



Fundación
Mani
Argentino

Evaluación de la actividad antifúngica de distintos principios activos frente a patógenos que afectan el cultivo de maní

Figueroa A., Diaz S., Alasino R., Beltramo D.

FUNDACION MANI ARGENTINO

General Cabrera, 2017

WWW.
FUNDACIONMANI.
ORG.AR





INDICE DE CONTENIDO

- *Antecedentes*
- *Objetivos*
- *Actividad antifúngica in vitro*
- *Desarrollo de Formulaciones*
- *Crecimiento de *T. frezii* in vitro*
- *Perspectivas futuras*

WWW.
FUNDACIONMANI.
ORG.AR



ANTECEDENTES

- ✓ Carbón del maní causado por *Tecaphora frezii*
- ✓ Control actual: manejo integrado, rotación de cultivos, labranza, fertilizantes, enmienda del suelo, control químico y biológico.
- ✓ No se logra aún reducir el impacto de la enfermedad.
- ✓ Se continúa en la búsqueda de nuevos compuestos inocuos, biodegradables, capaces de producir una alteración de las estructuras de las células fúngicas, que consigan inhibir su desarrollo, afectando su viabilidad o capacidad de supervivencia.

OBJETIVOS

- ✓ Evaluación de la actividad antifúngica “in vitro” de dos compuestos frente a *T. frezii*
- ✓ Determinar el rango efectivo de concentraciones
- ✓ Desarrollar formulaciones de los compuestos seleccionados o sus combinaciones.
- ✓ Caracterizar propiedades físico-químicas de las formulaciones: viscosidad, tamaño, potencial zeta, así como estabilidad y adhesión
- ✓ Selección del medio de cultivo para el crecimiento micelial *in vitro* de carbón

Actividad antifúngica in vitro de compuestos previamente seleccionados

Curva dosis respuesta

En la presentación no se nombran los principios activos en estudio debido a que los mismos se encuentran bajo patente, por lo que los llamamos compuesto A y compuesto B

Compuesto B/agua	0.5 mM	+	1 mM	+	5 mM	+	10 mM	+
Compuesto B/etanol	0.5 mM	+	1 mM	-	5 mM	-	10 mM	-
Compuesto A/agua	0.1 mM	+	1 mM	+	5 mM	-	10 mM	-
Compuesto A/etanol	0.1 mM	+	1 mM	-	5 mM	-	10 mM	-

CIM productos comerciales:

Carbendazim 1 mM

Ciproconazol/picoxistrobin 1,4 uM/3,4 uM

Formulaciones de los principios activos seleccionados

Formulación	Principio activo	Dilución (1/100)
Compuesto B/PEG 2 M + Tween 80 (1:1 v/v)	inestable	-
Compuesto B/aceite sulfitado 0,5 M	estable	estable
Compuesto B/aceite sulfitado 0,5 M + Tween 80 (1:1 v/v)	estable	inestable
Compuesto B/aceite sulfitado 0,5 M + lecitina de soja (1:1 v/v)	Calor. estable	estable
Compuesto B en aceite sulfitado/ lecitina (1:1 v/v) 1M	estable	inestable
Compuesto B en aceite sulfitado/ lecitina 1M - CBZ 0,1M	estable	estable
Compuesto B 100 mM en buffer TRIS 200 mM, pH: 7,5.	estable	estable
Compuesto B 1,5 M en TEA:agua (1/1) pH: 7,5	estable	estable
Compuesto A en aceite sulfitado 0,5 M	Calor. estable	estable
Compuesto A en aceite sulfitado/CBZ 0,1 M	estable	estable
Compuesto A en aceite sulfitado/lecitina 1M	cristaliza	-
Compuesto A en aceite sulfitado/lecitina 1M - CBZ 0,1 M	cristaliza	-
Compuesto B 0.75 M en TEA:agua (1/1) - Compuesto A/aceite 0,25 – CBZ 0.1 M	estable	estable
Compuesto B 0.25 M –Compuesto A 0.5M - CBZ 0.1 M - BHA 0.1 M /aceite vegetal sulfitado	estable	estable

Actividad antifúngica *in vitro* de las formulaciones

Formulación	Concentración (mM)
Compuesto B en buffer TRIS, pH: 6,5	0.1
	0.5
	1.0
	5.0
Compuesto B /aceite vegetal sulfitado	0.1
	1
Compuesto B en aceite sulfitado/ lecitina (1/1) - CBZ	0.100 - 0.010
	1 - 0.1
Compuesto A en aceite sulfitado	0.5
	1.0
Compuesto A en aceite sulfitado - CBZ	0.050 - 0.010
	1 - 0.2
Compuesto B en TEA/agua	0.1
	1.0
	10
Compuesto B en TEA:agua - Compuesto A en aceite sulfitado - CBZ	0.075 - 0.025 - 0.010
	1 - 0.3 - 0.1
Compuesto B y Compuesto A -CBZ -BHA/aceite vegetal sulfitado	0,5 - 1 - 0,2 - 0,2
	1 - 2 - 0,4 - 0,4

Parámetros físicos de las formulaciones

Viscosidad

Compuesto B / Compuesto A -CBZ -BHA/aceite vegetal sulfitado: 1525 Cps

Compuesto B / Compuesto A -CBZ -BHA/aceite vegetal sulfitado (dil. con agua 1/100): 0.93 Cps

Estabilidad

Centrifugación , Temperatura

Adhesión

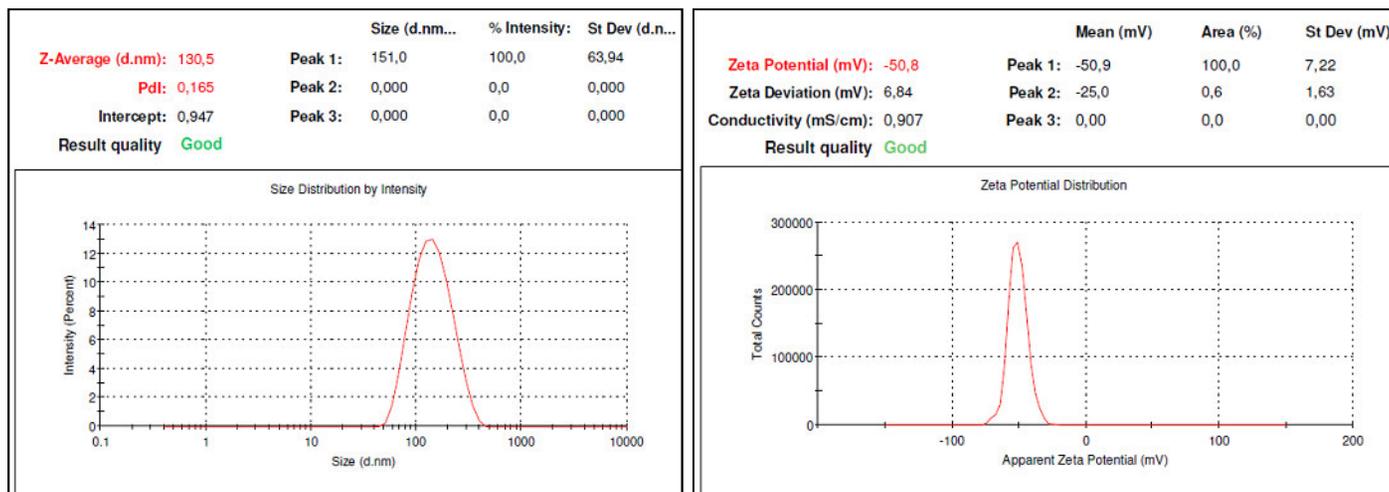


Formulación con Azul de metileno (dil 1/100), A: 72 hs de incubación, B y C Posterior a 10 días.

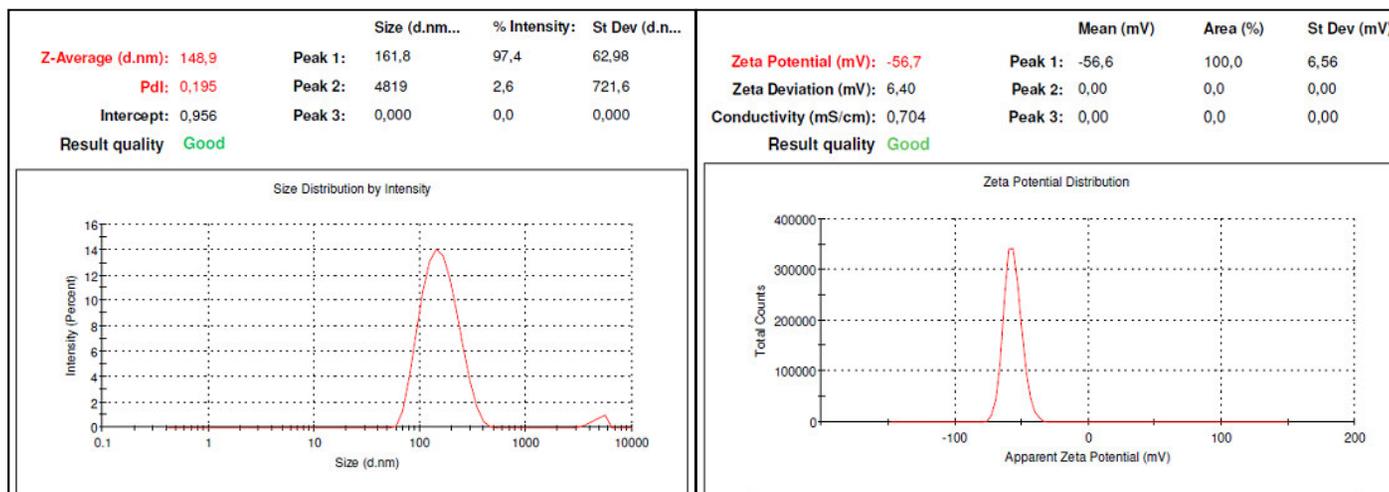
Formulación con sudan black (dil 1/100), A: 72 hs de incubación, B y C Posterior a 10 días

Tamaño de partículas/ Potencial Z

Compuesto B / Compuesto A -CBZ -BHA/aceite vegetal sulfitado/agua (1/100) filtro: 0,45um

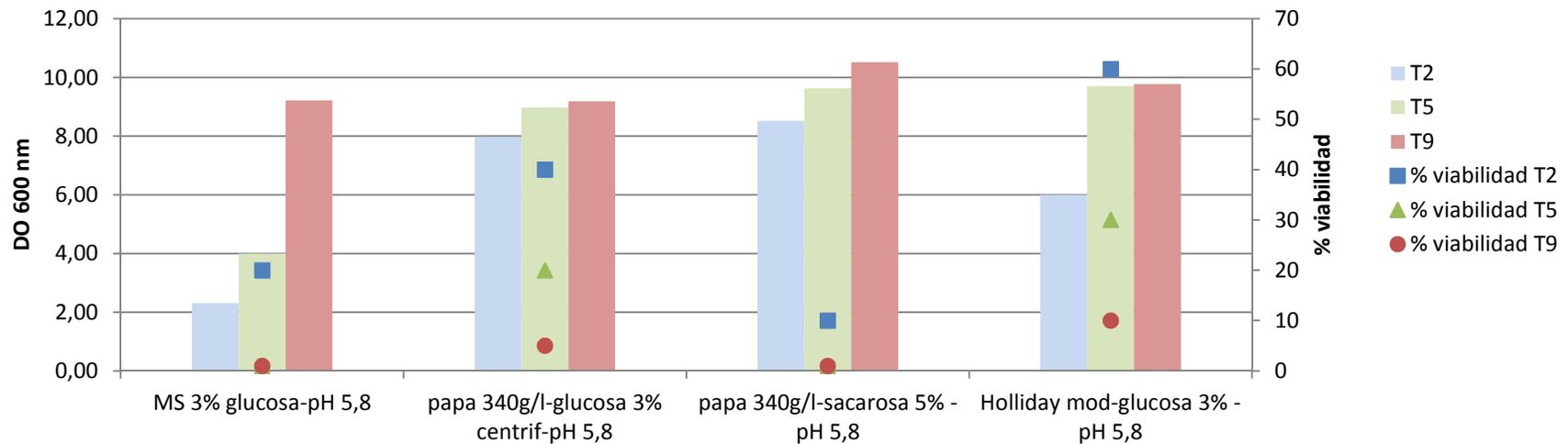


Compuesto B /Compuesto A -CBZ -BHA/aceite vegetal sulfitado/agua (1/100) filtro: 0,45um. 5 días

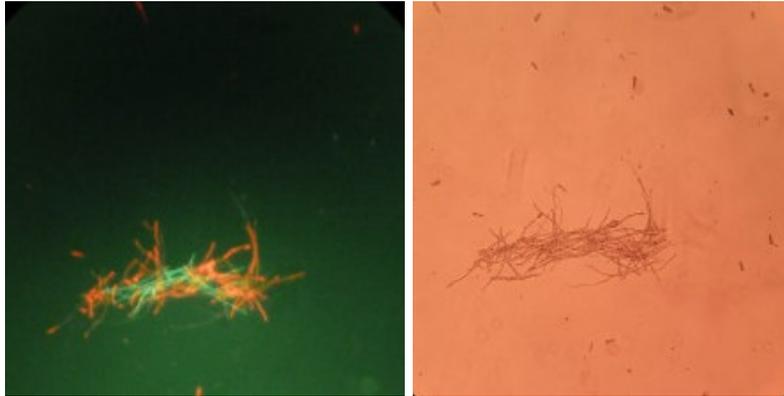


Influencia del Medio de cultivo en el crecimiento *in vitro* y viabilidad de *T. frezii*

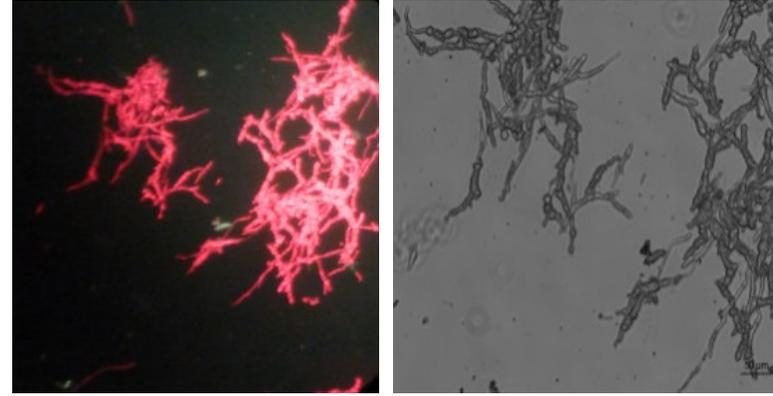
Se inocularon con hifas de carbón un medio caldo papa y se comparó con dos medios definidos (MS y Holliday modificado) a pH 5,8. Se evaluó a diferentes tiempos el crecimiento mediante DO_{600nm} y la viabilidad mediante microscopía de fluorescencia (DAF/IP) a fin de seleccionar un medio adecuado para los estudios posteriores de mecanismo de acción de los compuestos en estudio.



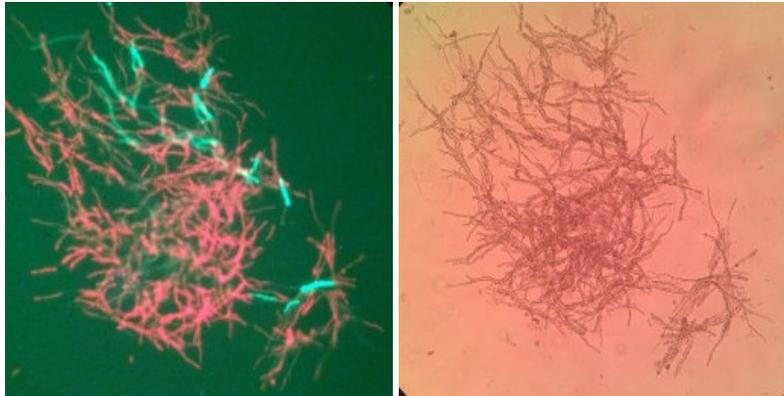
- ✓ En medio papa y Holliday las hifas desarrollan rápidamente, alcanzando valores de DO entre 8 y 10 a los 5 días, las hifas son largas, finas y no segmentadas.
- ✓ En medio MS cinética de crecimiento es mas lenta
- ✓ La viabilidad decayó rápidamente en los medios MS y papa sacarosa.



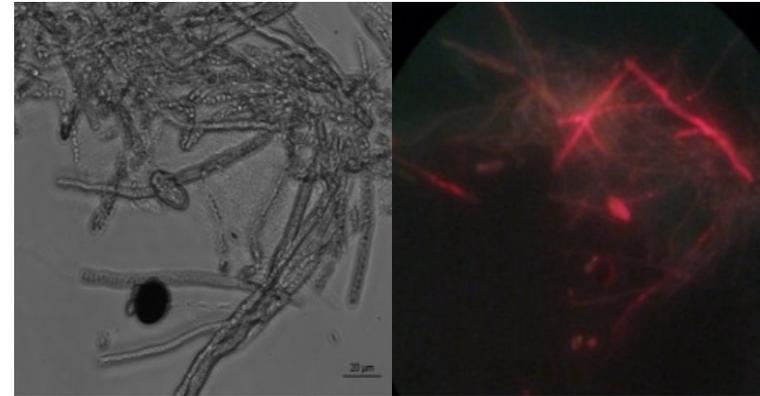
Holliday modif gluc 3% pH:5,8



MS glucosa 3% pH 5,8



Papa 340 g/l gluc 3% pH: 5,8



Papa 340 g/l sac 5% pH: 5,8

En medio papa y Holliday el crecimiento es más homogéneo. En MS se forman cúmulos que sedimentan y dejan al medio límpido.





Perspectivas futuras:

- ✓ Realizar pruebas a campo en la siguiente campaña, de los principios activos evaluando el efecto individual y de formulaciones mixtas.
- ✓ Evaluar vías metabólicas que pudieran estar involucradas en el mecanismo de acción de los compuestos en estudio.
- ✓ Medir la viabilidad de teliosporas mediante microscopía de fluorescencia y estudiar el efecto de los compuestos sobre su germinación.