fenólicos producto de la fermentación sólida de *Rubus glaucus* Benth, los cuales se visualizan de manera gráfica en la figura 5. Entre tanto, se realizó la estandarización de la curva que correlaciona el mg AG/absorbancia, la cual generó una ecuación con coeficiente  $R = 0,9924$ . Los resultados obtenidos muestran un incremento en el contenido de fenoles totales tanto en el blanco (BL), como en los frutos inoculados (FI), con valores de  $4.53 \pm 10.19$  y  $6.94 \pm 0.30$  respectivamente, lo cual corresponde a un incremento de 30% y 99% respectivamente, siendo muy notable el incremento en *Rubus glaucus* Benth inoculada. Los resultados más bajos se obtuvieron en la muestra inicial de frutos sin inocular (FSI) con  $3.48 \pm 0.10$  mg eq. AG/g mf. De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA, tomando un nivel de significancia de  $p = 0,05$ , se concluyó que existen diferencias significativas en el contenido de fenoles totales entre los tres extractos. Además, con la prueba de Tukey se establecieron las diferencias estadísticamente significativas en el contenido de fenoles totales entre las tres muestras, siendo menor la diferencia entre los frutos sin inocular inicial y el blanco.

[076] Por otro lado, la Tabla 3 ilustra los resultados de capacidad antioxidante de extractos de *Rubus glaucus* Benth. Entre tanto, la figura 6 presenta estos resultados de manera gráfica. Se realizó la estandarización de la curva que correlaciona el % de inhibición y la concentración de Trolox, la cual generó una ecuación con coeficiente  $R = 0,997$ .

[077] Los resultados obtenidos muestran un aumento en la capacidad antioxidante en las muestras obtenidas de frutos inoculados con valores de  $29.66 \pm 0.74$  mM eq. Trolox/100g mf, frente a los frutos sin inocular que presentaron  $24.3 \pm 0.40$  mM eq. Trolox/100g mf, lo que corresponde a un incremento del 22%. Por otra parte, los resultados más bajos se obtuvieron en el blanco con  $18.71 \pm 1.361$  mM eq. Trolox /100g mf, lo que corresponde a un decremento del 23% respecto al fruto sin inocular. De acuerdo con el análisis estadístico ANOVA, tomando un nivel de significancia de  $p=0,05$ , se concluyó que existen diferencias significativas entre las muestras. Además, con la prueba de Tukey se establecieron las diferencias estadísticamente significativas en entre las tres muestras, siendo ligeramente menor la diferencia entre los frutos sin inocular y los frutos inoculados.

[078]

| Tipo de fruto                | Parámetros      |                        |                          |                      |
|------------------------------|-----------------|------------------------|--------------------------|----------------------|
|                              | Fenoles Totales | Actividad Antioxidante | Actividad Microbiológica | Actividad Citotóxica |
|                              | mg eq. AG /g mf | mM eq. Trolox /100g mf | Mm halo                  | µg/ml                |
| <b>Sin inocular inicial</b>  | $3.48 \pm 0.10$ | $24.3 \pm 0.40$        | -                        | 113,70               |
| <b>Sin inocular final</b>    | $4.53 \pm 0.19$ | $18.71 \pm 1.361$      | -                        | 113,70               |
| <b>Con inoculación final</b> | $6.94 \pm 0.30$ | $29.66 \pm 0.74$       | -                        | 88,939               |

Eq - Equivalente  
AG – Ácido Gálico  
Mf – muestra fresca

Tabla 3. Resultados de contenido total de fenoles

[079] La actividad citotóxica se evaluó frente a nauplios de *Artemia salina* de acuerdo al procedimiento descrito por (Morales & García, 2000); (Sanabria et al., 1997), con modificaciones en las muestras metanólicas que se evaluaron a concentraciones de 1500, 1000, 500, 100 y 10 µg/mL.

[080] La respuesta biológica de *Artemia salina* frente a los productos de fermentación de *Rubus glaucus* Benth, presentó valores con los cuales se determinó la DL50 para frutos sin inocular, presentándose en 113,70 µg/ml, y para el blanco de 113.70 µg/ml, tal como se observa en la figura 7. De esta manera, ambas muestras se clasifican como moderadamente tóxicas. Sin embargo, para *Rubus glaucus* Benth inoculada con *C. acutatum*, la DL50 fue de 88.94 µg/ml, por lo cual se clasifica como altamente tóxica, aunque este valor tiende hacia el valor del límite superior de esta clasificación.

[081] Finalmente se puede establecer que en la presente invención se evaluó, en frutos de *Rubus glaucus* Benth afectados por *C. acutatum*, la variación en el contenido total de fenoles y las actividades biológicas: capacidad antioxidante y actividad citotóxica. Se encontró que luego del proceso de fermentación sólida para los fenoles totales cuando se comparan con el blanco, se da un incremento del 99%. Respecto a la capacidad antioxidante, los frutos inoculados frente a los frutos sin inocular presentaron un incremento del 22%, mientras que el blanco tuvo un decremento del 23% respecto al fruto sin inocular. La actividad citotóxica presentó DL50 para frutos sin inocular en 113,70 µg/ml, y para el blanco en 113.70 µg/ml, clasificándose ambas como moderadamente tóxicas. Sin embargo, para los frutos inoculados con *C. acutatum*, la DL50 fue de 88.94 µg/ml, por lo cual se clasifica como altamente tóxica y con un gran potencial farmacológico.

[082] **Ejemplo específico que describa las mejores condiciones de la invención**

[083] **Limpieza y desinfección de los frutos del género de *Rubus glaucus* Benth.**

[084] Los frutos de *Rubus glaucus* Benth en estado fisiológico de madurez 4 y 5 se recolectaron y se llevaron a almacenamiento en frascos de vidrio estériles durante máximo 24 horas a una temperatura de 4°C. Los frutos congelados fueron lavados con agua para la eliminación de partículas de material vegetal y tierra. Posteriormente, los frutos dentro de los frascos de almacenamiento fueron sumergidos una solución al 0,5 % de dodecil-diaminoetil glicina y lavados con suaves movimientos del frasco y se enjuagaron con agua destilada estéril.

[085] Para el proceso de lavado y desinfección profundo se realizaron tres pasos consecutivos que consistieron en la inmersión de los frutos en una solución de hipoclorito de sodio al 5% y se procedió a llevarlo a ultrasonido (modelo B3510-DTH Ref CPN-952-318; S/NRMC11100366F) a 50 hertz por 5 minutos para remover las partículas y posibles microorganismos que se encuentran entre las drupas. Luego de esta primera desinfección se procedió con una inmersión en solución de etanol al 70% y tratamiento con ultrasonido a 50 hertz durante 5 minutos. Entre cada inmersión en las soluciones de hipoclorito de sodio y etanol se realizó un enjuague de los frutos con agua destilada estéril con exposición a ultrasonido a 50 hertz por 5 minutos.

[086] Luego del proceso de limpieza y desinfección se procedió a realizar una desinfección con luz ultravioleta en cabina de flujo laminar durante 5 minutos y se dejan en cabina hasta el secado de los frutos.

[087] Con este procedimiento de limpieza se garantiza que los frutos se encuentran en las mejores condiciones para realizar la inoculación del hongo y el proceso optimizado de fermentación sólida.

[088] **Inoculación de los frutos de *Rubus glaucus* Benth y fermentación en estado sólido.**

[089] Los frutos previamente desinfectados y secos se sometieron a inoculación en ambas caras de los frutos con una suspensión fúngica de *C. acutatum* de concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/ml, usando un pulverizador para la generación de microgotas. Este procedimiento se realiza en cabina de flujo laminar y con una mínima manipulación. Luego de la inoculación del hongo en los frutos de *Rubus glaucus* Benth, los frutos impregnados se llevaron a cámara húmeda estéril con una humedad relativa de 95% y una temperatura de 27°C con el fin de mantener las condiciones de fermentación sólida adecuadas para lograr que el fruto llegue a 100 % de severidad de infección por el hongo.

[090] Luego de lograr un porcentaje de severidad de 100% de infección, los frutos se retiraron de la cámara húmeda y se procedió a triturarlos usando un molino eléctrico. Este producto triturado fue usado para realizar la evaluación y caracterización del incremento de los compuestos bioactivos y se comparó con frutos lavados, desinfectados e incubados, pero sin inocular analizados al inicio y cuándo se alcanzó el 100% de severidad de los inoculados.

[091] La evaluación de los productos obtenidos por fermentación sólida se realizó mediante la determinación del contenido de fenoles totales usando el método de Folin- Ciocalteu de acuerdo a (Cicco et al., 2009) y (Magalhães et al., 2010), la capacidad antioxidante por el método de reducción del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) de acuerdo con (Ortiz et al., 2013), en ambas pruebas se realizaron modificaciones para adaptarlas al uso de un lector de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan GO con detección espectrofotométrica y placas de microvaloración de 96 pozos y la actividad citotóxica se evaluó mediante la exposición de nauplios de *Artemia salina* al producto obtenido de la fermentación.

[092] La Tabla 3 presenta los resultados del contenido de compuestos fenólicos, actividad antioxidante y actividad citotóxica del producto obtenido luego de la fermentación sólida de *Rubus glaucus* Benth, los cuales se visualizan en la figura 5, 6 y 7.

[093] Los resultados obtenidos muestran un incremento en el contenido de fenoles totales tanto en el blanco (BL), como en los frutos inoculados (FI), con valores de  $4.53 \pm 10.19$  y  $6.94 \pm 0.30$  respectivamente, lo cual corresponde a un incremento de 30% y 99% respectivamente, siendo muy notable el incremento en *Rubus glaucus* Benth inoculada. Por otro lado, los resultados obtenidos muestran un aumento en la capacidad antioxidante en las muestras obtenidas de frutos inoculados con

valores de 29.66 +/- 0.74 mM eq. Trolox/100g mf, frente a los frutos sin inocular que presentaron 24.3 +/- 0.40 mM eq. Trolox/100g mf, lo que corresponde a un incremento del 22%.

[094] En el caso de la respuesta biológica de *Artemia salina* frente a los productos de fermentación de *Rubus glaucus* Benth, presentaron valores de DL50 de 88.94 µg/ml, por lo cual se clasifica como altamente tóxica. Comparado con la DL50 para frutos sin inocular (113,70 µg/ml), y con la DL50 para el blanco (113.70 µg/ml) que se clasifican como moderadamente tóxicas.

[095] Estos resultados demuestran que los productos luego de la fermentación sólida de frutos de *Rubus glaucus* Benth son bioactivos y tienen un alto potencial biológico o farmacológico.

## REFERENCIAS

Álvarez, E., Ospina, C. A., Mejía, J. F., & Llano, G. (1998). Caracterización morfológica, patogénica y genética del agente causal de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en guanábana (*Annona muricata*) en el valle del cauca. *Fitopatología Colombiana*, 28(1), 1–8.

Andrade, E., Uesugi, C., Ueno, B., & Ferreira, M. (2007). Caracterização Morfocultural e Molecular de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Patogênicos ao Mamoeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 32(1), 021–031. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000100003>

Armijos, V. D., Vargas, W. A., Sukno, S. A., & Thon, M. R. (2013). Horizontal Transfer of a Subtilisin Gene from Plants into an Ancestor of the Plant Pathogenic Fungal Genus *Colletotrichum*. *Plos One*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059078>

Arrieta-Guevara, M. A., Higuera-Mancipe, B. L., & Martínez-Peralta, S. T. (2010). Induction of phenylalanine ammonia lyase and variation in phenolic compounds content in Lulo fruits (*Solanum quitoense* Lam) infected by *Colletotrichum acutatum*. *Acta Biológica Colombiana*, 15(1), 129-144.

Barquero, M., Perez, N., & Arauz, L. (2013). Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporoides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en COSTA RICA y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense*, 37(1), 23–38

Betancur, E., García, E., Barrera, E., Quejada, O., Rodríguez, H., & Arroyave, I. (2014). Manual Técnico del Cultivo de Mora Bajo Buenas Prácticas Agrícolas. Retrieved from [http://www.cece.gva.es/ite/docs/Buenas\\_Prac\\_Tic.pdf](http://www.cece.gva.es/ite/docs/Buenas_Prac_Tic.pdf)

Bliss W., (2006). Process to sanitize fruit and vegetables. US2006141111A1.

Borrás-Sandoval, L. M., & Torres-Vidales, G. (2016). Producción de alimentos para animales a través de fermentación en estado sólido—FES. *Orinoquia*, 20(2), 47-54.

González, P., Guerrero, Á., & Isaza, V. (2019). A diagramatic scale to quantify severity of antracnose in *Rubus glaucus* Benth. *Ciencia Rural*, 49(4).

Bowden R., Herdeman R., (2021). Systems and methods for applying treatments for preservation of perishable goods WO2021055818A1.

Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107–110. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.08.011>

Dey, P., Banerjee, J., & Maiti, M. (2011). Comparative lipid profiling of two endophytic fungal isolates - *Colletotrichum* sp. and *Alternaria* sp. having potential utilities as biodiesel feedstock. *Bioresource Technology*, 102(10), 5815–5823. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.064>

Diéguez, J., Förster, H., & Adaskaveg, J. (2008). Visualization of localized pathogen-induced pH modulation in almond tissues infected by *Colletotrichum acutatum* using confocal scanning laser microscopy. *Phytopathology*, 98(11), 1171–1178. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-11-1171>

Escobar, C., & Irigorri, A. (2015). Bullets mora julio 2015, Indicadores de apoyo. Ministerio de Agricultura.

Feménia, M. E. (2007). Caracterización química de cepas de hongos del género *Colletotrichum*: síntesis de gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelos de agentes fungicidas. Universidad de Cádiz.

Farr, D., & Rossman, A. (2017). Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved July 10, 2017, from <https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.

Gosset, G. (2017). Los microbios como biofábricas. *Ciencia-Academia Mexicana de Ciencias*, 68(2), 44-49.

Gouvinhas, I., Martins-Lopes, P., Carvalho, T., Barros, A., & Gomes, S. (2019). Impact of *Colletotrichum acutatum* pathogen on olive phenylpropanoid metabolism. *Agriculture*, 9(8), 173.

Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC). NTC 4106 – Frutas frescas. Mora de castilla. Especificaciones (1997). Bogotá, D.C. Colombia.

Jeltsch J., Phalip V., Duranton J., Tranier M., Misrahi A., Falter C., (2011). Production of molecules of interest by solid-state fermentation EP2390345A1.

Magyar, Ildikó (2011). Botrytized Wines. Ronald S. Jackson, editor: *Advances in Food and Nutrition Research*, Vol. 63, Burlington: Academic Press. pp. 147-206. ISBN: 978-0-12-384927-4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384927-4.00006-3>

Manasa, C., & Nalini, M. (2014). L-Asparaginase Activity of Fungal Endophytes from *Tabernaemontana heyneana* Wall, (Apocynaceae), Endemic to the Western Ghats ( India ). International Scholarly Research Notices, 2014, 1–7.

Magalhães, L. M., Santos, F., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2010). Rapid microplate high-throughput methodology for assessment of Folin-Ciocalteu reducing capacity. *Talanta*, 83(2), 441–447. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.042>

Miles, T. D. (2011). Infection of blueberries by *colletotrichum acutatum*: host defenses, inheritance of resistance and environmental effects. Michigan State University.

Miles, T. D., Hancock, J. F., Callow, P., & Schilder, A. M. C. (2012). Evaluation of screening methods and fruit composition in relation to anthracnose fruit rot resistance in blueberries. *Plant Pathology*, 61(3), 555–566. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02541.x>

Munger, K. (2015). Method for disinfecting, sanitizing, and packaging ready-to-eat produce. US9095152B2. U.S.

Oliveira, R., Moral, J., Bouhmidi, K., & Trapero, A. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp . causantes de la Antracnosis del olivo. *Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas*, 31–4, 531–548.

Ortiz, J., Marín, M., Noriega, M., Navarro, M., & Arozarena, I. (2013). Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.), blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from ecuador. *Journal of Food Science*, 78(7), 985–993. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12148>

Patiño Torres, C. (2010). Producción in vitro de pectinasas por *colletotrichum acutatum*. *Acta Agronómica*, 967. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

Prusky, D., Mcevoy, J. L., Leverentz, B., & Conway, W. S. (2001). Local Modulation of Host pH by *Colletotrichum* Species as a Mechanism to Increase Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(9), 1105–1113.

Singhania, R. R., Patel, A. K., Soccol, C. R., & Pandey, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44(1), 13-18.