

Terapia fotodinámica antimicrobiana para el control de hongos fitopatógenos

Antimicrobial photodynamic therapy to control phytopathogenic fungi

Brenda Viridiana Aguilar Montes, Ángeles Guadalupe Cantador Arriaga, Nayeli Guadalupe Segura Ávila, Rebeca M. Juárez Campos, César Díaz Pérez y Juan Carlos Ramírez Granados.

Depto. de Ingeniería Agroindustrial, División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Universidad de Guanajuato. Mutualismo s/n, Celaya, Gto. jcramirez@ugto.mx

Resumen

En el presente trabajo se estudió el efecto de la terapia fotodinámica antimicrobiana sobre hongos fitopatógenos. Para este estudio se emplearon cepas de *Alternaria* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Rizoctonia* sp., *H. Porium* y *Botrytis* sp. Como agentes fotosensibilizadores se empleó azul de metileno, rosa de bengala y clorofilina. Las muestras de hongos recibieron aspersiones de los fotosensibilizantes cada 24 horas y fueron expuestas a la radiación solar. Diariamente se midió el crecimiento diametral de las muestras de hongos y se compararon con muestras de control a las que no se les aplicó ningún agente fotosensibilizante para determinar el efecto de cada tratamiento de terapia fotodinámica sobre las cepas seleccionadas.

Palabras clave: terapia fotodinámica, hongos fitopatógenos, fotosensibilizador.

1. Introducción

La terapia fotodinámica antimicrobiana (TFDa) es una técnica basada en la activación de un cromóforo no tóxico llamado agente fotosensibilizador (FS), que puede ser activado por luz a cierta longitud de onda. Esta exposición induce la producción de radicales dañinos, como las especies reactivas de oxígeno (ERO's) y oxígeno singlete (Sen Salinas, 2021). Los FS son compuestos que, en su estado basal, no presentan actividad citotóxica, pero que, gracias a la luz visible y en presencia de oxígeno, poseen la capacidad de activarse, potenciando los efectos de la radiación luminosa. Para ser más concretos, estos compuestos, excitados a una longitud de onda adecuada, generan especies altamente reactivas de oxígeno. Las especies reactivas de oxígeno dan lugar a productos tóxicos para los microorganismos patógenos, entre ellos, oxígeno singlete (1O_2) o radicales hidroxilo ($HO\cdot$), lo que impide su crecimiento y diseminación, y, por tanto, ocasionando la muerte del agente patógeno. (Albarrán Vidal, 2021).

La terapia fotodinámica ha surgido como una alternativa eficaz para el tratamiento de diversas patologías, entre ellas, varios tipos de cáncer e infecciones microbianas. La TFDa es especialmente atractiva gracias a su selectividad; esto es consecuencia tanto de poder disponer de un FS con una afinidad preferente por las células microbianas respecto al tejido del huésped, como de que el efecto fotodinámico se restringe a la zona tratada con luz. (López-Chicón et. al, 2016)

En este trabajo de investigación, el enfoque de aplicación de la TFDa será en hongos fitopatógenos, empleando como agentes fotosensibilizadores el azul de metileno (AM), rosa de bengala (RB) y clorofilina sódica cúprica (CLF).

2. Marco Teórico

2.1 Mecanismo de acción de la TFD

Como ya se ha mencionado, en este tipo de terapia se emplea luz visible en conjunto con oxígeno para producir ERO's. De acuerdo con Miretti (2020), existen dos mecanismos de acción cuando el FS se encuentra en estado triplete: las reacciones tipo I y II.

Reacción tipo I

Las reacciones fotoquímicas tipo I implican reacciones de transferencia de hidrógeno o electrones desde el estado triplete excitado $^3\text{PS}^*$ a moléculas biológicas u oxígeno. Estas reacciones de transferencia de electrones producen (directa o indirectamente) especies reactivas de oxígeno que son dañinas para las células, como el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los radicales hidroxilo, y los radicales hidroperóxido (HOO). En la Figura 1 se presenta el diagrama de Jablonski que ilustra y permite mejor entendimiento de los procesos involucrados en el mecanismo fotoquímico de la TFD.

Reacción tipo II

En las reacciones de tipo II, se genera oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) como resultado de la transferencia de energía del estado $^3\text{PS}^*$ al estado fundamental del oxígeno molecular. La eficiencia y el rendimiento de la producción de oxígeno singlete dependen directamente de la estructura del fotosensibilizador, la concentración local de oxígeno y el disolvente en el que se diluyen.

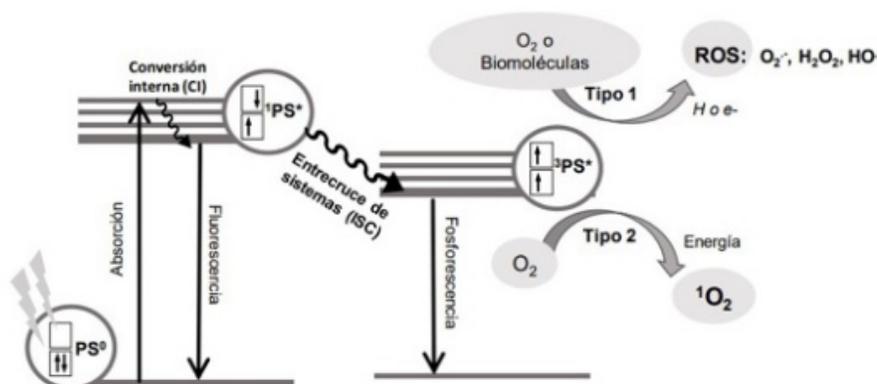


Figura 1. Diagrama de Jablonski para las foto-reacciones tipo 1 y 2. Fuente: Miretti, 2020.

2.2 Tipos de agentes fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores se definen como sustancias capaces de absorber luz con una longitud de onda específica, desencadenando reacciones que llevan a procesos de destrucción celular. (Miretti, 2020). Taylor y colaboradores (2011), mencionan que los fotosensibilizadores se clasifican en familias según su estructura química y su naturaleza catiónica, aniónica o neutra, además por sus propiedades de distribución y selectividad y excreción, se pueden clasificar como de primera, segunda o de tercera generación.

Los agentes fotosensibilizadores de primera generación presentan pobre excreción que origina posible fotosensibilidad prolongada con pérdida de absorción de luz, producción de energía y poca penetración. Los agentes fotosensibilizadores de segunda generación tienen mayor absorción de luz y afinidad por el tejido blanco, sin embargo, presentan acumulación en órganos como el hígado, riñón y el bazo. Con el fin de mejorar la selectividad por el tejido blanco de los agentes fotosensibilizadores y minimizar su toxicidad, han surgido los de tercera generación, que son aquellos conjugados con anticuerpos dirigidos contra el antígeno tumoral, a moléculas de LDL o de folato, cuyos receptores se expresan en células tumorales o están dirigidos a las vías metabólicas de los microorganismos. (Taylor et. al, 2011).

2.3 Propiedades de los fotosensibilizadores

Dentro de la amplia gama de fotosensibilizadores se encuentra el rosa de bengala, el cual tiene actividad antimicrobiana y tiene la capacidad de convertir el oxígeno de su estado fundamental a un estado activado. Esto sucede cuando el rosa de bengala absorbe la radiación luminosa a una longitud de onda alrededor de los 580 nm y el fotosensibilizador para eliminar la sobreexcitación es capaz de transferir esta energía al oxígeno mediante un intercambio de electrones. Esta transferencia de electrones implica que el oxígeno se encuentre en un estado de energía mayor; por lo tanto, se vuelve más inestable y reactivo. (Albarrán Vidal, 2021)

Otro fotosensibilizador recurrente es azul de metileno que tiene una banda de absorción entre los 550 y 650 nm. El azul de metileno es un colorante al que normalmente se le da el uso de tinte; además, también es

utilizado en otras áreas tales como la medicina por sus propiedades antisépticas y su función como cicatrizante interno, además de que tiene la capacidad de eliminar algunas plagas de hongos y parásitos.

Y por último la clorofilina que es de color verde porque parte de su molécula que da el color (cromóforo), es responsable de absorber bandas de longitudes de onda en la región visible del espectro siendo una de ellas la que se ubica en la región azul (400-500 nm); mientras que refleja longitudes de onda en la región verde del espectro (500-600 nm), entregando así su color característico.

2.4 Hongos fitopatógenos

2.4.1 *Fusarium* sp.

Las especies de *Fusarium* se encuentran entre los patógenos de plantas más comunes y extendidos en el mundo y son de gran importancia económica (Leslie y Summerell, 2006). *Fusarium* ataca numerosas plantas y cereales que son importantes para la nutrición humana y animal. Infecta específicamente ciertas partes de ellos, como granos, plántulas, mazorcas, raíces o tallos; además, causa diversas enfermedades.

Fusarium sp. presenta características microscópicas propias de la especie. La fiálide es generalmente fina, en forma de botella; simple o ramificada; cortas o largas; monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros). Los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados. Los microconidios, son ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas "falsas cabezas") en cadenas largas o cortas, Figura 2.

El género *Fusarium* tiene distribución mundial. Varias de sus especies son patógenas e infectan a una amplia gama de cultivos, entre los más importantes se encuentra el maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum* spp.), avena (*Avena sativa* L.), y cebada (*Hordeum vulgare* L.), entre otros.

Las enfermedades causadas por *Fusarium* sp. pueden ser muy agresivas en climas húmedos. El patógeno invade directamente la base de los tallos, cerca o debajo de la superficie del suelo o entra a la planta a través de las raíces (Cook, 2010). Las esporas de hongos luego germinan en el área afectada (herida), favorecida por la alta humedad y temperaturas (Mokobi, 2020).

Fusarium sp. en maíz puede causar daño en todas las etapas del cultivo, puede atacar las plantas en su follaje, raíces y, en algunas ocasiones, en semillas de árboles de vivero provoca una gran cantidad de síntomas, desde manchas foliares hasta marchites y pudrición de los esquejes, la copa, el bulbo y hasta de la raíz (Figueroa-Rivera *et al.*, 2010; Buechel, 2018).

La infección se desarrolla en las raíces de alimentación y en lesiones causadas por la formación secundaria de raíces. Las temperaturas de suelo frías (20 °C) favorecen el desarrollo de la enfermedad (Seminis, 2020). Los marchitamientos de *Fusarium* sp. son beneficiados por las altas temperaturas del aire y del suelo (24 °C a 30 °C) y la enfermedad puede no ocurrir a bajas temperaturas del suelo (por debajo de 20 °C). Una planta infectada puede permanecer sin síntomas a temperaturas más bajas (Koike *et al.*, 2019).

2.4.2 *H. Porium*

Es un hongo ascomiceto y afecta principalmente a cultivos de maíz y cebada, Fig. 3. Aparecen bandas amarillentas de la base hasta el extremo de la hoja, paralelas a la nerviación. Posteriormente se vuelven de un color marrón ya que el tejido se comienza a necrosar y puede llegar a tener una apariencia de desgarramiento debido a que la lámina foliar empieza a desgarrarse. En casos más graves el hongo puede detener el crecimiento de la planta haciendo que los granos se atrofien dando como resultado una pérdida severa en la cosecha.

El mecanismo de infección generalmente sucede desde la semilla debido a que el hongo esporula sobre las hojas infectadas, con ayuda del viento los conidios se dispersan y llegan a las plantas jóvenes. En las semillas infectadas el micelio se localiza en las glumas, pericarpio y cubierta seminal. Cuando la semilla germina, el micelio invade la plántula penetrando por la punta de la raíz y se desarrolla hacia arriba estableciéndose en los primordios foliares. Este micelio produce conidios que infecta a plántulas adyacentes. La persistencia del micelio en los restos de cosecha del suelo puede causar infecciones secundarias en las hojas, pero que sólo causan pequeñas lesiones (2-3 cm). La germinación de las esporas es óptima con una humedad entre el 85 y 95%, y temperaturas entre 12 y 16 °C. (*Helminthosporiosis - BASF Agricultural Solutions España*, s. f.)

2.4.3 *Colletotrichum* sp.

Tradicionalmente, el género *Colletotrichum* se ha identificado mediante caracteres morfológicos que incluyen: tamaño y forma de conidios, y apresorios; presencia o ausencia de setas, esclerocios, acérvulos, estado

teleomorfo; así como características culturales como por ejemplo color de la colonia, textura y tasa de crecimiento, Figura 4.

Las especies de *Colletotrichum* utilizan dos estrategias principales de infección: colonización hemibiotrófica intracelular o colonización intramural subcuticular. El estado inicial de infección es muy similar en ambas: el conidio se adhiere, germina sobre la superficie de la planta, produce el tubo germinativo y luego forma el apresorio melanizado con el cual penetra directamente la cutícula; sin embargo, el proceso de colonización es diferente en ambas estrategias

Ocasiona enfermedades como pudriciones y principalmente antracnosis en diferentes hospedantes; se manifiesta en lesiones semicirculares con hundimientos en forma de anillos concéntricos. A nivel mundial se reporta la antracnosis en frutas, hortalizas, cereales, plantas herbáceas, maderables y ornamentales, entre otras; sobre todo en zonas templadas y tropicales.

Hay una gran variedad de huéspedes. En el sector ornamental son entre otros: anemone, azalea, bonetero, hiedra, cornejo, lavatera, ranúnculo, rododendro, tulipán y fatsia. Entre las frutas están la fresa, los arándanos azules y grosellas (*Ribes nigrum*). En hortalizas son: pimiento de cayena, judía común, pimiento, judías pintas, pimiento morrón, espinaca, tomate, haba, cebolla y papa.

2.4.4 *Rizoctonia sp.*

El teleomorfo *Thanatephorus cucumeris* produce esterigmas en basidios que van de doliformes a claviformes cortos. Sobre el estigma, producen basidiosporas hialinas, elipsoidales anchas a obovadas, lisas, de tamaño 7-12 x 4-8 μm : los basidios miden de 12 a 18 x 8 a 11 μm , los esterigmas (de 3 a 7) de 5 a 12 x 2.5 a 3.5 μm (Messiaen y Blancard, 1994; Da Silveira *et al.*, 2000), ver Figura 5.

La infección se produce de dos formas diferentes; uno es a través de la penetración de hifas en aberturas y heridas naturales, mientras que el segundo ocurre cuando penetran en la cutícula y la epidermis. La infección comienza con la germinación de basidiosporas durante períodos de alta humedad para formar apresorios que penetran directamente en las células epidérmicas. Después, produce una estructura similar a un estroma, que se desarrolla sólo a partir de una infección de basidiosporas, dentro de las células epidérmicas invadidas o las células de la capa superior del mesófilo. Las lesiones pequeñas se forman en las partes aéreas de los hospedantes susceptibles (Naito, 1996).

R. solani con frecuencia afecta a las semillas durante la germinación, en las plántulas induce muerte pre o post emergente y en plantas pudre la raíz; en frijol puede ocasionar pudrición de raíces, mal del talluelo, pudrición del tallo. *R. solani* se disemina rápidamente a través del agua de riego, mediante el movimiento del suelo y los residuos de cultivos infectados durante la preparación de la tierra y mediante el uso de materiales de plantación infectados (Abawi, 1989). Los propágulos de este hongo incluyen esclerocios, hifas melanizadas de paredes gruesas y basidiosporas (Naito, 1996).

2.4.5 *Alternaria sp.*

Su morfología consiste en conidióforos simples, tabicados de forma alargada u ovoide. En el extremo del conidióforo se forman unos conidios de color pardo, con septos transversales y verticales de disposición irregular. A nivel macroscópicamente presentan un aspecto vellosa, al principio de color gris, después adquieren tonos negros oliváceos en el centro y reverso, y con un borde gris blanquecino que rodea la colonia; Figura 6.

Los huéspedes que infecta comúnmente son los cultivos de cereales (excepto arroz), leguminosas y semillas oleaginosas, hortalizas, raíces y tubérculos. La transmisión se produce principalmente por contaminación de heridas o por inoculación del hongo a través de cortes o pinchazos con herramientas o elementos contaminados. La inhalación de las esporas o de los fragmentos del micelio presentes en forma de aerosol en los ambientes laborales conduce a procesos de sensibilización o alergia. Su presencia en ambientes laborales se ha relacionado con el Síndrome del Edificio Enfermo y con el síndrome tóxico por polvo orgánico (fiebre del grano, micotoxicosis pulmonar). Además, la ingesta de alimentos contaminados puede provocar intoxicaciones.

Las enfermedades que produce la *Alternaria* son las micosis causadas principalmente por *A. alternata*, *A. infectoria* y *A. tenuissima* que afectan principalmente a personas inmunocomprometidas. Normalmente son superficiales (p.ej. onicomycosis), cutáneas y subcutáneas (se manifiestan en forma de lesiones únicas o múltiples en forma de placas pardorrojizas, papulonodulares, pustulosas o ulcerocostrosas, localizadas en las superficies corporales expuestas como piernas, brazos, pies, abdomen, etc.) y, en raras ocasiones, sistémicas (p.ej. encefalitis). También, se ha relacionado a *A. alternata* y *A. infectoria* con queratomicosis y endoftalmítis en personas que han sufrido un traumatismo o cirugía ocular.

2.4.6 *Botrytis* sp.

Botrytis, podredumbre gris, o moho gris es probablemente el mayor causante de merma comercial o de mortalidad de los cultivos. Se trata de un hongo filamentoso muy infeccioso que se desarrolla de forma favorable en climas húmedos y con temperaturas suaves, Figura 7. Ninguna especie vegetal está exenta de padecerlo y una vez que el tejido de la planta está infectado es muy complicado revertir la situación. Además, sus efectos se propagan de una forma muy rápida y sencilla.

Botrytis provoca necrosis causando la muerte celular de la zona afectada. Se propaga con facilidad especialmente en espacios cerrados y/o con poca aireación o en cultivos muy espesos o con alta densidad de vegetación. El tejido afectado acaba oscureciéndose y, algunas veces, se reblandece y terminan por morir. Se desarrolla de forma óptima en periodos de lluvia abundante y en cualquier circunstancia en la que la superficie de la planta se encuentre mojada durante cierto tiempo. Si a esto le añadimos la existencia de heridas en hojas, tallos o flores, la germinación del patógeno será inevitable. Los efectos de *Botrytis* se pueden ver a simple vista ya que cuando está activo, los tejidos afectados con el paso del tiempo pasan de estar manchados a estar cubiertos por una capa de moho gris.

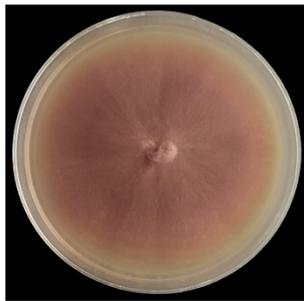


Figura 2. *Fusarium* sp.
 Fuente: Elaboración propia.

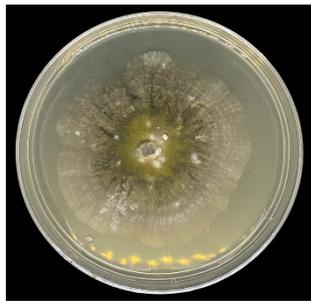


Figura 3. *H. Porium*.
 Fuente: Elaboración propia.

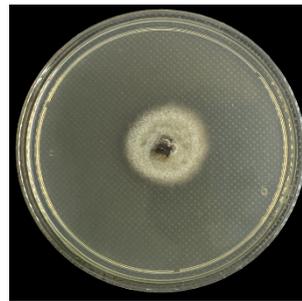


Figura 4. *Colletotrichum* sp.
 Fuente: Elaboración propia.

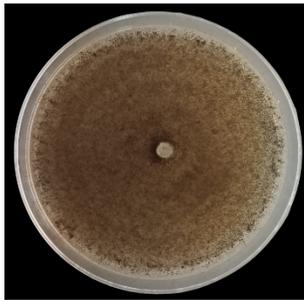


Figura 5. *Rizoctonia* sp.
 Fuente: Elaboración propia.



Figura 6. *Alternaria* sp.
 Fuente: Elaboración propia.



Figura 7. *Botrytis* sp.
 Fuente: Elaboración propia.

3. Materiales y métodos

3.1 Medición de la absorbancia de los fotosensibilizantes

Para realizar la medición de la absorbancia de los FS se siguió el protocolo descrito a continuación con la finalidad de poder realizar la medición debido a que los FS pueden tener una coloración intensa que ocasiona que el espectrofotómetro se sature ya que el haz de luz no penetra la celda con la muestra y por ende puede medir su absorbancia. Por esta razón se realizaron disoluciones acuosas de los FS para disminuir la concentración del pigmento y obtener su absorbancia de 200 a 800 nm.

Los equipos y materiales usados para llevar a cabo este procedimiento fueron los siguientes. Reactivos: Azul de metileno al 5%, Rosa de Bengala al 5%, Clorofilina sódica cúprica al 0.29% y agua destilada. Materiales y equipo: Probetas de 100 ml, pipeta de 10 ml, celdas espectrométricas de cuarzo, espectrofotómetro.

El procedimiento implementado fue el siguiente:

1. Se procede a tomar una muestra de cada FS con el fin de observar el nivel de coloración.
2. Debido al alto nivel de pigmentación se realizan diluciones con factor de dilución de diez.
3. Con ayuda de una probeta se midieron 90 ml de agua destilada.
4. A la probeta se le añaden 10 ml del FS correspondiente.
5. El rosa de bengala en su primera dilución bajo la intensidad de la coloración a un nivel adecuado.
6. Para el azul de metileno después del primer factor de dilución de diez se volvió a realizar este proceso dos veces más; cada vez tomando la muestra de la disolución anterior hasta que finalmente la pigmentación disminuye lo suficiente.
7. La clorofilina debido a la intensidad de su coloración después de su primera dilución con factor de diez se requirió repetir el procedimiento una vez más tomando la muestra de su primera dilución.
8. Finalmente, para medir la absorbancia de cada fotosensibilizador se utilizó una muestra de cada dilución final.
9. La muestra se colocó en una celda de cuarzo.
10. En otra celda idéntica se añadió agua destilada para usar como blanco.
11. Para realizar de manera adecuada las mediciones con el espectrofotómetro es necesario calibrarlo con el blanco en cada longitud de onda usada.
12. Después se puede introducir la celda con el FS a medir.
13. Una vez obtenido el valor de la absorbancia se saca la celda de la muestra y se procede a calibrar nuevamente con el blanco a la nueva longitud de onda.
14. Cada FS se midió en un rango de los 200 a 800 nm con intervalos de 10 nm respectivamente.
15. Con los resultados obtenidos se obtiene las gráficas con la absorbancia espectral de los FS.

3.2 Medio de cultivo de agar de papa y dextrosa (PDA) y preparación de muestras en cajas Petri.

El agar de papa glucosado es un medio recomendado para la detección y enumeración de hongos. Este medio es selectivo ya que su alto contenido de glucosa y bajo pH favorecen el crecimiento de hongos y además el extracto de papa exalta el crecimiento miceliar aéreo y la formación de pigmentos característicos sobre todo en *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. (Scharlau, 2022).

El método para la preparación del agar de papa y dextrosa es el mostrado en la Figura 8.

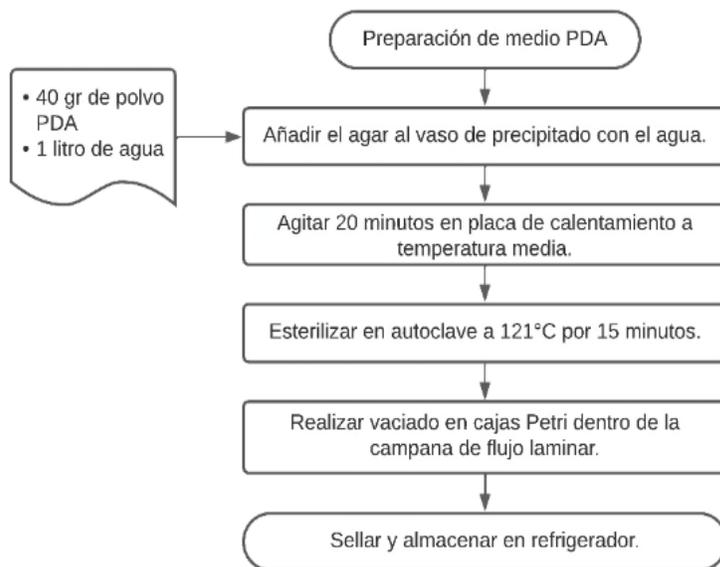


Figura 8. Diagrama de flujo para la preparación de medio de cultivo de agar de papa y dextrosa (PDA).
 Fuente: Elaboración propia.

3.3 Activación y cultivos de hongos

Para la activación y cultivo de los hongos empleados en este trabajo se realizó el procedimiento resumido en la Figura 9.

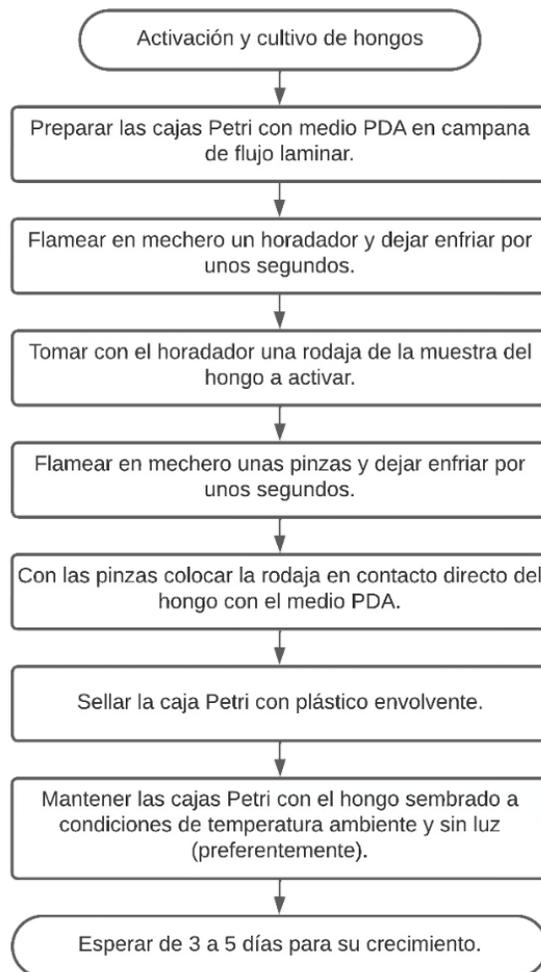


Figura 9. Diagrama de flujo para la activación y cultivo de los hongos.
 Fuente: Elaboración propia.

3.4 Tratamientos de Terapia Fotodinámica Antimicrobiana

Mediante el procedimiento descrito en la sección 3.3 se cultivaron cuatro muestras de cada uno de los siguientes hongos fitopatógenos: *Fusarium* sp., *H. Porium*, *Collecotrichum* sp., *Rizoctonia* sp., *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp. Una muestra de cada hongo fue utilizada como control; es decir, no se les aplicó ningún fotosensibilizante. Luego, una muestra de cada uno de los seis hongos fue asperjada con una solución acuosa de clorofilina al 0.29%, otra muestra de cada hongo fue rociada con una solución acuosa de azul de metileno al 5%; y finalmente otra muestra de cada hongo fue rociada con rosa de Bengala al 5%. Tanto las muestras tratadas con algún fotosensibilizante, como las muestras de control fueron irradiadas con radiación solar indirecta en un espacio con iluminancia de aproximadamente 30000 lx durante un periodo de 7 horas, seguidas de 17 horas de oscuridad a una temperatura de 30 °C. La aplicación de los fotosensibilizantes y los periodos de irradiación y oscuridad se repitieron diariamente durante 15 días consecutivos. Cada día se midió el diámetro o la longitud característica de las muestras de hongos en las cajas Petri y se analizaron los cambios en la apariencia del micelio.

Los resultados de los tratamientos de terapia fotodinámica que fueron aplicados a las muestras de los 6 hongos fitopatógenos considerados en este estudio se muestran en la siguiente sección.

4. Resultados

En los gráficos 1, 2 y 3 se muestran los espectros de absorbancia obtenidos para disoluciones acuosas de los fotosensibilizantes empleados: azul de metileno, rosa de Bengala y clorofilina sódica cúprica.

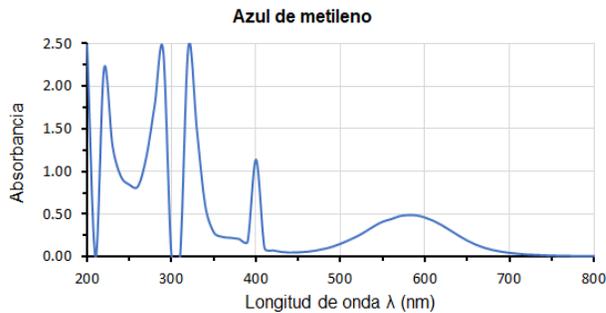


Gráfico 1. Absorbancia del azul de metileno a distintas longitudes de onda.
 Fuente: Elaboración propia.

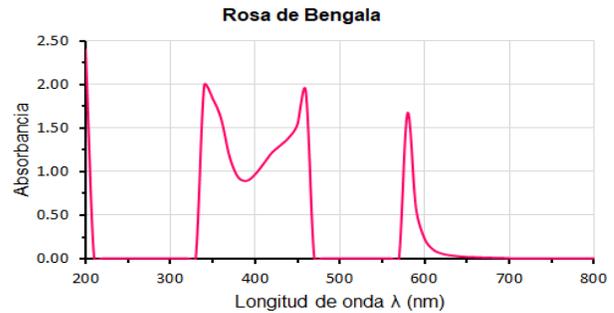


Gráfico 2. Absorbancia del rosa de bengala a distintas longitudes de onda.
 Fuente: Elaboración propia.

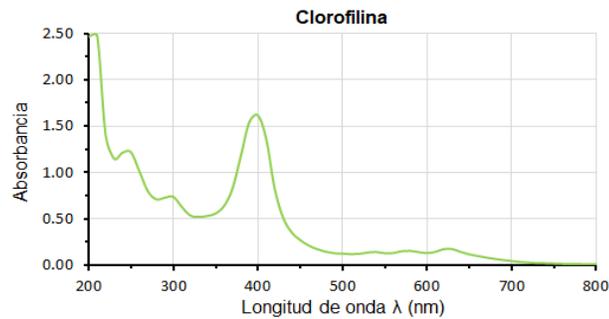


Gráfico 3. Absorbancia de clorofilina a distintas longitudes de onda.
 Fuente: Elaboración propia.

Por otra parte, se midió diariamente la extensión diametral de las muestras de hongos a las que se les aplicaron distintos tratamientos de terapia fotodinámica. El crecimiento de las muestras de hongos tratados con terapia fotodinámica fue comparado con muestras de control que no recibieron agentes fotosensibilizantes, sólo radiación solar. Los resultados se muestran en las gráficas 4 a 9 y en el anexo.

Fusarium sp.

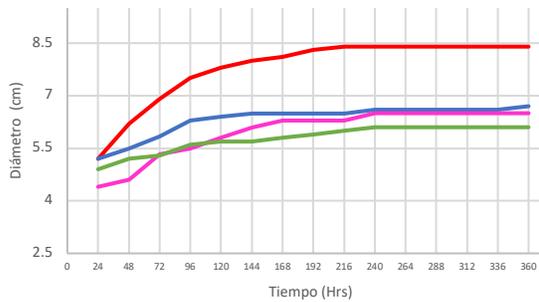


Gráfico 4. Crecimiento radial de *Fusarium sp.* tratado mediante terapia fotodinámica y azul de metileno (azul), rosa de Bengala (rosa) y clorofilina (verde), control (rojo).

H. Porium

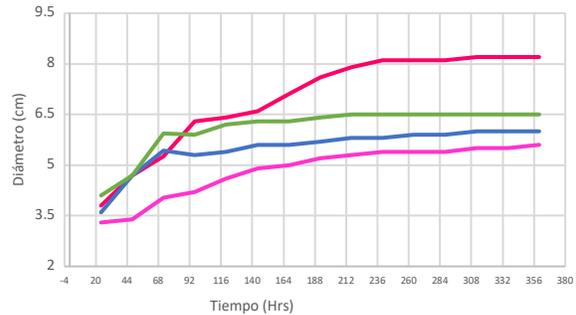


Gráfico 5. Crecimiento radial de *H. Porium* tratado mediante terapia fotodinámica y azul de metileno (azul), rosa de Bengala (rosa) y clorofilina (verde), control (rojo).

Colletotrichum sp.

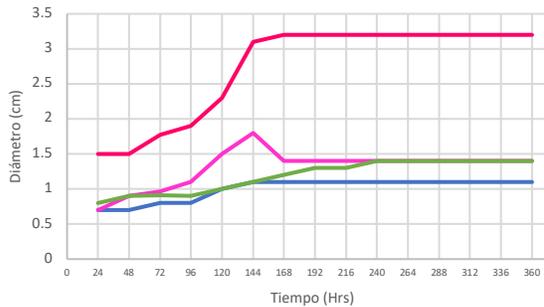


Gráfico 6. Crecimiento radial de *Colletotrichum sp.* tratado mediante terapia fotodinámica y azul de metileno (azul), rosa de Bengala (rosa) y clorofilina (verde), control (rojo).

Rizoctonia sp.

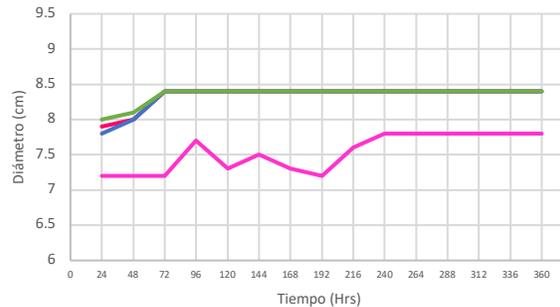


Gráfico 7. Crecimiento radial de *Rizoctonia sp.* tratado mediante terapia fotodinámica y azul de metileno (azul), rosa de Bengala (rosa) y clorofilina (verde), control (rojo).

Alternaria sp.

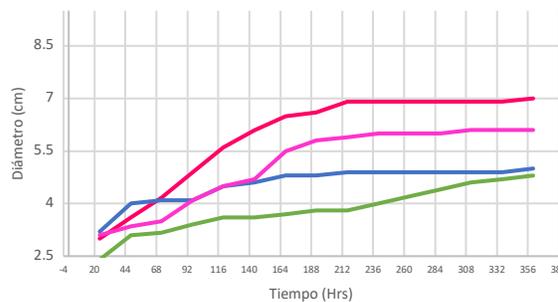


Gráfico 8. Crecimiento radial de *Alternaria sp.* tratado mediante terapia fotodinámica y azul de metileno (azul), rosa de Bengala (rosa) y clorofilina (verde), control (rojo).

Botrytis sp.

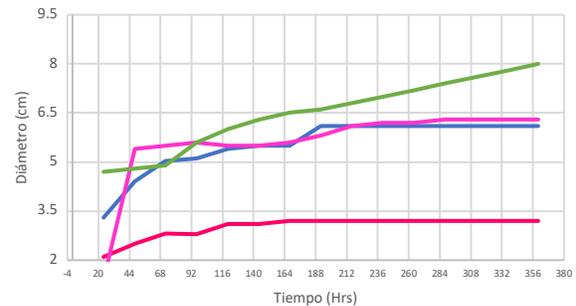


Gráfico 9. Crecimiento radial de *Botrytis sp.* tratado mediante terapia fotodinámica y azul de metileno (azul), rosa de Bengala (rosa) y clorofilina (verde), control (rojo).

5. Análisis de resultados

Con la información obtenida una vez transcurrido y finalizado el tiempo de observación y medición del diámetro todos los hongos se realizaron las gráficas mostradas en los resultados, esto con la finalidad de comparar el efecto de cada uno de los FS en cada variedad de hongo, mostrando que en la mayoría de los

hongos se obtuvo una respuesta positiva en cuanto a la inhibición de su crecimiento e incluso en ciertos casos la disminución del área abarcada por el hongo.

El rosa de Bengala tuvo mayor eficacia variedades de hongos tales como la *Rizoctonia* y el *H. Porium* en donde gracias a la aplicación de este FS se pudo retrasar su crecimiento e incluso inactivarlo. Mientras tanto la clorofilina también logró obtener buenos resultados en ciertas variedades de hongos como *Fusarium* y *Alternaria*. En este último caso el FS logró disminuir el área abarcada por el hongo y en los otros casos pudo inhibir el crecimiento. Y por último el azul de metileno obtuvo buenos resultados para la inhibición del crecimiento del hongo *Colletotrichum*. En general la eficiencia de los FS fue buena para combatir a los hongos, aunque hubo una excepción que fue el hongo *Botrytis* cuyo crecimiento no fue inhibido por ninguno de los FS empleados en este trabajo.

6. Conclusiones

Como se mencionó al inicio de este trabajo de investigación, la terapia fotodinámica antimicrobiana presenta una gran ventaja debido a su alta selectividad, dado que el efecto fotodinámico ataca a las células del agente contaminante sin extenderse significativamente a otras áreas. Por lo tanto, la implementación de este método para el control de hongos fitopatógenos puede ser una alternativa viable para combatir las plagas fúngicas que suelen atacar los principales cultivos agrícolas si se aplica el fotosensibilizante apropiado, con la ventaja de que las plantas no sufren daños durante o después de la aplicación del tratamiento de TFDa; además de ser una alternativa más amigable tanto con el ambiente, como con el cultivo ya que se reduce el uso de agentes químicos como los fungicidas al sustituirlos por sustancias como el azul de metileno, rosa de Bengala y clorofilina, que resultan ser más seguras y fáciles de manejar.

7. Anexo

En las figuras 10 a 12 se muestran algunos hongos tratados con terapia fotodinámica antimicrobiana empleando distintos fotosensibilizantes para evaluar su crecimiento.

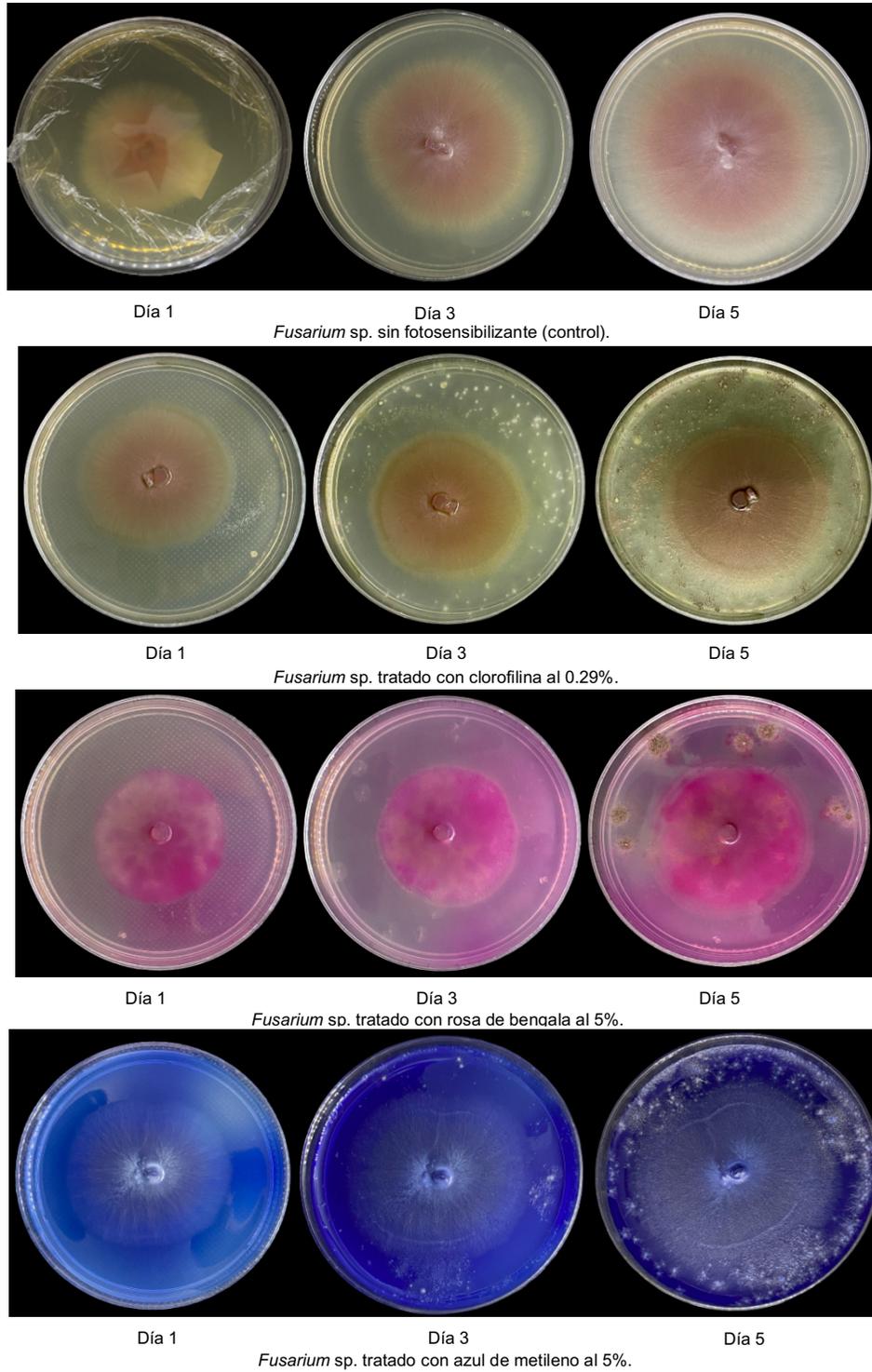
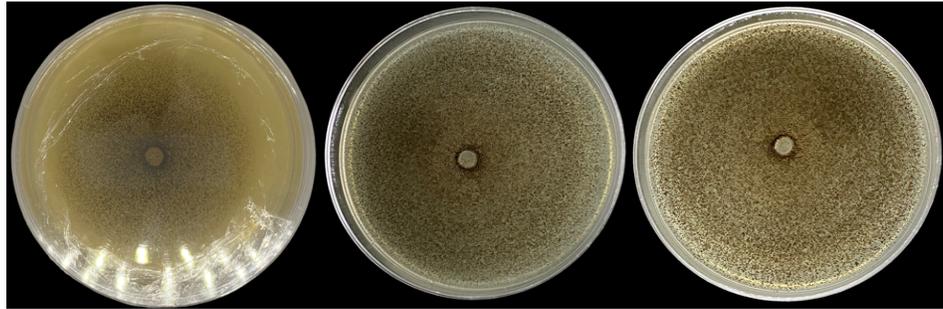


Figura 10. Crecimiento de muestras de *Fusarium sp.* tratadas mediante terapia fotodinámica antimicrobiana y distintos fotosensibilizantes. Fuente: Elaboración propia.



Día 1

Día 3

Día 5

Rizoctonia sp. sin fotosensibilizante (control).



Día 1

Día 3

Día 5

Rizoctonia sp. tratado con clorofilina al 0.29%.

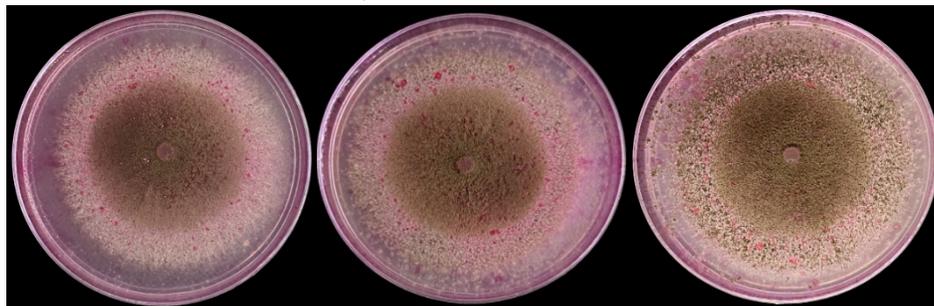


Día 1

Día 3

Día 5

Rizoctonia sp. tratado con azul de metileno al 5%.



Día 1

Día 3

Día 5



Día 1

Día 3

Día 5

Alternaria sp. sin fotosensibilizante (control).

Referencias

- Albarrán Vidal, V. (2021). *Terapia fotodinámica antimicrobiana: potencial estrategia frente a patógenos multirresistentes*. Obtenido de Repositori Universitat Jaume I: <http://hdl.handle.net/10234/195297>
- López-Chicón, P., Culiás, Ò., Nonell, S., & Agut, M. (2016). *Terapia fotodinámica antimicrobiana in vitro aplicada sobre Trichophyton mentagrophytes con nuevo azul de metileno como fotosensibilizador*. Obtenido de Actas Dermo-Sifiliográficas : <https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.06.004>
- M. Taylor, V., L. Cedeño, D., & M. Robledo, S. (2011). *Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea*. Obtenido de Infectio: [https://doi.org/10.1016/S0123-9392\(11\)70742-1](https://doi.org/10.1016/S0123-9392(11)70742-1)
- Miretti, M. (Mayo de 2020). *Zn-Ftalocianinas : síntesis, caracterización y vehiculización en vesículas liposomales. Aplicaciones como fotosensibilizadores en terapia fotodinámica*. Obtenido de Repositorio Digital UNC : <http://hdl.handle.net/11086/15155>
- Scharlau. (2022). *Scharlau Microbiología*. Obtenido de Ficha técnica: PDA (Potato Dextrose Agar) Acid: https://www.scharlab.com/docs/tds/descargarpdf.php?path=064-PF6029_TDS_ES.pdf&idid=ES&ref=064-PF6029
- Sen Salinas, D. A. (2021). *Efecto de la inactivación fotodinámica en la inhibición de biopelículas formadas por Candida spp.* Obtenido de Repositorio INAOE: <http://inaoe.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1009/2154>
- DGSV-CNRF. 2020. Pudrición de la raíz, Rizoctonia solani. Sader-Senasica. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha técnica. Tecámac, Estado de México, 10 p.
- DGSV-CNRF. 2020. Podredumbre de raíces por Fusarium spp (Hypocreales: Nectriaceae) en maíz. Sader-Senasica. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha técnica. Tecámac, Estado de México, 15 p.
- Rojo-Báez, Indira, Álvarez-Rodríguez, Brando, García-Estrada, Raymundo S., León-Félix, Josefina, Sañudo-Barajas, Adriana, & Allende-Molar, Raúl. (2017). Situación actual de Colletotrichums spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. Obtenido de: Revista mexicana de fitopatología, 35(3), 549-570.

Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A., & Bahador, A. (2018). Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser therapy*, 27(4), 293-302.
https://doi.org/10.5978/islsm.27_18-RA-01

Helminthosporiosis - BASF Agricultural Solutions España. (s. f.). Obtenido de:
<https://www.agro.basf.es/es/Servicios/Gu%C3%ADa-de-plagas/Enfermedades-f%C3%BAngicas/Enfermedad-hoja/Helminthosporiosis/>