



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN
CAMPUS TUXTEPEC

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Encapsulación de *Beauveria bassiana* en biomateriales a base de polímeros.

Presenta:

Ivonne Janeth Azamar Jiménez

Para obtener el grado

Maestra en Biotecnología

Director de Tesis

Dra. Jacqueline Capataz Tafur

Co-director de Tesis

Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México.

2018



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA

OFICIO	DEP/2018/MB/0125
ASUNTO	Revisión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oax., a 31 de agosto de 2018

C. Ivonne Janeth Azamar Jiménez
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

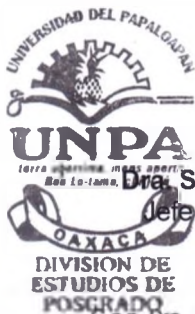
Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestría en Biotecnología estará integrado por los siguientes investigadores.

Dr. Mario Valera Zaragoza	UNPA	Presidente
Dr. Andrés Aguirre Cruz	UNPA	Vocal
Dra. Laura P. Ramírez Coutiño	UNPA	Secretario
Dr. Aurelio Ramírez Hernández	UNPA	1er Suplente
Dr. Francisco Javier Caro León	Universidad Estatal de Sonora	2º Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú



[Handwritten signature]
Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado

C.c.p. Dra. Jacqueline Capataz Tafur – Director de tesis.
C.c.p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C.c.p. Archivo

[Handwritten signature]
M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico

Vo. Bo.



**VICE-RECTORIA
ACADEMICA**

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2018/065
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 30 de agosto de 2018

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestro(a) en Biotecnología de **C. Ivonne Janeth Azamar Jiménez**, matrícula 15140001, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Encapsulación de *Beauveria bassiana* en materiales a base de polímeros quitinosos**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

De antemano agradezco su atención, sin más que agregar, quedo a sus órdenes.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chí jí jú

Dra. Sandra T. del Moral Ventura
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. C. Ivonne Janeth Azamar Jiménez
C.c.p. Archivo

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

RECONOCIMIENTO

Esta tesis fue realizada en los Laboratorios de Bioprocesos y Cultivo de Células Vegetales de la Universidad del Papaloapan, Campus Tuxtepec y en los Laboratorios de Quitosana y Procesos del grupo en Investigación de Biopolímeros del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. (CIAD), Sede Hermosillo, Sonora, bajo la dirección de la Dra. Jacqueline Capataz Tafur y la Dra. Maricarmen Thalía Recillas Mota. Se contó con la valiosa asesoría de la Dra. Laura Patricia Ramírez Coutiño durante toda la investigación.

Asimismo, se contó con la beca CONACyT con número de registro 711162 perteneciente al programa de Maestría en Biotecnología con registro PNPC 003131, Beca Mixta de movilidad y Beca de Mujeres Indígenas.

También se reconoce el apoyo brindado por los profesores: Dr. Oscar Núñez Gaona por la donación de su cepa y a la Dra. Ana Karin Navarro Martínez por los equipos e instrumentos proporcionados durante la elaboración de esta tesis, y a la técnico Q.F.B Leticia Saldaña por su apoyo y consejos durante todo este proyecto.

Se agradece al apoyo técnico e instrumental del grupo de Biopolímeros, Dr. Jaime Lizardi Mendoza, M.C. Karla Guadalupe Martínez Robinson, Q.B. Alma Consuelo Campa Mada, M.C. Luisa Lorena Francisca Silva Gutiérrez, M. C. Alfonso Martínez Borraz.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Jacqueline Capataz por aceptar ser mi directora y regalarme su valioso tiempo hasta el final de este trabajo, por preocuparse por mí y darme valiosos consejos, por creerme y apoyarme sin dudar de mi esfuerzo; por proporcionarme los materiales necesarios para concluir este proyecto y estar al tanto de mí.

A la Dra. Maricarmen Recillas por el apoyo e interés constante y continuo hasta al final de este trabajo, por las atenciones que siempre mostró, por motivarme a concluir esta etapa tan importante, y no ver a Sofía como una limitación, sino más bien como un motivo, jamás lo olvidare ¡GRACIAS!.

A la Dra. Laura Ramírez por darme la confianza y la oportunidad de desarrollar su proyecto de investigación; por sus consejos, enseñanzas y el tiempo que en algún momento me brindó, por esa magia que siempre transmite al enseñar, por enseñarme a cuestionar, a ver más allá de lo evidente y a ser detallista con todo; por su actitud siempre tan positiva y amable, por su comprensión y por todos los buenos momentos que en su momento vivimos y que nunca olvidaré.

Al Dr. Oscar Núñez por el apoyo incondicional que siempre me brindó, no era perfecto pero siempre lo admiré, por confiar en mí, no le fallé a propósito la vida dio vueltas y resultó así. Por enseñarme muchas de las cosas que hoy me hacen fuerte, nuestras vidas han tomado rumbos distintos pero sus enseñanzas y el agradecimiento que siento hacia usted nunca cambiará.

A Osiris, Teresa, Carla, Adriana mis mejores amigas, por estar siempre ahí en todos los momentos cuando más las he necesitado, por preocuparse por mí, por escucharme y apoyarme incondicionalmente siempre, ¡las amo!. Por quererme tanto serán siempre para mí ¡las mejores amigas del mundo!

A los profesores de la UNPA por enseñarme y formarme durante estos 7 años. Muchos de ustedes son ejemplares, admirables, personas maravillosas, no permitan que sus diferencias los destruyan, tolérense y sigan creciendo, aún tienen mucho futuro que ofrecerle a la

universidad y a sus estudiantes, sigan en esa lucha, ustedes son forjadores del futuro, y eso, es una gran responsabilidad.

A la M.E. Yesenia Barrientos Arenal por siempre ser tan amable, tan sonriente y apoyarme con tanta cordialidad en todos mis trámites.

A todos los chicos del laboratorio de bioprocesos: por las pláticas, chistes, bromas, desveladas y demás cosas; con ustedes los días eran más amenos. Gracias Daniel por todos los días que dormiste en la UNPA en nombre de la ciencia.

Al universo, la vida y el todo, en una palabra, Dios. Que ha conspirado cada día, para que las cuerdas vibren, los cabos se unan y las cosas buenas lleguen. Por situar a las personas correctas en los tiempos indicados, por darme personas que me quieren mucho y en su amor me han apoyado ilimitadamente. ¡GRACIAS!; la vida no me alcanzaría para demostrar mi gratitud.

DEDICATORIA

A la Universidad del Papaloapan, UNPA, este material es para ti; representa el camino de mi formación, mi fortaleza, mis conocimientos y habilidades que hoy me son de gran utilidad para la vida. Porque a pesar de ser una escuela casi anónima, has buscado la forma de crecer, de hacer resonar tu nombre. Llevaré tu nombre en alto a cada lugar donde vaya.

A mi familia, mi nueva y vieja familia, son ustedes para mí, mi gran motivo, y mi más fuerte deseo. Es por ustedes y para ustedes. Siempre vivirán en mí, su apoyo y su amor me han llevado lejos. ¡Por ustedes!

A Hipólito, mi eterno y único amor. Mi amigo, mi compañero, mi todo, y ahora, mi familia. Por apoyarme incondicionalmente cada día, tus palabras son siempre mi luz, por confiar en mí incondicionalmente, creer en mí e impulsarme a que haga más y mejores cosas. Por amarme cada día, ¡Gracias!

A Sofía, mi más grande tesoro y mi mejor creación; la niña de mis ojos y de mi corazón, has sido mi motor y mi razón todo este tiempo. Mi inspiración, eres y serás siempre tú. La expresión viva del amor.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN DE ESTE TRABAJO

Azamar Jiménez, I.J., Loera-Corral, O., Navarro-Martínez, AK, Valera-Zaragoza, M, Aguirre-Cruz, A., Ramírez-Coutiño, LP, Recillas-Mota, MT. *Biopolímeros como vehículos transportadores de hongos entomopatógenos para el control biológico de plagas*. Congreso Internacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Hermosillo, Sonora, México del 14-18 Noviembre del 2016.

Azamar-Jiménez, I.J., Ramírez-Coutiño, L.P., Lizardi-Mendoza, J., Recillas-Mota, M. T. *Biopolímeros como matriz de inmovilización de hongos entomopatógenos*. Reunión Universitaria de Investigación en Materiales. Universidad Autónoma de Sonora, Hermosillo, Sonora, México del 30 de Noviembre al 2 de Diciembre de 2017

RESUMEN

En este trabajo se realizó la encapsulación celular de *Beauveria bassiana*, adicionando chapulín molido como sustrato, para adaptar el metabolismo enzimático del microorganismo a degradar la quitina del insecto específicamente con la finalidad de mantener la densidad conidial del hongo durante un mayor tiempo y proteger la integridad del mismo ante diversas condiciones ambientales. Se evaluaron dos métodos de encapsulación celular: gelificación inotrópica (GI) con quitosano a dos valores de pH (1.5 y 4.0) y formación de complejos polielectrólitos (CPE) con alginato y quitosano. El material para encapsular fue caracterizado mediante FTIR, peso molecular, y el grado de desacetilación para el quitosano. Las cápsulas formadas se caracterizaron mediante porosidad, FTIR, morfología, hinchamiento, absorción de vapor de agua y se les realizó pruebas de viabilidad, conteo de conidios y pruebas enzimáticas relacionadas con la patogenicidad de los hongos entomopatógenos. En todos los casos se obtuvieron cápsulas estables durante la manipulación. Los resultados muestran que a pH 1.5 la formación de las cápsulas afecta la viabilidad del conidio, como consecuencia, las cápsulas de GI pH 4.0 y CPE fueron las únicas que mostraron viabilidad y propiedades higroscópicas, capaces de absorber el vapor de agua del ambiente, dando la posibilidad de mantener la interacción con el ambiente y propiciar el buen crecimiento de *B. bassiana*. La viabilidad del hongo disminuyó con el tiempo, mientras que la concentración de conidios y la germinación de los mismos aumentó significativamente. Reforzando la hipótesis de que el sustrato de chapulín mantiene activo el metabolismo del hongo, siendo este un factor relacionado con la calidad y virulencia de los conidios. En cuanto a la producción enzimática se observó que el hongo tiene la capacidad de producir quitosanasas para degradar la cubierta de la cápsula hecha de quitosano. Estos resultados muestran que la encapsulación de *B. bassiana* con biopolímeros, permite mantener la viabilidad del conidio, aumentar la concentración de conidios después de dos meses de almacenamiento.

ABSTRACT

In this work the cellular encapsulation of *Beauveria bassiana* was performed, adding ground grasshopper as substrate, to adapt the enzymatic metabolism of the microorganism to degrade the chitin of the insect specifically in order to maintain the conidial density of the fungus for a longer time and protect the integrity of the same before diverse environmental conditions. Two methods of cell encapsulation were evaluated: isotropic gelation (IG) with chitosan at two pH values (1.5 and 4.0) and formation of polyelectrolyte complexes (PEC) with alginate and chitosan. The material to be encapsulated was characterized by FTIR, molecular weight, and the degree of deacetylation for chitosan. The capsules formed were characterized by porosity, FTIR, morphology, swelling, absorption of water vapor and were carried out viability tests, conidia count and enzymatic tests related to the pathogenicity of the entomopathogenic fungi. In all cases, stable capsules were obtained during handling. The results show that at pH 1.5 the formation of the capsules affects the viability of the conidium, as a consequence, the capsules of IG pH 4.0 and PEC were the only ones that showed viability and hygroscopic properties, capable of absorbing water vapor from the environment, giving the possibility of maintaining the interaction with the environment and promoting the good growth of *B. bassiana*. The viability of the fungus decreased with time, while the concentration of conidia and their germination increased significantly. Reinforcing the hypothesis that the substratum of grasshopper maintains active the metabolism of the fungus, being this a factor related to the quality and virulence of the conidia. Regarding enzymatic production, it was observed that the fungus has the ability to produce chitosanases to degrade the capsule shell made of chitosan. These results show that the encapsulation of *B. bassiana* with biopolymers, allows to maintain the viability of the conidium, increasing the concentration of conidia after two months of storage.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
TABLA DE CONTENIDO.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ABREVIATURAS.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES	2
2.1. MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS Y CONTROL BIOLÓGICO	2
2.2. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (HEP).....	3
2.3 <i>Beauveria bassiana</i>	11
2.3.1. Metabolitos secundarios de <i>Beauveria bassiana</i>	12
2.3.2. Producción de conidios (fermentación bifásica) y enzimas en <i>Beauveria bassiana</i>	13
2.4 FORMULADOS BIOLÓGICOS	15
2.4.1 Control de calidad de formulados biológicos con HEP	16
2.5 INMOVILIZACIÓN O ENCAPSULAMIENTO CELULAR.....	17
2.5.1 Materiales para encapsulación	17
2.5.1.1 Quitosano	18
2.5.1.2 Alginato.....	20
2.5.2 Morfología de las cápsulas	21
2.5.3 Métodos de inmovilización de células.....	22
2.5.3.1 Difusión de esferas (<i>Bead entrapment</i>)	22
2.5.3.2 Encapsulación directa.....	23
2.5.3.2.1 Separación de fases	23
2.5.3.2.2 Secado por aspersión.....	23
2.5.3.2.4 Coacervación.....	24
2.5.3.2.5 Formación de complejos polielectrólitos (FCPE)	25
2.6 Estudios de inmovilización y encapsulación de <i>Beauveria bassiana</i> ...	25
3. JUSTIFICACIÓN	28

3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVOS.....	30
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
5.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	31
5.2 MATERIAL BIOLÓGICO	32
5.3 FERMENTACIÓN BIFÁSICA PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS AÉREOS	32
5.3.1. Fermentación líquida	32
5.3.2. Fermentación sólida	33
5.3.2.1 Preparación de los contenedores para la fermentación sólida	33
5.3.2.2 Inoculación de los contenedores.....	33
5.3.2.3 Cosecha.....	34
5.3.2.4 Viabilidad	34
5.4 PURIFICACIÓN DE POLÍMEROS.....	35
5.4.1 Quitosano	35
5.4.2 Alginato.....	36
5.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LOS POLÍMEROS.....	36
5.5.1 Quitosano	36
5.5.1.1 Grado de acetilación (valoración potenciométrica).....	36
5.5.1.2 Grado de acetilación (valoración conductimétrica).....	37
5.5.1.3 Peso molecular viscosimétrico promedio	38
5.5.2 Alginato	39
5.5.2.1 Relación grupos β -D-manurónico y α -L-gulurónico (M/G) (espectroscopia infrarroja).....	39
5.5.2.2 Peso molecular viscosimétrico promedio.....	40
5.6 INMOVILIZACIÓN DE CONIDIOS.....	40
5.7 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS CÁPSULAS.....	42
5.7.1 Evaluación del tamaño y morfología de las microcápsulas.....	42
5.7.2 Hinchamiento por gravimetría (<i>W</i>).....	42

5.7.3	Absorción de vapor	42
5.7.4	Medición de la porosidad de las cápsulas.	43
5.8	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS CÁPSULAS	43
5.8.1	Comportamiento y biodegradación de las cápsulas <i>in vitro</i>	43
5.8.2	Estudios de estabilidad	43
5.8.3	Análisis químicos de los extractos enzimáticos conidios y encapsulado	44
5.8.3.1	Obtención de los extractos	44
5.8.3.1.1	Determinación de proteasas alcalinas	44
5.8.3.1.2	Determinación de actividad <i>N</i> -acetilhexosaminidasa (NHAsas)..	45
5.8.3.1.3	Determinación de actividad lipasa	45
5.8.3.1.4	Determinación de proteína soluble extracelular	45
5.8.3.1.5	Determinación de azúcares reductores	46
5.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
6.1	AGENTE CONTROLADOR	47
6.2	CARACTERÍSTICAS DE LOS POLÍMEROS DE PARTIDA	47
6.2.1	Quitano.	47
6.2.2	Alginato.....	50
6.3	CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS CÁPSULAS.....	50
6.3.1	Morfología de las cápsulas	50
6.3.2	Tamaño de las cápsulas	54
6.3.3	Identificación química de los compuestos mediante FTIR	57
6.3.4	Porosidad.....	59
6.3.5	Hinchamiento.....	63
6.3.6	Absorción de vapor	66
6.4	CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS CÁPSULAS	69
6.4.1	Comportamiento y biodegradación de las cápsulas <i>in vitro</i>	69
6.4.2	Estudios de estabilidad (Viabilidad)	75
6.5	CRECIMIENTO DE <i>Beauveria bassiana</i> DENTRO DE LAS CÁPSULAS.....	80
6.5.1	Conteo conidial	80

6.6 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE <i>B. bassiana</i> DENTRO DE LAS CÁPSULAS	84
7. CONCLUSIONES	90
8. REFERENCIAS	91
9. ANEXOS.....	103
9.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN.....	103
9.2 CONTEO CONIDIAL	104
9.3 ENZIMÁTICOS DE CÁPSULAS	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del desarrollo de un hongo entomopatígeno	5
Figura 2. Estructura química del quitosano, formada por unidades <i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glucosamina y <i>D</i> -glucosamina unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$	18
Figura 3. Estructura química del alginato, monómeros constituyentes y formas estructurales dependiendo de su secuencia (Miller, 1996).	20
Figura 4. Morfología de los diferentes tipos de cápsulas que se han elaborado. Tomado de (Vemmer & Patel, 2013).....	22
Figura 5. Estrategia metodológica general.	31
Figura 6. Microscopía de <i>Beauveria bassiana</i> . a,b) Conidios visto con campo claro a 10X. c) Conidios vistos en campo oscuro a 10X, los conidios suelen presentar un ligero brillo.	47
Figura 7. Curvas de titulación típicas para el quitosano mediante conductimetría (■---■---■---■) y potenciometría (■---■---■---■). Líneas que muestran el cambio en la pendiente de la gráfica de conductimetría (.....) y 1ra derivada para la gráfica de potenciometría (.....).	49
Figura 8. Morfología de cápsulas de quitosano-TPP, observadas mediante microscopía óptica, a 4X. Esferas húmedas: a) Qv, b) Q+C, c) Q+C+Ch; esferas secas mediante liofilización: d) Qv, e) Q+C, f) Q+C+Ch.	51
Figura 9. Morfología de cápsulas de GI microscopía óptica, 4X. Esferas liofilizadas a) Qv; pH 1.5, b) Qv; pH 4.....	53
Figura 10. Morfología de cápsulas de alginato mediante microscopía óptica, 4X. Esferas húmedas: a) Av, b) A+C, c) A+C+Ch; esferas secas mediante liofilización: d) Av, e) A+C, f) A+C+Ch.....	54
Figura 11. Dispersión del tamaño de las cápsulas de GI. Tratamientos: ■Qv, ■Q+C, ■Q+C+Ch.	55
Figura 12. Dispersión del tamaño de las cápsulas de CPE. ■Qv, ■Q+C, ■Q+C+Ch.....	56
Figura 13. Espectro FT-IR de los polímeros, Quit -) quitosano, así como de las cápsulas vacías, Qv -).....	58

Figura 14. Espectro FT-IR de los polímeros, espectro del alginato (Alg -), quitosano (Quit -) y las cápsulas vacías (Av -) de CPE.....	59
Figura 15. Isotermas de adsorción de N ₂ de las cápsulas a) Qv, b) Av, c) Q+C, d) A+C, e) Q+C+Ch y f) A+C+Ch.	60
Figura 16. Valores experimentales de hinchamiento <i>W</i> de muestras de cápsulas preparadas por a) GI pH 1.5 y b) CPE pH 4, en agua destilada a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).	64
Figura 17. Valores experimentales de hinchamiento <i>W</i> de muestras de cápsulas preparadas por a) GI y b) CPE a pH 4, en ambiente saturado en vapor de agua a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).	65
Figura 18. Morfología de cápsulas de quitosano y alginato mediante microscopia óptica, 4X. Esferas antes de iniciar la prueba de humedad: a) GI, c) FCPE; esferas al termino del tiempo de hinchamiento (180 min.): b) GI, d) FCPE.	66
Figura 19. Valores experimentales adsorción de vapor <i>W</i> de muestras de cápsulas preparadas por a) GI, pH 1.5 y b) CPE, pH 4 en ambiente saturado de humedad a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).	68
Figura 20. Absorción de vapor de esferas <i>W</i> cápsulas preparadas por a) GI, pH 4 y b) CPE, pH 4 en ambiente saturado en vapor de agua a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).	68
Figura 21. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas <i>in vitro</i> . Parte superior: Qv t=0 días (a), 23 días (b) y 31 días (c). Parte inferior se muestran las cápsulas hechas mediante CPE al inicio de la observación t=0 días (d), a los 7 días (e) y a los 31 días (f).....	70
Figura 22. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas <i>in vitro</i> . Cápsulas Q+C, t=0 (a), a los 4 días (b), 13 días (c), y 15 días (d). Flechas negras y círculo amarillo: conidios expulsados, flechas verdes: conidios germinando; flechas rojas: cuarteadura en cápsula.	71
Figura 23. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas <i>in vitro</i> . Cápsulas Q+C+Ch hechas mediante GI. Al inicio de la observación al t=0 días (a), 4 días (b), 13 días (c), 19 días (d), y 31 días (e).	72

Figura 24. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas <i>in vitro</i> . Cápsulas A+C hechas mediante FCPE. Al inicio de la observación, (a), día 3 (b), día 5 (c).	73
Figura 25. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas <i>in vitro</i> . Cápsulas A+C+Ch hechas mediante FCPE. Parte superior izquierda, tiempo cero, al inicio de la observación, (a), día 4 (b),13días (c) ,15 días (d), y 23 días de observación (e y f).	73
Figura 26. Comportamiento y crecimiento del hongo, para todos los tratamientos de GI y CPE, al someterlo a un medio de cultivo sólido. (a) 3 días, (b) 6 días, (c) 8 días.	75
Figura 27. Concentración de conidios por miligramo de cápsula durante el almacenamiento, con variaciones de tiempo (0,3 y 6 meses) y temperatura: TA (temperatura ambiente 25°C) y TF (temperatura fría, 4°C). ■ Mes 0 (TA), ■ Mes 3 (TA), ■ Mes 3 (TF), ■ Mes 6 (TA), ■ Mes 6 (TF).	80
Figura 28. Concentración de conidios por miligramo de cápsula durante el almacenamiento, con variaciones de tiempo (0, y 1 mes) y temperatura: TA (temperatura ambiente 25°C) y TF (temperatura fría, 4°C). ■ Mes 0 (TA), ■ Mes 1 (TA), ■ Mes 1 (TF), ■ Mes 2 (TA), ■ Mes 2 (TF).	83
Figura 29. Actividades enzimáticas por miligramo de cápsula en los diferentes métodos de encapsulación (GI, pH 1.5 y FCPE) y en diferentes periodos de almacenamiento (0 y 6 meses) con diferentes temperaturas (TA y TF). ■ Mes 0, (TA), ■ Mes 6 (TA), ■ Mes 6 (TF).	85
Figura 30. Actividades enzimáticas por miligramo de cápsula en los diferentes métodos de encapsulación (GI pH 4 y FCPE) y en diferentes periodos de almacenamiento (0 y 1 mes) con diferentes temperaturas (TA y TF). ◆ Mes 0 (TA) ■ Mes 1 (TA) ▲ Mes 1 (TF), × Mes 2 (TA), × Mes 2 (TF).	87
Figura 31. Curva estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) por el método de micro ensayo de Bradford.	103
Figura 32. Curva estándar de reductores por el método de Miller (1959) empleando <i>N</i> -acetilglucosamina (NAG) como estándar.	103
Figura 33. Curva estándar de <i>N</i> -acetilhexosaminidasa, empleando una solución madre de <i>p</i> -nitrofenol a una concentración de 100µg/mL.	104

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Máxima producción enzimática en <i>Beauveria bassiana</i> con diferentes concentraciones de chapulín como inductor. Con una concentración de glucosa de 40 g/L para todos los tratamientos.	15
Tabla 2. Células inmovilizadas en matrices poliméricas	27
Tabla 3. Condiciones de encapsulación utilizadas para la elaboración de cápsulas de Quitosano-TPP (GI).....	41
Tabla 4. Condiciones de encapsulación utilizadas para la elaboración de cápsulas de complejos polielectrólitos (CPE).....	41
Tabla 5. Parámetros de caracterización inicial del quitosano, material usado para la encapsulación mediante GI.....	48
Tabla 6. Parámetros de caracterización inicial del alginato, material usado para la encapsulación mediante FCPE.	50
Tabla 7. Tamaño de cápsulas secas por liofilización de las cápsulas hechas mediante gelificación ionotrópica (GI) y formación de complejos polielectrólitos (FCPE) en función del valor de pH.....	57
Tabla 8. Área superficial específica (S_{BET}) y tamaño de poro de la GI (pH 1.5 y 4) y FCPE (pH 4).....	62
Tabla 9. Valores de W_{240} , Medición a 25 °C en agua destilada.	64
Tabla 10. Valores de W_{240} , para GI, pH 1.5 y 4. Medición a 25 °C en agua MilliQ.	66
Tabla 11. Viabilidad de conidios en diferentes medios. El inóculo con almacenamiento de 1 año (viabilidad terminada a los 8 días) y el inóculo reactivado (viabilidad terminada a los 2 días).	75
Tabla 12. Porcentaje de viabilidad de <i>Beauveria bassiana</i> como inóculo (Mes 0, viabilidad t=2días) y dentro de las cápsulas recién preparadas sin liofilizar y liofilizadas a t=0 (recién preparadas) y 1 y 2 meses con pH 4.	77
Tabla 13. Conidios por miligramo de inóculo [Con/mg], utilizado para hacer las cápsulas en diferentes periodos de almacenamiento.....	104

Tabla 14. Conidios por miligramo de cápsula [conidios/mg], contenidos en los diferentes tratamientos con un periodo de almacenamiento de 3 y 6 meses.....	104
Tabla 15. Conidios por miligramo de cápsula [conidios/mg], contenidos en los diferentes tratamientos con un periodo de almacenamiento de 1 y 2 meses.....	105
Tabla 16. Proteína soluble [$\mu\text{g}/\text{mL}$] por miligramo de cápsula con tres y seis meses de almacenamiento.....	105
Tabla 17. Actividad quitinolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula con tres y seis meses de almacenamiento.....	105
Tabla 18. Actividad lipídica [mU/mL] por miligramo de cápsula con seis meses de almacenamiento.....	106
Tabla 19. Actividad proteolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula con seis meses de almacenamiento.....	106
Tabla 20. Azúcares reductores [$\mu\text{g}/\text{mL}$] por miligramo de cápsula con seis meses de almacenamiento.....	106
Tabla 21. Proteína soluble [$\mu\text{g}/\text{mL}$] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.....	107
Tabla 22. Actividad quitinolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula contenida en las cápsulas durante dos meses de almacenamiento.....	107
Tabla 23. Actividad lipídica [mU/mL] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.....	107
Tabla 24. Actividad proteolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.....	108
Tabla 25. Azúcares reductores [$\mu\text{g}/\text{mL}$] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.....	108

ABREVIATURAS

+C= Conidios

+C+CH= Conidios + chapulín

A=Alginato

AC=agente controlador = conidios

ACB= agente de control biológico

AE= Actividad específica

Bb. 885.2 = Cepa de *Beauveria bassiana* 885.2

Cápsulas= esferas, perlas

CB = control biológico

CPE=Complejo polielectrólito

DA= Grado de acetilación

DD= Grado de desacetilación

EPA = Agencia de Protección Ambiental de EE.UU.

FB = Formulado biológico

FCPE= Formación de complejos polielectrólitos

FDA =Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU.

FML= Fermentación en medio líquido

FMS= Fermentación en medio sólido

FT-IR= Espectroscopía infrarroja

G= Gulurónico

GI= Gelificación ionotrópica

HEP= Hongos entomopatógenos

M= Manurónico

MIP= Manejo integrado de plagas

MO= microorganismo

NHasas= Actividad hexosaminidasa

Q=Quitosano

SGA= Caldo Sabouraud-glucosa agar al 4% (p/v)

TPP= Tripolifosfato de sodio

UFC = Unidad formadora de colonias [N° de colonia/tiempo]

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos entomopatógenos (HEP) son parte de los formulados biológicos de mayor importancia en el control microbiano de insectos plaga (Ahmad *et al.*, 2011). Un formulado biológico se compone de un agente de control (conidios de HEP), junto con una serie de compuestos inertes que pueden ser líquidos o en polvo y que ayudan al agente controlador a sobrevivir. Idealmente debe ser estable, de fácil aplicación y de bajo costo (Alean *et al.*, 2004).

Una de las especies más importantes en los HEP es *Beauveria bassiana*, debido al alto potencial para infectar diversas plagas, fácilmente puede ser cultivada en grandes cantidades y su aislamiento no es difícil (Echeverría-Beirute, 2006). En los últimos años las investigaciones se han enfocado principalmente en la selección de cepas, la producción en masa y la experimentación en campo, sin embargo, la investigación enfocada a formulados biológicos más eficientes es mínima (Echeverría-Beirute, 2006; Lewis & Papavizas, 1987). Dentro de las propuestas más novedosas para el mejoramiento de las formulaciones biológicas se encuentra el proceso de encapsulación o inmovilización celular. Consiste en contener a un microorganismo dentro de una matriz para protegerlo de las duras condiciones ambientales como la variación de pH en el suelo, los cambios de temperatura, sustancias químicas que puedan inhibir su crecimiento del microorganismo, etc. (Galazzo & Bailey, 1990; Gerding-González *et al.*, 2007a; Knudsen *et al.*, 1990; Park & Chang, 2000; R. M. Pereira & Roberts, 1991)

El objetivo de este trabajo fue encapsular *Beauveria bassiana*, a base de biopolímeros de quitosano y alginato, y al mismo tiempo introducir un sustrato quitinoso asimilable que le sirva para mantener activo su metabolismo para conservar de esta forma su viabilidad.

2. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

2.1. MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS Y CONTROL BIOLÓGICO

Las plagas pueden ser controladas eficazmente aplicando la estrategia del manejo integrado de plagas (MIP), que evalúa a la plaga como sistema (sistema ecológico) y como poblaciones. Mediante el MIP se controlan y disminuyen las poblaciones de plagas. Con la utilización de diferentes métodos que buscan reducir los daños, gestionando e integrando estrategias como la realización de seguimientos periódicos de las plagas y sus enemigos naturales (Pretty & Bharucha, 2015).

Dentro de los métodos de apoyo del MIP se encuentra el Control Biológico (CB). Este método consiste en la regulación del número de plantas y animales por medio de la aplicación de controladores vivos como insectos que son enemigos naturales de las plagas como: escarabajo colorado de la papa (*Leptinotarsa decemlineata* Say), mosca común (*Musca domestica* Linnaeus), picudos (*Anthonomus* sp. Germar, *Cosmopolites* sp. Chevrolat, *Metamasius* sp. Linnaeus, *Rhynchophorus* sp.), saltamontes verde (*Turpilia opaca* Brunn), los trips del melón (*Thrips palmi* Karny), gusano soldado o cortador (*Mythimna unipunctata* Haworth), gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda* Smith), entre otros (Alves et al., 2002; Coates et al., 2002). Estos controladores pueden ser avispas parásitas, moscas, agentes patógenos: bacterias, virus, nematodos y hongos (Khachatourians, 1986; Pretty & Bharucha, 2015; Shah & Pell, 2003), así como toxinas y enzimas que participan en el proceso infeccioso (Xiao et al., 2012). Todos estos métodos de control generan una reducción en el uso de pesticidas sintéticos, mejorando la sostenibilidad del cultivo y ayudando a reducir los costes para el agricultor.

Los hongos entomopatógenos coexisten en la naturaleza, en la parte baja de los cultivos, en el estiércol, en el suelo, en las plantas, etc., creciendo mejor en lugares frescos, húmedos y con poca exposición al sol. Los HEP son de

importancia en el control biológico de insectos plagas debido a que a muchos de ellos pueden causar enfermedades e infecciones letales, cualidades que permiten regular las poblaciones de insectos en la naturaleza mediante epizootias. Se conocen aproximadamente 1000 especies de HEP, cuyo proceso infectivo consta de tres pasos: adhesión y germinación, diferenciación y penetración. Cada paso está influenciado por una serie de factores internos y externos, que en última instancia determinan la virulencia. Entre las características que contribuyen a la virulencia, se encuentra la capacidad de producir toxinas y enzimas para luchar contra las defensas del huésped. Por ende los HEP son específicos, permitiéndoles disminuir una plaga sin dañar otras especies, incluyendo insectos benéficos (Shah *et al.* 2007).

Entre las causas de las grandes pérdidas de las cosechas mundiales se encuentran los patógenos, malas hierbas, e invertebrados. Las plagas causan incidencias en la seguridad alimentaria mundial; lo que con lleva a la disminución del alimento provocando a su vez la alza de los precios y el aumento de la pobreza. La magnitud de las pérdidas varía según el contexto y el alcance. El principal método para el control de plagas han sido los insecticidas químicos; los cuales han causado daños al suelo, a los cultivos y a las personas. Por lo que se han buscado métodos alternativos que reduzcan el daño de plagas, evitando al mismo tiempo los altos costos y resultados negativos asociados con los pesticidas sintéticos.

2.2. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS (HEP)

Los hongos entomopatógenos se encuentran en las divisiones Zygomycota, Ascomycota y Deuteromycota, Chytridiomycota y Oomycota (Samson *et al.*, 2013). Las infecciones fúngicas se producen en artrópodos. Entre los géneros de hongos más usados para el control biológico se encuentran: *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*,

Hymenostilbe, *Paecilomyces*, *Verticillium*, *Metarhizium* y *Beauveria* (Shah & Pell, 2003), los últimos dos son los más usados para el control biológico de plagas.

2.2.1 Mecanismo de infección de los HEP

Para poder proliferar, los HEP sincronizan sus ciclos de vida con las etapas del insecto huésped y las condiciones ambientales. Dependiendo la especie y la cepa puede variar la gama de insectos huéspedes, los niveles de infección, las tasas de germinación y los óptimos de temperatura para su crecimiento. Otros HEP son oportunistas e infectan órdenes de insectos mediante la producción de toxinas y enzimas que producen en respuesta a la defensa del insecto (Samson *et al.*, 2013).

Las esporas o conidios fúngicos son generalmente responsables de la infección y se dispersan en todo el entorno en el que los anfitriones de insectos están presentes. A la muerte del insecto huésped, el hongo emerge desde el hospedero muerto y la esporulación o conidiogénesis se produce en el exterior del cadáver. También se puede producir internamente cuando la humedad del ambiente no es la propicia para la esporulación externa (Shah & Pell, 2003).

Los HEP infectan por contacto, penetrando directamente la cutícula del insecto, a diferencia de otros agentes, como bacterias o virus que requieren ser ingeridos por el huésped (Montesinos-Matías, 2009). Actualmente se sabe que la patogénesis en los insectos ocurre de manera progresiva, generalmente las fases en que se desarrolla son: adhesión, germinación de conidios, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, multiplicación del hongo (García *et al.*, 2008), producción de toxinas, muerte del insecto, colonización, producción de micelio hacia el exterior, esporulación y diseminación del hongo (Monzón, 2001).

El desarrollo del proceso de infección en el insecto esta dividido en tres grandes fases: (1) adhesión y germinación de la espora en la cutícula del insecto, (2)

penetración en el hemocele y (3) desarrollo del hongo, que generalmente resulta en la muerte del insecto, que involucran 12 pasos (Figura 1).

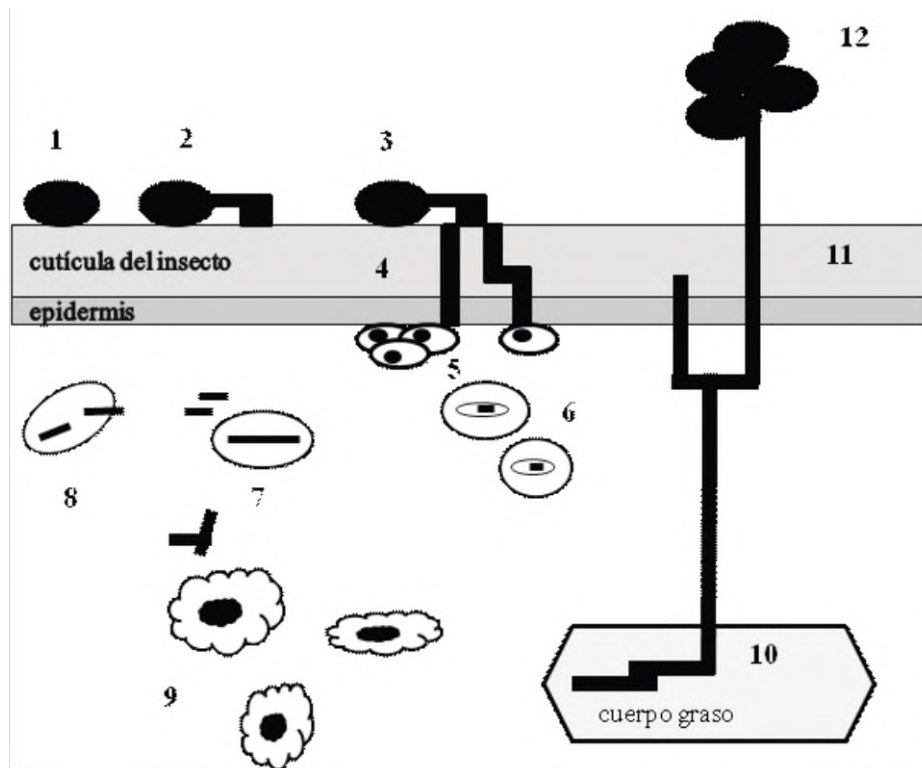


Figura 1. Esquema del desarrollo de un hongo entomopatógeno. 1. Adhesión de la espora a la cutícula del insecto, 2. Germinación y formación del apresorio, 3. Penetración de la cutícula, 4. Crecimiento lateral y penetración en la epidermis, 5. Agregación de los hemocitos en el lugar de penetración fúngica, 6. Fagocitosis de cuerpos hifales por células fagocíticas del insecto, 7. Transformación a cuerpos levaduriformes, 8. Evasión del sistema inmune, 9. Propagación en el hemocele, 10. Transformación a cuerpo hifal, 11. Esporulación y germinación atravesando la cutícula del insecto, 12. Diseminación de las esporas (Téllez–Jurado *et al.*, 2009).

El proceso infectivo inicia cuando la espora o conidio se adhiere a la cutícula del insecto a través de fuerzas hidrófobas debido a la presencia de proteínas ricas en cisteínas y de bajo peso molecular (10 kDa) llamadas hidrofobinas (Rodríguez & Arreondo, 2007). Posteriormente, bajo condiciones favorables de temperatura, nutrientes y humedad se produce un tubo germinativo y un apresorio que le sirve para fijarse a la cutícula, mientras que el tubo germinativo o haustorio (también denominado hifa de penetración) comienza la penetración al interior del insecto

(Gaxiola-Castro, 2014). En dicha penetración se ven involucrados 2 mecanismos, uno físico que consiste en la presión ejercida por la hifa que se encarga de romper las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula; y uno químico, que consiste en la acción enzimática, principalmente dada por proteasas, esterases, lipasas y quitinasas secretadas por las hifas, estas enzimas se encargan de hidrolizar el tejido en la zona de penetración (Monzón, 2001). La penetración es favorecida por efecto de la presión hidrostática y la formación de clavijas que penetran la cutícula del huésped (Rodríguez & Arredondo, 2007). El caso contrario, el fracaso del hongo para invadir la cutícula del insecto se ha atribuido a la presencia de compuestos inhibitorios, tales como ácidos grasos de cadena corta, ésteres, aldehídos, fenoles, quinonas y lípidos presentes sobre la superficie de la cutícula.

Hay evidencias que indican que algunos de estos compuestos están involucrados en la resistencia a la enfermedad (Montesinos-Matías, 2009). Una vez dentro del hemocele, la colonización del huésped se realiza por medio de blastosporas y micelio (Monzón, 2001; García *et al.*, 2008). El hongo invade la hemolinfa, en cuyo caso la muerte del insecto es el resultado de una combinación de daños mecánicos producidos por el crecimiento del hongo, desnutrición y por la acción de metabolitos secundarios o toxinas. Bajo condiciones de humedad elevada, en un periodo de 24 a 48 h después de la muerte del insecto el hongo emerge, esporula y produce una capa de conidios en la superficie del insecto para continuar con el ciclo infeccioso (Montesinos-Matías, 2012; Jaronski, 2013; Gaxiola-Castro, 2014). Es en esta fase que el insecto muerto adquiere una coloración característica de acuerdo a las esporas del hongo, por ejemplo, verde si es *Metarhizium* y blanco si es *Beauveria* (Monzón, 2001).

2.2.2 Enzimas producidas por los HEP

Los HEP producen un gran número de enzimas las que son de utilidad relevante para su acción sobre el hospedero, pues le permiten convertir los tejidos de los insectos en nutrientes para su crecimiento. Las enzimas son las que determinan la

virulencia, porque permiten al patógeno coexistir con los procesos metabólicos cambiantes, asociados con los estados de enfermedades del hospedero. La acción enzimática en los HEP es compleja, sin embargo, se ha logrado relacionarla con su capacidad infectiva y patogenicidad sobre los insectos (Rodríguez-Gómez, 2009). La cutícula del insecto es la primera barrera que debe enfrentar un HEP, constituida principalmente por quitina, proteínas, lípidos y compuestos fenólicos (Hegedus & Khachatourians, 1995; Monzón, 2001); debido a esto el hongo debe combinar el mecanismo de penetración física con su maquinaria enzimática. Diversos estudios han demostrado la presencia de quitinasas (Nhasas) y proteasas (Pr1 y Pr2), verificándose que éstas están altamente relacionadas con la virulencia en los HEP (Ballesteros-Torres, 2013).

2.2.2.1 Proteasas

Son enzimas que hidrolizan las proteínas por sus enlaces peptídicos, de acuerdo a su mecanismo de acción se dividen en exopeptidasas y endopeptidasas (Rodríguez-Gómez, 2009). Las proteasas Pr1 (quimoelastasas o proteasas semejantes a subtilisina) y Pr2 (proteasas similares a tripsina) han sido descritas y caracterizadas en *M. anisoplie*, donde Pr1 es la responsable del procesos de hidrólisis de la cutícula, especialmente porque esta última está constituida en un 61-70% por proteínas (Bidochka, 1988), y Pr2, una enzima cooperadora de la misma. En *Beauveria bassiana* se ha visto que poseen funciones muy similares (Donatti *et al.*, 2008). La secreción de la carboxipeptidasa de *B. bassiana* sobre la cutícula del huésped indica que provee los aminoácidos indispensables para el hongo, probablemente después de que la proteasa Pr1 solubiliza las proteínas de la cutícula. Dada la especificidad de acción de esta proteína, se cree que sirve como mecanismo de adaptación a las estructuras del huésped. Las metaloproteasas podrían actuar como un respaldo del sistema, complementando la acción de Pr1 (Rodríguez-Gómez, 2009). Varéa-Pereira *et al.*, (2007) realizaron un estudio en el que la producción de proteína extracelular de *B. bassiana* se vio incrementada, hasta en un 80% en las primeras 48 h, al reactivar la cepa primero

en *Hypothenemus hampei* usando un medio de glucosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno. La inducción de las proteasas por el efecto de la presencia de la cutícula de los insectos en el medio de cultivo ha sido comprobada en *B. bassiana* tanto para medios de cultivo líquidos (Qazi & Khachatourians, 2007; Donatti, 2008; Dias, 2008) como para medios de cultivo sólidos (Barranco-Flrido *et al.*, 2002).

2.2.2.2 Quitinasas

Las quitinasas de diferentes pesos moleculares y las quitosanasas tienen una participación en el proceso de penetración, pues son las encargadas de reblandecer el exosqueleto del insecto (Kim *et al.*, 2010). Las quitinasas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces β 1-4 de N-acetilglucosamina presentes en la quitina de insectos (Arakane & Muthukrishnan, 2009). La hidrólisis de la quitina se realiza por un sistema quitinolítico sinérgico y consecutivo, una primera hidrólisis, en la que se rompen moléculas complejas a oligómeros (endoquitinasas), y una segunda hidrólisis para la formación de monómeros de N-acetilglucosamina (exoquitinasas). Este proceso es utilizado por los hongos para el crecimiento y germinación de conidios, formación de apresorios y elongación de hifas (Ballesteros-Torres, 2011). Existen niveles basales de quitinasas para liberar inductores de las mismas. Las proteasas proveen los aminoácidos necesarios para el crecimiento, pero reprimen la síntesis de quitinasas (Rodríguez-Gómez, 2009). Al exponerse las fibras de quitina, y por acción de las hexosaminidasas se liberan fracciones de NAG, que inducen completamente la síntesis de quitinasas, lo que al final, redundando en la represión de la síntesis de proteasas hasta que los niveles excesivos de NAG disminuyen (Bidochka & Khachatourians, 1988). Se ha observado que usualmente la glucosa reprime la síntesis de las enzimas que depolimerizan la cutícula de los insectos, entre ellas las quitinasas (Leger *et al.* 1986; Montesinos-Matías, 2012). Para los HEP, las quitinasas son herramientas de vital importancia durante el proceso de infección. *B. bassiana* tiene la capacidad de secretar al medio estas enzimas, estas se encuentran presentes en

mayor cantidad que las proteasas (Ballesteros-Torres, 2011). Las quitinasas representan un factor importante de virulencia y sólo se requieren durante un corto periodo de tiempo en la penetración a la cutícula del huésped, su mayor producción se observa 40 h después de la inoculación del hongo, es decir, durante la fase saprobia, después de la muerte del insecto (Havukkala, 1993).

2.2.2.3 Lipasas

Las lipasas pertenecen a la familia de las carboxil éster hidrolasas que presentan actividad contra los enlaces éster carboxílicos en triglicéridos y actúa en la fase orgánica-acuosa liberando ácidos grasos y glicerol. Las lipasas desempeñan un papel importante en el proceso de infección a insectos, hidrolizando enlaces éster en las lipoproteínas, grasas y ceras que se encuentran abundantemente en los exoesqueletos (Cruz & Da Silva, 2014; Vici *et al.*, 2015). Las lipasas penetran la cutícula y comienzan la liberación de nutrientes una vez que logran romper el integumento, la degradación de la cutícula es seguida inmediatamente por la producción de proteasas Pr1 que se encargan de degradar todos los componentes proteicos presentes en la procutícula. Se ha identificado un mecanismo de defensa por parte de los insectos, éste está asociado con la secreción de β -lactona que es responsable de la inhibición de la actividad lipolítica impidiendo subsecuentemente la infección (Mondal *et al.*, 2016).

2.2.3 Producción de hongos entomopatógenos

Se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas (blastosporas y conidios) en un medio de cultivo. Se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales: arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados. Los métodos de producción van desde la multiplicación artesanal realizada por los mismos productores, la producción semi-industrial a mediana escala, hasta la producción a gran escala. La diferencia entre estos métodos no se manifiesta en la calidad del producto obtenido, sino en los procesos empleados y

en los volúmenes de producción; ya que de realizarse un buen control de calidad con cualquiera de los métodos se obtiene un producto de alta calidad (Monzón, 2001).

En general el proceso de producción está constituido por 2 etapas; obtención y producción del agente entomopatógeno. La primera consiste en el aislamiento y purificación del microorganismo y la producción implica la preparación de los sustratos, inoculación e incubación, proceso de secado y cosecha del hongo.

En todo proceso de producción de hongos, la obtención del cultivo puro es el paso determinante, debido a que constituye la fuente de inóculo requerido para iniciar el proceso. Al obtener un cultivo puro, se debe asegurar que el aislamiento es reciente y que tiene todas las características de la cepa, relacionadas principalmente a su viabilidad y patogenicidad (Monzon, 2001).

La mayoría de los sistemas de producción de HEP utilizan un sistema bifásico (Mondal *et al.*, 2016. Villalba *et al.*, 2009, Mata, 2008): primero el micelio o cuerpos hifales son producidos en un medio líquido con agitación; para posteriormente, ser transferidos a un sustrato sólido para la producción de conidios aéreos.

2.2.3.1 Fermentación bifásica

Inicialmente el hongo crece en un medio líquido hasta el final de la fase exponencial, para después transferir la biomasa a un sustrato sólido (Aponte y Carmona, 2000). El medio líquido empleado en la primera etapa de producción contiene una concentración adecuada de carbono y nitrógeno (Jaronski, 2013). En la fermentación sólida, el sustrato además de proveer una gran área superficial para la aireación, sirve también como soporte físico para la producción de estructuras germinativas (conidios aéreos) y puede ser usado como fuente de nutrientes por el hongo.

El sistema de la fermentación bifásica ofrece múltiples ventajas. Por ejemplo, el medio líquido puede servir como una barrera contra contaminantes que pudieran estar presentes en el stock. El sistema promueve una mayor competitividad de los hongos, reduciendo así el riesgo de que el sustrato sólido sea colonizado por microorganismos contaminantes. Además, este proceso asegura una colonización uniforme del sustrato. Finalmente, la colonización y producción de conidios ocurren a mayor velocidad, reduciendo los tiempos del proceso (Machado *et al.*, 2010).

Una amplia variedad de sustratos han sido evaluados para la producción de *Ascomycetos*, siendo el arroz y la cebada los más utilizados en los trópicos y el hemisferio norte, respectivamente, existe un considerable esfuerzo para identificar y emplear materiales agrícolas económicos, especialmente subproductos o residuos agroindustriales como sustratos (Jaronski, 2013).

2.3 *Beauveria bassiana*

En 1912 Vuillemin describió formalmente el género *Beauveria*, designando a *Botrytis bassiana* como la especie; posteriormente se le nombró *Beauveria bassiana* en reconocimiento a J. Beauverie, quien la estudió en la enfermedad de la muscardina blanca (Vega & Blackwell, 2005), así como a Agostino Bassi quien la describió por primera vez.

B. bassiana, es un hongo de micelio blanco o ligeramente amarillento (dependiendo de las condiciones del cultivo), su reproducción por conidios la ha clasificado de manera tradicional dentro de los hongos hifomicetes asexuales (*Deuteromycetes*). Presenta hifas septadas de las cuales se ramifican los conidióforos (estructuras reproductivas), sobre los que se desarrollan los conidios unicelulares y transparentes. Dándole la capacidad de vivir de manera parásita o saprofita, lo que le permite subsistir con o sin huésped. En el suelo, su forma de crecimiento es micelial, junto con la materia orgánica. Sin embargo, durante la

infección, el conidio germina produciendo micelio y estructuras semejantes a levaduras conocidas como blastosporas (Rehner *et al.*, 2011; Rehner & Buckley, 2005).

B. bassiana es considerada un HEP con un rango amplio de huéspedes, aproximadamente 200 especies de insectos. Con una variación extensa en la virulencia hacia los huéspedes, volviéndolo un candidato muy versátil como agente de control biológico (ACB). Este hongo ataca plagas agrícolas de importancia económica para México, como el picudo del algodón (*Anthonomus grandis* Boh), la mosca mexicana de la fruta (*Anastrepha ludens* Loew), el perforador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner), la broca del café (*Hypothenemus hampei*) entre otros. *B. bassiana*, es un organismo cosmopolita, que se aísla fácilmente de cadáveres de insectos o de muestras de suelo, utilizando medios simples con antibióticos y agentes selectivos. Esto permite que pueda ser cultivado en el laboratorio en sustratos sencillos, y conservarse utilizando métodos convencionales como solución de glicerol o liofilización. Es por esto que es uno de los HEP más importantes en las colecciones a nivel mundial (Vega & Blackwell, 2005).

2.3.1. Metabolitos secundarios de *Beauveria bassiana*

Beauveria es conocida por producir una gran variedad de metabolitos secundarios biológicamente activos. Dentro de estos metabolitos se incluyen los pigmentos no peptídicos y policétidos (por ejemplo, oosporeina, bassianina y tenelin), péptidos no ribosomales (por ejemplo, beauvericina, bassianolides y beauveriolides), y metabolitos secretados implicados en la patogénesis y la virulencia (por ejemplo, ácido oxálico). Todos estos metabolitos tienen potencial para uso agrícola, industrial y farmacéutico (Rohlf s & Churchill, 2011).

2.3.2. Producción de conidios (fermentación bifásica) y enzimas en *Beauveria bassiana*.

La producción de conidios aéreos de entomopatógenos fúngicos cultivados en sustratos sólidos varía entre especies y cepas. El arroz se usa con mayor frecuencia en la fermentación en estado sólido (Li *et al.*, 2010), ya que se ha observado que puede producir mayores rendimientos debido a sus mejores propiedades nutricionales y físicas. Varios estudios muestran que las enzimas y la hidrofobicidad se correlacionan con la virulencia fúngica (Shah *et al.*, 2005, 2007), sin embargo, otros estudios no encontraron correlación positiva o negativa significativa con los factores de virulencia de *B. bassiana* (Mascarin *et al.*, 2013), esto podría sugerir que existen otros factores de virulencia involucrados en el proceso de infección, no obstante, no se descarta el hecho de que las enzimas y algunas toxinas generadas por el mismo hongo están relacionadas con el proceso de virulencia (Dhawan *et al.* 2017; Gupta *et al.* 1992b; Gillespie & Claydon 1989; Machado *et al.* 1991b).

Algunos estudios han evaluado la producción de blastosporas en medios de cultivo sumergido, como un indicativo de virulencia y crecimiento en menor tiempo, y cultivos sólidos de conidios, como resistencia al ambiente; también se ha evaluado la combinación de ambos en un cultivo bifásico, con la intención de obtener biomasa y metabolitos secundarios en menor tiempo junto con células de mayor resistencia. Se han utilizado diferentes medios de cultivos líquidos y enriquecidos, obteniendo concentraciones de blastosporas de 5.25×10^7 a 2.20×10^8 blastosporas/mL. Reportes de germinaciones del 56 % en tierra de diatomeas, mientras que en matrices de arroz a los 14 días de incubación se han producido de 2.35×10^8 a 1.82×10^9 conidios/g, con una viabilidad superior a 90% para todos los hongos durante 4 semanas de almacenamiento a 4 °C (Jenkins *et al.*, 1998; Shah, Wang & Butt, 2005; Li *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2010, 2012; Lizeth, 2013; Qiu *et al.*, 2013; Mascarin *et al.*, 2013; Gouli, Gouli & Kim, 2014).

Dentro de los estudios realizados específicamente para la inducción enzimática en *B. bassiana* se encuentra el trabajo de (Montesinos-Matías, 2012), quien utilizó *T. molitor* como inductor, sin realizar ningún tratamiento previo al sustrato, utilizando diferentes concentraciones de glucosa (0, 1.25, 2.5, 5 g/L). Para la inducción de enzimas, probó medios con quitina suplementada con glucosa (QG) y cutícula suplementada con glucosa (CG). Los resultados mostraron una actividad específica de proteasas de 0.379 ± 0.036 U/ μ g proteína, quitinasas de 0.033 ± 0.004 U/ μ g proteína y actividad de *N*-acetilglucosaminidasas de 0.088 ± 0.019 U/ μ g proteína. Donde al utilizar la quitina como inductor y la glucosa como medio de represión, la respuesta enzimática fue de mayor producción de actividad volumétrica de proteasas (10 mU/mL). Los medios con quitina mostraron una disminución de la actividad volumétrica de proteasas. Las quitinasas no mostraron disminución de la actividad volumétrica en el medio con quitina, ni en aquellos que contienen quitina y glucosa, en ambos tratamientos la concentración de quitinasas se mantuvo constante en 0.15mU/mL, sin embargo, la inclusión de glucosa en los medios influyó negativamente en la producción de β -*N*-Acetilglucosaminidasa pasando de 0.18 U/mL en medio con quitina a valores por debajo de 0.05 U/mL en los medios con glucosa.

Jiménez-Alejandro (2015), observó que la máxima concentración volumétrica de NHasas fue de 3.39 mU/mL en medio Czapeck a pH 5 y 25 °C, utilizando en el medio una concentración de 10 g/L de cutícula de chapulín sin desproteinizar. Por otra parte, Azamar-Jiménez (2016), evaluó en medio Sabouraud el crecimiento y la producción enzimática de *B. bassiana* a diferentes concentraciones de chapulín sin desproteinizar como inductor, agregando glucosa a una elevada concentración (40g/L) se observó una inhibición de la producción de biomasa y de concentración enzimática. Esta observación puede deberse a la alta complejidad del medio; pero principalmente a la alta concentración de glucosa, que es de fácil asimilación, en comparación con el inductor que es más complejo por no tener un tratamiento de purificación previo; los resultados se resumen y visualizan en la Tabla 1.

Tabla 1. Máxima producción enzimática en *Beauveria bassiana* con diferentes concentraciones de chapulín como inductor. Con una concentración de glucosa de 40 g/L para todos los tratamientos.

Concentración de inductor [g/L]	Enzima	Día	Actividad volumétrica [mU/mL]
0 (Blanco)	Quitinasas	7	0.458
	Proteasas	7	31.555
	Lipasas	6	0.296
5	Quitinasas	5	1.383
	Proteasas	4	1.179
	Lipasas	2	0.853
10	Quitinasas	0	0.381
	Proteasas	6	1.035
	Lipasas	7	0.843
15	Quitinasas	3	1.503
	Proteasas	5	0.652
	Lipasas	4	0.478

Tomado de Azamar-Jiménez, (2016)

2.3 FORMULADOS BIOLÓGICOS

La formulación es el proceso en el cual el ingrediente activo (conidios) se mezcla con materiales inertes (antiespumantes, sales, adherentes, aditivos como colorantes, repulsivos, irritantes, sustancias coadyuvantes, entre otros). Estos materiales no deben tener actividad biológica, ni afectar la actividad del hongo. Además, deben ser inocuos al ambiente, presentar características físicas que permitan el mezclado, ser de fácil aplicación y económicamente rentables (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

La estabilidad, viabilidad y persistencia que los conidios tengan en campo se determina generalmente por el tipo de formulación (Cortez-Madrigal, 2006). El éxito de un formulado biológico, bioplaguicida o micoinsecticida, radicará en una buena formulación, la cual dependerá de las características del microorganismo, su relación con los componentes de la formulación y el ambiente de almacenamiento. En algunos casos las formulaciones pueden incrementar la

virulencia cuando se facilita la adhesión de los conidios sobre la cutícula del insecto y se estimula la germinación. Sin embargo, el progreso para realizar formulaciones adecuadas es lento, convirtiéndolo en una de las mayores barreras para la producción de bioplaguicidas (Motta-Delgado & Murcia-Ordoñez, 2011).

Algunos de los sistemas de producción industrial para hongos entomopatógenos utilizan un método bifásico. Donde el micelio, hifa o blastosporas se produce en cultivo líquido, que luego es transferido a sustratos sólidos, para disminuir el tiempo de colonización, y aumentar la producción de conidios. Las ventajas del sistema bifásico es que el cultivo líquido puede actuar como una barrera contra los contaminantes que podrían estar presentes en el stock del cultivo original. Este sistema también promueve una mayor competitividad del hongo, reduciendo así el riesgo de que el sustrato sólido sea colonizado por microorganismos contaminantes. Además, este proceso asegura una colonización uniforme del sustrato sólido, dando como resultado un crecimiento fúngico homogéneo. La colonización y producción de conidios es más rápida, reduciéndose el tiempo de incubación (Rinaudo, 2006).

2.3.1 Control de calidad de formulados biológicos con HEP

La comercialización de un formulado biológico (FB) a base de HEP, requiere un control de las propiedades biológicas, físicas y químicas. Para esto se realizan pruebas microbiológicas como concentración de esporas, germinación (viabilidad), y virulencia sobre el insecto blanco (de Albuquerque Maranhão & de Albuquerque Maranhão, 2013). En el proceso de formulación se mejoran las propiedades de almacenamiento, manipulación, efectividad y seguridad de los hongos entomopatógenos. Todos ellos son parámetros que ayudan a determinar la calidad del formulado.

2.4 INMOVILIZACIÓN O ENCAPSULAMIENTO CELULAR

La sensibilidad de los organismos utilizados en control biológico los hace susceptibles a diversos factores; estos inconvenientes se superan cuando se utiliza un sistema de encapsulación adecuado, el cual puede mejorar o aumentar tanto las cualidades del agente de control, como la viabilidad que prolonga o mantiene la vida útil del microorganismo, la disminución de la dosis recomendada y el número de aplicaciones, por el alto contenido de microorganismos por cápsula (Vemmer & Patel, 2013).

2.4.1 Materiales para encapsulación

Actualmente, los materiales más utilizados para la preparación de cápsulas son polímeros naturales, debido a su capacidad biodegradable. Por ejemplo, polisacáridos como lignina, alginato, carrageninas, agar /agarosa, goma gellan, goma guar, goma de acacia, almidón, celulosa, pectina, quitosano y sus derivados, polipéptidos como poli-L-lisina, o proteínas como gelatina o suero de leche, lípidos como ceras (Park & Chang, 2000; Vemmer & Patel, 2013).

Cada material usado para encapsular tiene diferentes características en sus propiedades, como el peso y distribución molecular, su grado de sustitución, los mecanismos de gelificación, sus propiedades viscoelásticas, sus estructuras primarias, secundarias y terciarias, etc. Sin embargo, se deben considerar otros factores no propios del material, como los económicos, de seguridad y calidad dentro de este último se considera su toxicidad, degradabilidad, y la fuente de la cual provienen, todos estos factores en conjunto influyen en los costos del producto y de ellos dependen la utilidad que se le dará al material obtenido (Vemmer & Patel, 2013).

2.4.1.1 Quitosano

El quitosano es un polisacárido obtenido a partir de la quitina, está formada por unidades de *N* acetil-*D*-glucosamina y *D*-glucosamina unidos mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, (Figura 2). Es soluble en soluciones acuosas ácidas diluidas gracias a la presencia de grupos amino en su estructura, los cuales se protonan y permiten la solubilidad (Rinaudo, 2006).

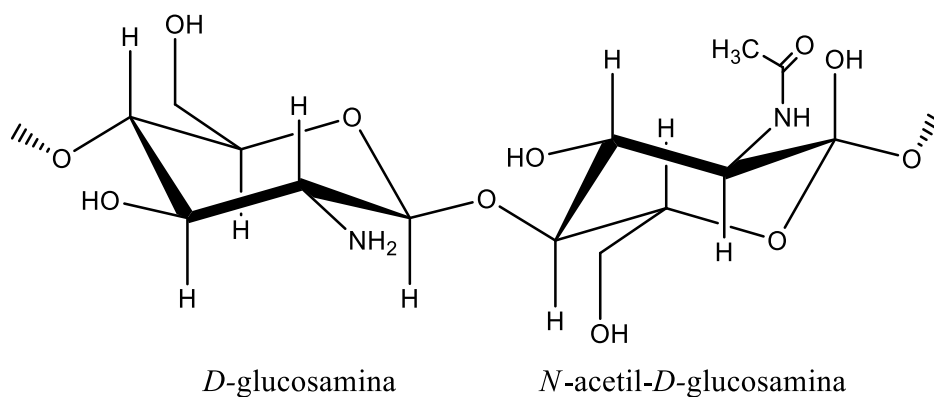


Figura 2. Estructura química del quitosano, formada por unidades *N*-acetil-*D*-glucosamina y *D*-glucosamina unidas mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ (Rinaudo, 2006).

El quitosano es obtenido por medio de un proceso de desacetilación y consiste en la eliminación de los grupos acetilo presentes en la quitina, puede lograrse mediante métodos termo-alcalinos o enzimáticos (Sannan *et al.*, 1975; Shigemasa *et al.*, 1994).

Las principales variables que pueden afectar las propiedades del quitosano son: el grado de acetilación, peso molecular y patrón cristalino. Propiedades como la capacidad de retención de agua, hinchamiento y comportamiento polielectrolítico se ven afectadas directamente por el grado de acetilación, el peso molecular y la rigidez de cadena (Rinaudo, 2006). El quitosano es una poliamina, por lo que en medio ácido es un polielectrólito catiónico, esta es una propiedad poco común entre los polímeros naturales. La presencia de grupos alcohol y amino en sus unidades constitutivas le confiere la capacidad de actuar como donador y aceptor

de protones, lo que le permite interactuar con una gran cantidad de moléculas y hace factible su modificación química. Esto se ha aprovechado para generar un número creciente de derivados con funcionalidad y aplicaciones muy diversas (Benesch & Tengvall, 2002).

Además, el quitosano, es un biopolímero de creciente interés en diversas aplicaciones debido a su biodegradabilidad, ya que se puede degradar y reabsorber *in vivo*. Esto se debe a la susceptibilidad de ser hidrolizada enzimáticamente por lisozimas, además de existir evidencia de actividad hidrolítica de otras enzimas como pepsina, papaína o pancreatina y quitinasas. A pesar de que el mecanismo de degradación no está completamente elucidado, el empaquetamiento cristalino del quitosano y su influencia sobre la accesibilidad de la enzima también parecen ser importantes. En cualquier caso, polímeros altamente desacetilados se degradan vía lisozima más lentamente que aquellos con bajos grados de desacetilación. Otros parámetros como el peso molecular, el pH o, incluso, el método de obtención influyen en la biodegradación. La biodegradación mediante la acción de la lisozima produce oligosacáridos no tóxicos que pueden ser posteriormente degradados por otras enzimas; estos productos son eliminados o reabsorbidos fácilmente por el organismo (Shigemasa *et al.*, 1994; Shin-ya *et al.*, 2001).

Los biopolímeros pueden ser biocompatible dependiendo su fuente, método de obtención, peso molecular, grado de desacetilación, etc.(Ishihara *et al.*, 2006), Su facilidad de bioadhesión, bacteriostático y su permeabilidad al oxígeno son propiedades muy atractivas para aplicación biomédica, agrícola, alimentaria, tratamiento de líquidos, cosmética y biotecnológica (Rinaudo, 2006; Wang *et al.*, 2004).

2.4.1.2 Alginato

El alginato es un biopolímero presente en la composición de las algas marrones (40% de la materia seca). Su función biológica principal es estructural, ya que otorga fuerza y flexibilidad al tejido del alga. El alginato es un copolímero lineal, y consiste en unidades de los ácidos β -D-manurónico (**M**) y α -L-gulurónico (**G**), unidos por enlaces glicosídicos 1 \rightarrow 4 y dispuestos de manera homo- y heteropolimérica (Figura 3). Así, el alginato no tiene sus unidades dispuestas en secuencias regulares, por lo cual no basta conocer la composición monomérica para describir su estructura química. Como se observa en la Figura 3, existen diversas formas del enlace glicosídico según cómo sea la secuencia de unión entre monómeros, esto genera 3 formas estructurales: GG, MM, MG (Miller, 1996; Schürks *et al.*, 2002).

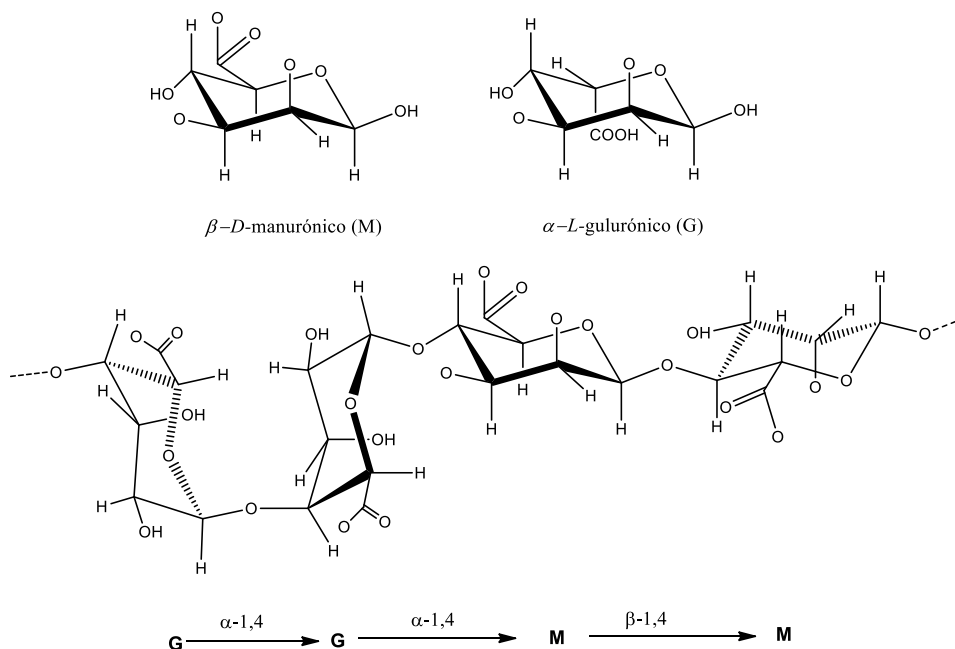


Figura 3. Estructura química del alginato, monómeros constituyentes y formas estructurales dependiendo de su secuencia (Miller, 1996).

Las propiedades biológicas y físicas de los alginatos en medios acuosos dependen no sólo de la relación M/G, sino también de la distribución de estas unidades a lo largo de la cadena (Miller, 1996).

Los alginatos purificados tienen una gran variedad de usos industriales, debido a su capacidad para formar hidrogeles, perlas, fibras o películas, principalmente en presencia de calcio (Rinaudo, 2014). Eso hace su empleo ampliamente extendido en el área de alimentos y biomedicina, seguida de aplicaciones experimentales en embalaje, papel, textiles y vendajes de heridas.

2.4.2 Morfología de las cápsulas

Dependiendo del método de encapsulación, las cápsulas pueden asumir diferentes morfologías (Figura 4). La forma más común es la esférica, este diseño se puede subdividir en diferentes tipos de estructuras que son: cápsulas sólidas y cápsulas con un núcleo líquido. En el sistema de cápsulas, cuando algo es retenido dentro de una membrana semipermeable se define como "cápsula". Las cápsulas también se pueden extruir en una superficie plana produciendo cápsulas en forma de lente llamada forma lenticular. Las esferas recubiertas se forman con cápsulas, llenas o huecas. Las esferas multi compartimentos son cápsulas diseñadas con compartimientos múltiples, con múltiples núcleos y/o revestimientos, de tamaños micrométricos. En todos estos sistemas de cápsulas, se pueden incluir en su interior uno o varios agentes de control biológico microbianos (Vemmer & Patel, 2013).

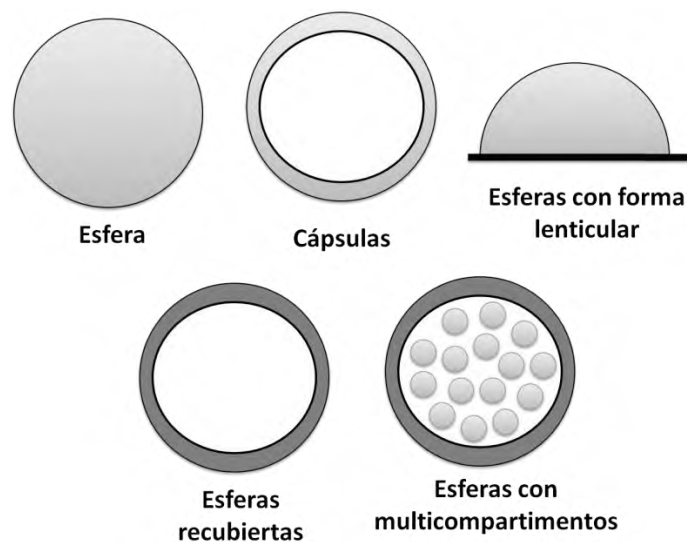


Figura 4. Morfología de los diferentes tipos de cápsulas que se han elaborado. Tomado de (Vemmer & Patel, 2013).

2.4.3 Métodos de inmovilización de células

Los métodos más utilizados para la inmovilización de células son: difusión hacia las esferas (*Bead entrapment*) y encapsulación directa (Park & Chang, 2000; Peniche *et al.*, 2003).

2.4.3.1 Difusión de esferas (*Bead entrapment*)

Consta de atrapar células viables en un gel previamente formado, se consigue mediante la difusión de sustratos y productos hacia o desde el material. La matriz del gel puede estar formada por polímeros naturales como: agar, agarosa, kappa-carragenina, colágeno, alginato, quitosano o celulosa, o sintéticos como la poliacrilamida. Este procedimiento posee la desventaja tecnológica de que las células atrapadas por lo general escapan de la matriz del gel y crecen en el medio, beneficiando el crecimiento de las células sobre la superficie, y en los poros de la matriz, donde el sustrato disponible es limitado; además los polímeros inorgánicos y algunos entrecruzantes pueden resultar tóxicos (poliacrilamida y poliuretano) para las células inmovilizadas (Buchholz & Klein, 1987; Park & Chang, 2000).

2.4.3.2 Encapsulación directa

En este procedimiento las células se encapsulan en un solo paso y se cultivan en un medio de crecimiento. Las técnicas convencionales usadas para la encapsulación son: separación de fases, secado por aspersión, gelificación ionotrópica, coacervación, emulsión, etc. Algunas de estas técnicas se describen a continuación.

2.4.3.2.1 Separación de fases

Esta técnica consiste en la formación de una emulsión de agua-en-aceite (w/o) con el uso de un tensoactivo. Las gotas de la fracción acuosa, donde se encuentra disuelto el polímero, estarán suspendidas dentro de la fase oleosa. La superficie, a lo largo de las cadenas del polímero en donde se encuentren los grupos funcionales disponibles para reaccionar con el entrecruzante; las cápsulas pueden ser entrecruzadas para estabilizarlas a través de diferentes métodos: a) adición de una solución con entrecruzante, por ejemplo glutaraldehído, b) por evaporación del disolvente, y c) por la adición de aniones polivalentes, tales como TPP o citrato, en el caso de la reticulación del quitosano con un ácido dicarboxílico o tricarboxílico (Lim *et al.*, 2000; Shu & Zhu, 2001; Peniche *et al.*, 2003).

2.4.3.2.2 Secado por aspersión.

Este método utiliza una solución homogenizada que contiene dispersas las células bacterianas y el material de soporte que se atomiza, el cual pasa a través de una cámara con flujo de aire caliente que provoca la evaporación del disolvente y en consecuencia la formación de microcápsulas; por último, el material seco es pulverizado para disminuir el tamaño de la partícula. Las principales ventajas del proceso son: la administración de manera continua de la solución, bajo costo de operación, alta calidad de las cápsulas, buen rendimiento, así como la rápida solubilidad de las cápsulas y la alta estabilidad. Dentro de sus inconvenientes, las

altas temperaturas utilizadas en el proceso pueden afectar las células, por lo que esta técnica no es adecuada para inmovilizar cultivos de células; además, la falta de uniformidad en las microcápsulas producidas o la limitación en la elección del material de la pared (Watanabe *et al.*, 2002; Schoebitz, López & Roldán, 2013).

2.5.3.2.3 Gelificación ionotrópica

Consiste en la reticulación iónica, que es la formación de una red tridimensional creada por la unión de las diferentes cadenas poliméricas homogéneas, por ejemplo quitosano con contra iones multivalentes: $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$, $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ y citrato. El tripolifosfato de sodio se emplea comúnmente para producir la gelificación ionotrópica del quitosano en un medio ácido. Las micropartículas formadas se obtienen a partir de la adición de una disolución de quitosano a una solución de TPP o viceversa, con agitación constante. El tamaño de las partículas depende de la concentración de las soluciones y de la velocidad de agitación (Peniche *et al.*, 2003).

2.5.3.2.4 Coacervación.

La coacervación en polímeros incluye la separación de una solución diluida de polímero en dos fases coexistentes: un polímero de fase rica y una fase muy diluida, donde la fase líquida del componente se separa de una solución polimérica para envolver el núcleo líquido con una capa uniforme, esta gotita de núcleo líquido se llama coacervado; para eliminar el disolvente que haya quedado dentro de la cápsula se usan técnicas de eliminación del disolvente por calor o reticulación. La coacervación en sistemas acuosos se subdivide en coacervación simple y compleja. La coacervación simple se produce al adicionar sustancias fuertemente hidrófilas que disminuyen la solubilidad provocando una separación de fases. La coacervación compleja se produce cuando reaccionan entre sí dos sustancias originando un complejo de menor solubilidad (Park & Chang, 2000; Peniche *et al.*, 2003).

2.5.3.2.5 Formación de complejos polielectrólitos (FCPE)

Son complejos de asociación formados entre las partículas con carga opuesta, debido a la interacción electrostática entre poliiiones de carga opuesta. Esto evita el uso de agentes químicos de unión, reduciendo de este modo la posible toxicidad y otros efectos indeseables de los reactivos. Los complejos de polielectrólitos están afectados por la variación del pH del medio de disolución. La calidad de las perlas preparadas por el método de gelificación ionotrópica puede mejorar mediante los complejos de polielectrólitos. La resistencia mecánica y la barrera de permeabilidad se pueden mejorar mediante la adición de otro polielectrólito cargado de manera opuesta a las perlas de hidrogel inotrópicamente gelificadas (Lankalapalli & Kolapalli, 2009).

El comportamiento de hinchamiento y la estabilidad de complejos de polielectrólitos dependen del pH, la temperatura, la densidad de carga, la fuerza iónica entre otras condiciones ambientales (Recillas *et al.*, 2011).

2.6 Estudios de inmovilización y encapsulación de *Beauveria bassiana*

Se han reportado varios estudios de inmovilización y encapsulación celular de *B. bassiana*; por ejemplo Gerding-González *et al.*, (2007) realizaron ensayos para evaluar las concentraciones óptimas de quitina en las formulaciones de inmovilización de conidios en pellets de alginato de sodio. Los autores probaron diferentes concentraciones de quitina para la elaboraion de cápsulas: 0 a 4% (w/v), con y sin salvado de trigo al 2%, (w/v). Prepararon las diferentes combinaciones de pellets de salvado de trigo-quitina con *B. bassiana* Qu-B306 con una concentración inicial de 1×10^8 conidios/mL, y se evaluó la producción de conidios, dentro de la cápsula, después de 21 días de incubación en una cámara húmeda a 28 °C. Los resultados mostraron mejoras de hasta tres veces el número de conidios inicial, usando 2% de quitina y 2% de salvado de trigo. También observaron que al usar concentraciones por arriba del 4 % de quitina se disminuyó

el número de conidios por pellet. Para todas las concentraciones de quitina, el número de conidios se incrementó con la adición de salvado de trigo. Es importante hacer notar que la contaminación por hongos saprofitos se redujo al incorporar quitina en la formulación de pellets.

Otro método probado por Santiago & Orlando (2015), ha sido el de secado por aspersión, donde se han obtenido productos viables hasta del 85%, cuando probó el formulado en *M. spinolae* se observó que la mayor mortalidad ocurrió a los ocho días después de la incubación, mientras que el que contenía a los conidios sin microencapsular fue a los seis días. La virulencia y patogenicidad no se vieron afectadas y la esporulación sobre *M. spinolae* fue mayor cuando se trató con conidios inmovilizados que con aquellos sin encapsular; el autor también evaluó la estabilidad durante tres meses de almacenamiento a 4°C, observando que no se perdía viabilidad ni virulencia.

Por otro lado, la microencapsulación de conidios de *B. brongniarti* y *B. bassiana* mediante secado de aspersión mostraron buenos resultados para microorganismos susceptibles a temperaturas elevadas, ya que después del proceso ambas especies presentan viabilidad óptima para su uso como agentes de control microbiano (Horaczek & Viernstein 2004; Liu & Liu 2009). Sin embargo no se reportaron datos de virulencia del producto obtenido, ni de su efectividad en condiciones de campo. La contaminación por hongos saprofitos se redujo por la incorporación de la quitina en la formulación de las cápsulas.

La Tabla 2 muestra de manera resumida los diferentes tipos de materiales utilizados para la encapsulación de células de hongos y levaduras. Se observa que se utilizan materiales como alginato y kapa-carragina principalmente.

Tabla 2. Células inmovilizadas en matrices poliméricas

Material de soporte	Célula	Reactante/Producto
Alginato de calcio	<i>Saccharomyces carlabergensis</i>	Glucosa/ Etanol
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	melaza / etanol
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Benzaldehído/ L-PAC
	<i>Aspergillus awamori</i> / <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Almidón / etanol
	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico
	<i>Escherichia coli</i>	Formiato
Poliacrilamida hidrazina/ alginato de calcio	Levadura	melaza / etanol
Kapa-carragina	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina

Modificada de Park & Chang (2000)

En cuanto a la calidad del formulado, Daoust *et al.*, (1982) resalta la necesidad de monitorear la virulencia de una formulación, debido a que en algunos encapsulados en polvo almacenados a 4 °C hasta por 8 meses, no se afecta la viabilidad pero sí la virulencia de los conidios. En el estudio se determinó que una formulación comercial debe tener una germinación superior al 85% a las 24 horas de incubación para que el hongo tenga un rápido efecto sobre la población del insecto que está atacando y un corto periodo de exposición a condiciones ambientales adversas.

3. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la mayoría de las investigaciones sobre control biológico se han enfocado en la selección y mejoramiento de cepas; a la producción en masa y a la experimentación en campo; restando importancia a la investigación enfocada al mejoramiento de la formulación, estandarización y calidad; disminuyendo la búsqueda de formulaciones estables, rentables y de fácil aplicación.

Dentro de los inconvenientes que presentan los formulados biológicos se encuentra su tiempo de acción prolongado en comparación con los formulados químicos, principalmente el efecto de las condiciones climáticas en su efectividad. Una alternativa para la formulación de HEP puede ser el encapsulamiento micelial y de conidios en matrices de materiales biodegradables, que además pueden servir como sustrato para el hongo, lo cual mantendría su viabilidad y contribuiría a su crecimiento.

Beauveria bassiana es uno de los HEP más usados para el control biológico, y se ha elegido para el desarrollo de la presente investigación debido a su fácil aislamiento, y a algunas de sus características propias, ya que es cosmopolita, tolerante a una gran variedad de condiciones ambientales, produce una diversidad de enzimas para asimilar una amplia gama de sustratos, y no causa daño a las plantas, ganado, ni a los seres humanos; en las concentraciones que se usan para los formulados biológicos. Con este trabajo se pretende obtener un producto de mayor resistencia, fácil manejo y amigable con el ambiente. A partir de biopolímeros como lo son: el alginato de sodio y el quitosano que tienen la propiedad de ser biodegradables, biocompatibles, fácil de solubilizar en medios acuosos, son ampliamente utilizados para el desarrollo de encapsulados, y que además se pueden obtener de desechos agroindustriales, de fácil acceso en la región debido a la cercanía de zonas de producción.

3. HIPÓTESIS

La microencapsulación de *Beauveria bassiana* 885.2 con biopolímeros (alginato de sodio o quitosano) permitirá conservar la densidad de conidios y viabilidad del hongo y aquellas cápsulas que además incluyan la adición chapulín molido como sustrato mejorarán la viabilidad, la densidad de conidios y la producción enzimática de *B. bassiana*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Generar un encápsulado de conidios de *Beauveria bassiana* 885.2 a base de biopolímeros (alginato y quitosano), que con la adición de un sustrato quitinoso (chapulín), mantenga la densidad conidial y la viabilidad durante el almacenamiento.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

-Comparar dos métodos de encapsulación: gelificación ionotrópica y encapsulación por formación de complejos polielectrólitos.

-Caracterizar las cápsulas a través de análisis fisicoquímicos y estructurales.

- Determinar la viabilidad del hongo inmovilizado después del almacenamiento a 4°C y temperatura ambiente en condiciones *in vitro*.

5. MATERIALES Y METÓDOS

5.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La experimentación constó de 2 fases, en la primera fase se llevó a cabo una fermentación bifásica para la obtención de conidios aéreos, forma más resistente del hongo, que fue utilizado para la encapsulación. En la segunda fase, se realizó el encapsulamiento de los conidios producidos, utilizando biopolímeros como material de inmovilización. La estrategia metodológica se desglosa en el diagrama de la Figura 5.

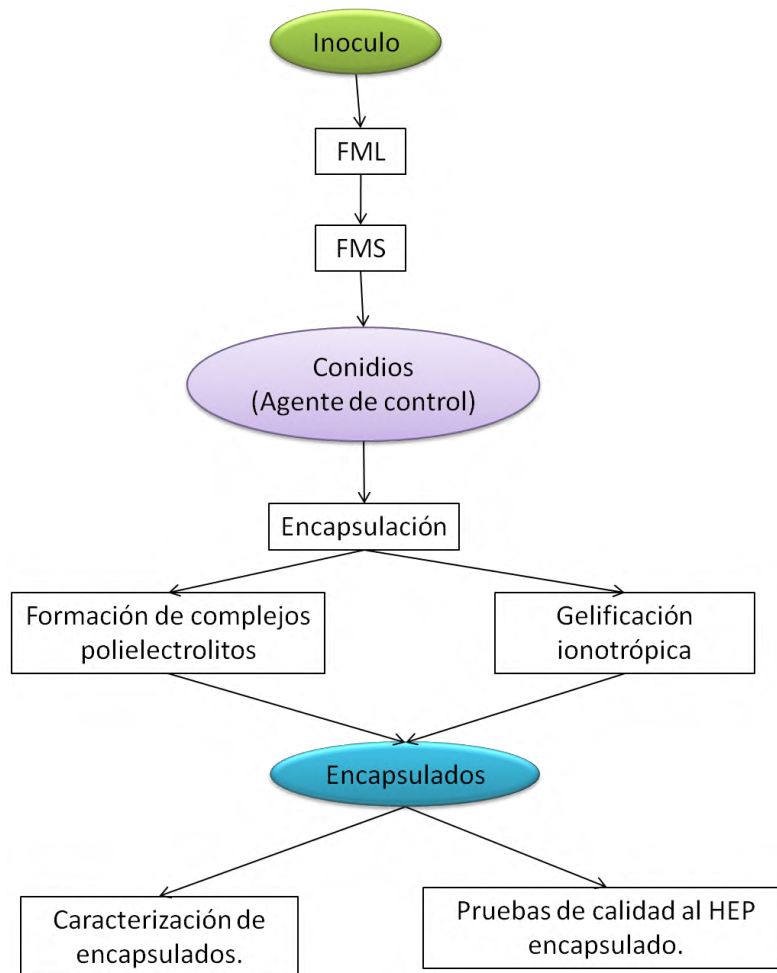


Figura 5. Estrategia metodológica general.

5.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Se empleó *Beauveria bassiana* 885.2, perteneciente al cepario de la Universidad del Papaloapan. Para su conservación y mantenimiento, se utilizó siempre medio Sabouraud glucosa (SGA) al 4%, enriquecido con extracto de levadura (5 g/L) a 25 °C a 180 rpm durante 8 días.

La conservación de la cepa se realizó, cada mes, en medio sólido agregando agar (15 g/L), al final del cultivo los conidios se extraían con agua destilada estéril. El mantenimiento o activación de la cepa, que generará el inóculo usado en la fermentación bifásica, se producía en caldo de Sabouraud-glucosa al 4% (p/v) enriquecido con extracto de levadura (5 g/L), previamente esterilizado (121 °C, 1 atm, durante 20 min), con una concentración de inóculo de 1×10^8 conidios/mL, fermentando durante 8 días a 25 °C y 180 rpm; con la finalidad de activar las funciones metabólicas de la cepa y disminuir el tiempo de latencia de la cepa conservada.

Para cuantificar el número de conidios por mililitro, se tomó una alícuota, que fue diluído y montado en una cámara de Neubauer, con la finalidad de facilitar el conteo de conidios en el microscopio óptico (40x). El polvo de conidios usado para la encapsulación se conservó mediante liofilización y almacenamiento a 4°C.

5.3 FERMENTACIÓN BIFÁSICA PARA LA PRODUCCIÓN DE CONIDIOS AÉREOS

5.3.1. Fermentación líquida

Una vez obtenido el inóculo se realizó una fermentación líquida en medio Sabouraud-glucosa al 4% (p/v) enriquecido con extracto de levadura (5 g/L), los medios de cultivo fueron inoculados con una concentración de 1×10^8 conidios/mL,

e incubados a 25 °C, 180 rpm durante 8 días; con la finalidad de obtener biomasa que fue utilizada como inóculo para la producción en sólido.

5.3.2. Fermentación sólida

Finalizada la fermentación líquida, se prosiguió a realizar la fermentación sólida en una matriz de arroz. Se utilizó la biomasa producida en la fermentación líquida como inóculo para la producción en sólido, con la finalidad de acelerar el proceso de invasión por parte del hongo en la matriz de arroz. La fermentación sólida duró hasta que se observó producción de condensado, producción de gotas de agua en el cultivo, en la matriz de arroz (15 días). El condensado es indicativo de que los conidios se encuentran maduros, ya en su forma más resistente, y listos para la cosecha.

5.3.2.1 Preparación de los contenedores para la fermentación sólida

Se colocaron 200 g. de arroz entero en bolsas de polipropileno. Posteriormente, se agregaron 200 mL de agua destilada por bolsa, doblando la bolsa para que no se regara el agua. El arroz se semi-esterilizó y precoció en autoclave a 121°C a una atmósfera de presión por 15 minutos. Después las bolsas se agitaron, para evitar aglomeraciones y se enfriaron a temperatura ambiente.

5.3.2.2 Inoculación de los contenedores

Se inoculó cada bolsa, de manera acéptica, con 50 mL del cultivo líquido. Una vez inoculadas las bolsas, se colocaron en una incubadora a 25 °C durante 6 días, se revisaron cada 2 días, rompiendo el micelio, aplicando presión en la bolsa cuidando de no romperla, para promover el crecimiento y producción enzimática del hongo. Pasados los seis días, el arroz fue sacado de la bolsa y pasado a bandejas plásticas, previamente desinfectadas con una solución concentrada de

hipoclorito de sodio y UV (15 min); con la finalidad de que el hongo continuara con la producción de conidios durante los días restantes de fermentación.

5.3.2.3 Cosecha

La cosecha se realizó cuando el hongo invadió completamente el arroz y formó condensados (aproximadamente 15 días), que son el indicativo de la presencia de conidios maduros. Finalmente el arroz con el hongo se liofilizó y se tamizó, con orificios de 100 μm de diámetro, esto con el fin de separar los conidios del sustrato. Se cuantificó la concentración celular por gramo de material y se evaluó la viabilidad como prueba de la calidad del material biológico inicial. Así mismo a los conidios obtenidos se les cuantificó la actividad enzimática de proteasas alcalinas, de *N*-acetilhexosaminidasa (NHAsas) y lipasas, azúcares reductores y proteínas solubles. Todos estos parámetros evaluados, sirvieron como referencia de partida y de comparación una vez que los conidios fueron sometidos a los diferentes tratamientos que se manejaron en este proyecto. Finalmente, los conidios fueron empacados en bolsas y almacenados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, todo en condiciones acépticas.

5.3.2.4 Viabilidad

Se sembró por césped una cantidad conocida de conidios en cajas Petri con SGA al 4% (p/v) más extracto de levadura 5 g/L; las cajas se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta alcanzar el número de colonias sembradas o con un máximo de 10 días, las cajas se monitorearon diariamente para contar el número de colonias presentes en cada una (Nuñez-Gaona *et al.*, 2010). La viabilidad se calculó dividiendo el número de colonias presentes por caja entre el número inicial de conidios, considerando que cada conidio tiene la capacidad de generar una UFC, reportándose como % de viabilidad. La ecuación es la siguiente:

$$V = \left(\frac{n}{N}\right) \times 100$$

Ecuación 1

Donde:

V = % de viabilidad conidial.

N=Número de células sembradas.

n = Número de colonias obtenidas.

5.4 PURIFICACIÓN DE POLÍMEROS

Los polímeros utilizados para la inmovilización fueron adquiridos de la empresa Sigma Aldrich Co. Quitosano de bajo peso molecular y alginato de baja densidad, fueron purificados y caracterizados previamente a su utilización, con el fin de eliminar cualquier material insoluble. A continuación se describe el procedimiento específico para cada polímero.

5.4.1 Quitosano

El quitosano (10 g) fue disuelto en ácido acético (0.2 M). La solución viscosa se filtró con un prefiltro de fibra de vidrio de 47 mm de diámetro (\emptyset), posteriormente se pasó por membranas de celulosa de tamaño de poro fue 3 μm , 1.2 μm , 0.8 μm de \emptyset para retener las partículas no solubles. Después de filtrar, la solución se precipitó con NaOH 1M para después centrifugarla (4000 rpm, 40 minutos, 27 °C). El exceso de sales fue retirado con lavados continuos de agua destilada hasta alcanzar una conductividad de 13.8 mS. Finalmente se realizaron lavados sucesivos con mezclas etanol-agua (50:50, 75:25, 90:10), solo etanol y uno final de acetona; con las condiciones de centrifugación ya descritas. El quitosano se secó a temperatura de 40 °C, hasta alcanzar un peso constante.

5.4.2 Alginato

Se realizó una solución de alginato de baja densidad con una concentración de 4 g/L, la cual se mantuvo en agitación hasta disolver completamente. Después la solución se puso en contacto con un intercambiador catiónico (amberlita activada en HCl) que se mantuvo en agitación constante por 5 min, posteriormente se retiró y se dejó en reposo por unos 20 min, después se filtró a través de membranas Millipore de tamaño de poro de 3 μm , 1.2 μm y 0.8 μm de \varnothing .

Después de filtrar se agregó NaCl 1M, con el fin de precipitar la solución, la solución se mantuvo en agitación hasta disolver por completo el NaCl, posteriormente se dejó reposar hasta observar aglomerados en la solución; para aumentar la precipitación se le agregó etanol (~1 L). Posteriormente se centrifugó (4000 rpm, 40 minutos, 27 °C) toda la solución con el fin de recuperar el alginato precipitado, el exceso de sales (NaCl) fue retirado con lavados de etanol-agua en diferentes proporciones (50:50, 75:25, 90:10), y un lavado final con etanol. Por último se secó en vacío hasta alcanzar un peso constante.

5.5 CARACTERIZACIÓN FÍSICO QUÍMICA DE LOS POLÍMEROS

A los polímeros purificados, quitosano y alginato, y a las cápsulas obtenidas se les realizaron diferentes pruebas con el fin de caracterizarlos parcialmente.

5.5.1 Quitosano

5.5.1.1 Grado de acetilación (valoración potenciométrica)

El grado de desacetilación representa la proporción de unidades de N-acetil-D-glucosamina con respecto al número total de unidades en el biopolímero y se puede considerar como una medida de la pureza del biomateria. La cantidad de grupos amino presentes en la cadena del polímero ayuda a entender y cuantificar

las interacciones con otros materiales en sus diversas aplicaciones (Barragán, 2016). Para esta técnica se realizó una solución de 40 mg de quitosano purificado en 30 mL de HCl 0.01 N, fue titulada con NaOH 0.1 N. Se utilizó quitosano de bajo peso molecular (7.6×10^4 g/mol), marca Sigma. La solución se mantuvo a 25°C y en agitación constante durante todo el análisis. Para tomar la lectura, se esperó 3 minutos entre cada adición de 0.1 mL de solución valorante. Esta prueba se realizó por triplicado (Argüelles-Monal, *et al.*, 2004).

Las ecuaciones 2, 3 y 4 fueron utilizadas en los cálculos para el grado de acetilación y desacetilación:

$$m_{eq} = \frac{m_{\text{quitosano}}}{V_{[\text{NaOH}]} \times [\text{NaOH}]} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$DD = \frac{203}{42.04 + m_{eq}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$DA = 1 - DD \times 10 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde 203 es la constante que representa el peso molecular de la fracción de 2-acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)-glucopiranososa y 42.04 es la diferencia entre los pesos moleculares de ambas fracciones; m_{eq} son los miliequivalentes de la muestra, DD es el grado de desacetilación y DA es el grado de acetilación de la muestra, $V_{[\text{NaOH}]}$ y $[\text{NaOH}]$ es el volumen y la concentración de NaOH utilizados.

5.5.1.2 Grado de acetilación (valoración conductimétrica)

Se realizó una solución que contenía 40 mg de quitosano purificado en 30 mL HCl 0.01N más 15 mL de agua destilada, la solución fue valorada con NaOH 0.1 N. La solución se mantuvo a 25°C y en agitación constante durante todo el análisis. Para

tomar la lectura, se esperó 3 minutos entre cada adición de 0.1 mL de solución valorante. Los valores de conductancia (mScm^{-1}) con los volúmenes de la solución titulante se trazaron en un gráfico para encontrar la variación lineal antes y después del punto de equivalencia. La intercepción de las pendientes con ángulo agudo proyectado en el eje de las abscisas, proporciona el volumen correspondiente del punto de equivalencia. Esta prueba se realizó por triplicado (Argüelles-Monal, *et al.*, 2004).

5.5.1.3 Peso molecular viscosimétrico promedio

Se utilizó la técnica descrita por Rinaudo *et al.*, (1993), preparando 12 mL de solución polimérica, con quitosano purificado (0.001 g/mL) disuelto en solución de Rinaudo (0.3 M AcOH + 0.2 M AcONa), ambas soluciones se filtraron en membranas de 0.2 μm antes de los experimentos. Posteriormente se procedió a determinar el tiempo de caída del disolvente, solución de Rinaudo, y de la disolución polimérica, también se determinó el tiempo de caída de la solución polimérica al ir añadiendo disolvente (1, 1.5, 2 y 2.5 mL).

Se calculó el peso molecular promedio a partir de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, la cual relaciona al peso molecular promedio de una muestra polimérica con la viscosidad intrínseca:

$$[\eta] = KM_v^a \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

\bar{M}_v Es el peso molecular promedio viscosimétrico

K y a son constantes que dependen de la naturaleza del polímero, del solvente utilizado y de la temperatura.

η Se refiere a la viscosidad intrínseca

A partir de la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada, se calculó el peso molecular del polímero.

Despejando \bar{M}_v de la ecuación 6:

$$M_v = \frac{a \sqrt{[\eta]}}{\sqrt{K}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Los valores de a y K , son constantes determinadas para cada biopolímero dependiendo del grado de acetilación, en el caso del quitosano, los valores utilizados fueron $a=0.76$ y $k=0.076$ mL/g. El procedimiento se realizó por triplicado.

5.5.2 Alginato

5.5.2.1 Relación grupos β -D-manurónico y α -L-gulurónico (M/G) (espectroscopia infrarroja)

La estructuración del ácido algínico y la proporción de los bloques ácidos β -D-manurónico (M) y α -L-gulurónico (G), le confiere diferentes propiedades físicas a los alginatos, las cuales se ven reflejadas en la viscosidad y fuerza del material; lo que determina el uso que puede dársele a los alginatos. Es por eso que se analizó el alginato purificado, mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier. Los espectros infrarrojos fueron obtenidos con un equipo Thermo Scientific modelo Nicolet iS50 FT-IR. Se empleó el método descrito por (Filippov and Kohn, 1974), para estimar la relación M/G del alginato:

$$\frac{M}{G} = \left(\frac{A_{1320}}{A_{1290}} \right) \quad \text{Ecuación 7}$$

5.5.2.2 Peso molecular viscosimétrico promedio

El peso molecular de la misma manera le confiere diferentes propiedades físicas a los alginatos, que se reflejan en las propiedades del material; por esta razón necesitan ser conocidas. Para esta medición se prepararon 15 mL de solución de alginato purificado (0.001 g/mL) disuelto en NaCl 0.1 M; todas las soluciones se filtraron en membranas de 0.2 μm antes de los experimentos. Posteriormente se determinó el tiempo de caída del disolvente (NaCl 0.1 M), de la disolución polimérica, así como de las diluciones sucesivas al agregar disolvente NaCl 0.1 M (1, 1.5, 2 y 2.5 mL) (Martinsen *et al.*, 1991). Del mismo modo se utilizó la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada para calcular el peso molecular promedio del alginato, se utilizan los valores de $a=0.92$ y $K=0.073\text{mL/g}$.

5.6 INMOVILIZACIÓN DE CONIDIOS

Se probaron dos técnicas de encapsulación (GI, FCPE), con dos diferentes concentraciones de conidios (7×10^5 y 7×10^7) y con dos diferentes temperaturas de almacenamiento (4 °C, 25 °C).

Inmovilización por GI: Se evaluó la formación de las cápsulas a dos valores de pH de la solución de quitosano, el primero a pH 1.5, que garantiza la completa protonación de los grupos amino, y el segundo a pH 4, que es un valor recomendado por la literatura para el crecimiento del hongo.

Inmovilización por formación de CPE: Se realizó en dos etapas. La primera fue una gelificación ionotrópica del alginato en una solución de cloruro de calcio. El pH de la solución fue de 5.6. La segunda fue recubrir las esferas con una solución de quitosano, para la formación del CPE.

Las cápsulas se realizaron con una bomba peristáltica MINIPULS3 marca Gilson, velocidad 1.85 ($7.4 \times 10^{-3}\text{mL/s}$), acoplada a una aguja de jeringa hipodérmica calibre 21G (0.8 mm de diámetro) para mantener el goteo continuo de la solución

polimérica. Las gotas del polímero se dejaron caer en una solución de la sal entrecruzante (TPP para quitosano y CaCl₂ para alginato); las cápsulas formadas se mantuvieron en el medio de entrecruzamiento durante una hora manteniendo una agitación suave y continua.

Los materiales producidos fueron lavados varias veces con agua desionizada, hasta disminuir la conductividad del agua de lavado a un valor $\leq 3 \mu\text{S}$, para eliminar los compuestos que no reaccionaron en el proceso de encapsulación. Solo las esferas de alginato se incorporaron a una solución de quitosano justo después de los lavados, donde se mantuvieron durante una hora para formar de esta manera una doble capa en la cápsula. Finalmente, las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido y liofilizadas durante 24 horas.

Tabla 3. Condiciones de encapsulación utilizadas para la elaboración de cápsulas de Quitosano-TPP (GI).

Tratamiento	Quitosano (%)	TPP (%)	Agente Controlador (%)	Sustrato (%)
Qv	2	1.5	-	-
Q+C	2	1.5	10	-
Q+C+Ch	2	1.5	10	0.25

Q: quitosano, v, indica cápsulas sin carga, C: al agente controlador (*Beauveria bassiana* 885.2), y Ch: sustrato (chapulín seco, molido y tamizado).

Tabla 4. Condiciones de encapsulación utilizadas para la elaboración de cápsulas de complejos polielectrólitos (CPE).

Tratamiento	Alginato (%)	CaCl ₂ (%)	Quitosano (%)	Agente Controlador (%)	Sustrato (%)
Av	2	1	0.2	-	-
A+C	2	1	0.2	10	-
A+C+Ch	2	1	0.2	10	0.25

A: alginato, v, cápsulas vacías, C: al agente controlador (*Beauveria bassiana* 885.2), y Ch: al sustrato (chapulín seco, molido y tamizado).

5.7 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS CÁPSULAS

5.7.1 Evaluación del tamaño y morfología de las microcápsulas

La observación de las cápsulas húmedas, después del proceso de lavado, y secas, después del proceso de liofilización, se realizó con ayuda de un microscopio óptico invertido con cámara acoplada, la medición de las cápsulas fue realizada con ayuda del software ToupView.

5.7.2 Hinchamiento por gravimetría (W)

Se evaluó la capacidad de las cápsulas, obtenidas de todos los tratamientos, para absorber agua, cuando se encuentran completamente sumergidas. Se analizó la ganancia en peso, de las cápsulas al estar a una humedad conocida, con respecto al tiempo (W), mediante gravimetría. De esta manera se conocería con más exactitud el tiempo mínimo de espera, a una humedad determinada (80 %), para que las cápsulas alcancen la absorción máxima. Se colocaron aproximadamente 20 ± 1 mg de cápsulas liofilizadas de cada tratamiento, en charolas de 41x41x8 mm. Posteriormente fueron sumergidas en agua destilada a 25 °C. La ganancia en peso, debido a la absorción de solvente, fue registrada a diferentes tiempos hasta alcanzar el equilibrio. Cada tratamiento fue evaluado por triplicado. Como solvente se utilizó agua bidestilada.

5.7.3 Absorción de vapor

Se pesó 20 ± 1.0 mg de muestra de cada tratamiento. Se secó en la estufa a 60 °C por 12 horas. Las muestras fueron pesadas para tomar el dato como el tiempo inicial o tiempo cero ($t=0$). Posteriormente las muestras fueron colocadas en un ambiente saturado de humedad (~80 a 85 % de humedad) a 25°C. La absorción de vapor se registró siguiendo el cambio en el peso de las muestras en períodos establecidos. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

5.7.4 Medición de la porosidad de las cápsulas.

Se evaluó la porosidad de todas las cápsulas utilizando un porosímetro (NOVA[®] 2200e Quantachrome[®] surface area & pore size analyzer), para obtener el área superficial, el volumen de poro y tamaño de poro; mediante el método de sorción de N₂ utilizando el modelo BET (Brunauer-Emmett-Teller).

5.8 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS CÁPSULAS

Estas pruebas consistieron en observar el comportamiento de las cápsulas y la reacción del microorganismo, con el fin de encontrar una mejora en los tratamientos con respecto a los conidios sin encapsular.

5.8.1 Comportamiento y biodegradación de las cápsulas *in vitro*

Se colocó una cápsula de cada tratamiento en una caja Petri con medio de cultivo SBG 4%. El crecimiento del hongo fue monitoreado por observación visual hasta la germinación del micelio en un ambiente húmedo (~ 80 % humedad). Cada tratamiento se evaluó por triplicado.

5.8.2 Estudios de estabilidad

Las cápsulas se almacenaron en refrigeración (4°C) y a temperatura ambiente. Se evaluaron durante un período de 2 meses, y se observó su viabilidad, con la metodología del apartado 7.2.3.6. Se utilizó un peso conocido de cápsulas, y la concentración de conidios inoculados en cada medio de cultivo.

Durante el conteo de conidios, aquellos que mostraron un tubo germinativo de longitud mayor al diámetro del conidio fueron clasificados como germinados.

5.8.3 Análisis químicos de los extractos enzimáticos conidios y encapsulados

5.8.3.1 Obtención de los extractos

Los extractos crudos a partir de las blastosporas se obtuvieron mediante la filtración del medio de cultivo con la ayuda de una bomba de vacío a través de un filtro Whatman N°41 para recuperar la biomasa y obtener la fracción líquida a la cual se le cuantificó la concentración volumétrica de las enzimas de mayor importancia en la patogenicidad de los HEP.

Los extractos enzimáticos de los conidios (blanco o control) y de los encapsulados se obtuvieron mediante la resuspensión de las cápsulas (10 mg) en agua destilada estéril (3-5 mL). Los conidios del blanco fueron resuspendidos en agua destilada estéril. A las cápsulas se les realizó adicionalmente un daño mecánico con una varilla de vidrio estéril para causar la ruptura y liberar el contenido de las cápsulas, los conidios y las enzimas.

5.8.3.1.1 Determinación de proteasas alcalinas

Se determinó utilizando como sustrato una solución de caseína al 1 % (p/v) en amortiguador de fosfatos (50 mM, pH 7). Un volumen de 500 μ L del sustrato se incubó con 75 μ L de los extractos enzimáticos, a 25 °C por 1 h y 180 rpm. Finalizado el tiempo, la reacción se detuvo agregando ácido tricloroacético al 5 % (p/v) y se centrifugó a 11500 rpm durante 10 min. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 280 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.001 unidades de absorbancia por minuto, bajo las condiciones descritas (Kunitz, 1947).

5.8.3.1.2 Determinación de actividad *N*-acetilhexosaminidasa (NHasas)

A 200 μ L de extracto enzimático crudo se le adicionaron 200 μ L de amortiguador de citratos-fosfatos (0.2 M, pH 5.6) y posteriormente, 200 μ L de solución de *p*-nitrofenil-*N*-acetil- β -*D*-glucosaminida (pNAG) a 1.0 mg/mL. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C y 180 rpm durante una hora, la reacción se detuvo con la adición de 1 mL de NaOH 0.02 M. Después de agitar, se midió la absorbancia a 405 nm. La cuantificación de *p*-nitrofenol liberado se determinó mediante una curva patrón. La actividad *N*-acetilhexosaminidasa (NHasa) se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenol por mL de enzima por minuto bajo las condiciones de reacción (Tronsmo & Harman, 1993).

5.8.3.1.3 Determinación de actividad lipasa

Se midió el aumento en la absorbancia a 348 nm la cual se produce por la liberación de *p*-nitrofenol en la hidrólisis de 4-nitrofenil-butirato 0.4 mM en amortiguador de fosfato de sodio (25 mM, pH 7) a 25 °C. La reacción se inició añadiendo 0.05 mL de solución del extracto enzimático a 2.5 mL de solución de sustrato. Una unidad de actividad *p*-nitrofenil butirato (pNPB) se definió como la cantidad de enzima necesaria para hidrolizar 1 μ Mol de pNPB por minuto (UI) bajo las condiciones descritas (Palomo *et al.*, 2002).

5.8.3.1.4 Determinación de proteína soluble extracelular

La concentración de proteína soluble en el extracto enzimático se determinó mediante el método de micro ensayo de Bradford, empleando una curva patrón de seroalbúmina bovina como estándar. La concentración se reportó como μ g de proteína/mL (Bradford, 1976).

5.8.3.1.5 Determinación de azúcares reductores

La cuantificación de azúcares reductores se realizó como una determinación indirecta de la actividad NHasa mediante la modificación del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) empleando una curva patrón de *N*-acetilglucosamina. (Miller, 1959).

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se realizó para los datos experimentales una prueba ANOVA simple con una comparación de medias de Tukey y una confiabilidad de $\alpha=0.05$ ($p \leq 0.05$). Se utilizó el programa MINITAB en la versión 16.1.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 AGENTE CONTROLADOR

Los conidios usados para la encapsulación tenían una concentración inicial de $5.16 \times 10^{16} \pm 0.16$ conidios/mg con un porcentaje de viabilidad del 80%. Por medio de microscopía óptica se observó que la morfología de los conidios es esférica (Figura 6), con un diámetro de $\sim 3.9\text{-}4.9 \mu\text{m}$.

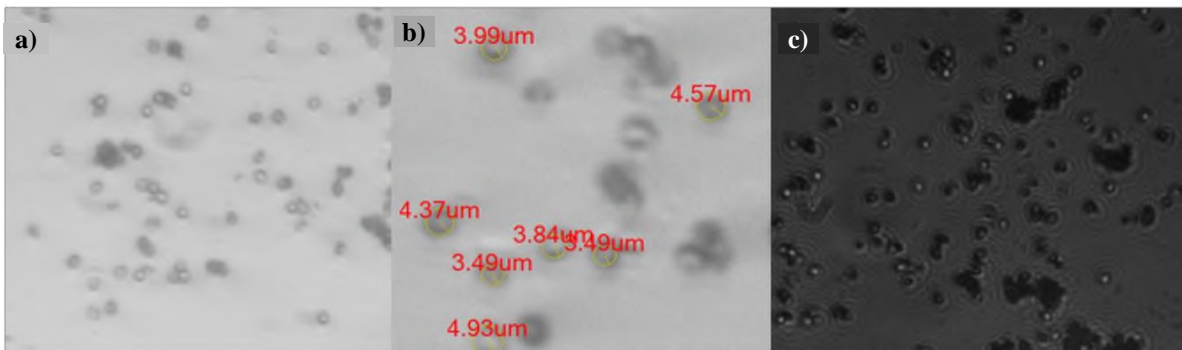


Figura 6. Microscopía de *Beauveria bassiana*. a,b) Conidios visto con campo claro a 10X. c) Conidios vistos en campo oscuro a 10X, los conidios suelen presentar un ligero brillo.

Diversos autores (Park, 1998; Shah, Wang & Butt, 2005; Li *et al.*, 2010; Fan *et al.*, 2010, 2012; Lizeth, 2013; Qiu *et al.*, 2013; Mascarín *et al.*, 2013; Gouli, Gouli & Kim, 2014) han reportado en trabajos similares de encapsulación una concentración inicial de conidios de 2.35×10^5 a 18.2×10^5 conidios/mg ó 1×10^8 conidios/mL (González *et al.*, 2007), con una viabilidad del 85 al 90%. Esto sirvió como base para tomar la concentración de partida y la viabilidad aproximada de inicio.

6.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS POLÍMEROS DE PARTIDA

6.2.1 Quitosano.

Tanto el nivel intrínseco (grado de desacetilación, peso molecular, pureza y humedad) y extrínseco (condiciones de almacenamiento ambiental, procesamiento térmico, esterilización y procesamiento que implica disolución ácida) son parámetros cruciales que afectan la estabilidad de las formulaciones basadas en

quitosano. Como no existen aún principios universales para preservar los productos basados en quitosano durante el almacenamiento. Los estudios de pre formulación y condiciones de almacenamiento son esenciales para proporcionar una máxima estabilidad (Szymańska & Winnicka, 2015).

A continuación se presentan las características iniciales de las muestra de quitosano usado para la formación de las cápsulas (Tabla 5). Estos valores se determinaron por valoraciones potenciométricas, conductimétricas, y FTIR, para conocer el valor inicial del material de partida y tener un punto de comparación. Un ejemplo de ello es el peso molecular (PM), responsable de varias propiedades fisicoquímicas y biológicas, como la hidrofiliidad, la viscosidad, la capacidad de absorción de agua, la biodegradabilidad y la adhesión.

Tabla 5. Parámetros de caracterización inicial del quitosano, material usado para la encapsulacion mediante GI.

Muestra	Grado de acetilación (%DA)		Grado de desacetilación (%DD)		Peso molecular g/mol
	Pot	Cond	Pot	Cond	
Quitosano de bajo peso molecular de cáscara de camarón (Sigma)	15.3 ±1.2	15.5 ±3.2	84.7 ± 1.2	84.4± 3.2	7.6 x 10⁴
Promedio	15.4		84.5		

pot.=potenciometría; cond.=conductimetría; meq= miliequivalentes

La presencia de grupos altamente reactivos en la estructura del quitosano, como son los grupos amino, se mide mediante el grado de acetilación, que corresponde al porcentaje de grupos amino. En la Figura 7 se muestran las curvas obtenidas en el análisis potenciométrico (azul) y conductimétrico (negro). El análisis potenciométrico presenta una curva de titulación con dos puntos de inflexión; en el primero se lleva a cabo la neutralización del exceso de ácido, mientras que la neutralización de los grupos amino protonados de la muestra aparece con el segundo punto. Siendo estos dos puntos de inflexión el comportamiento típico

durante la titulación potenciométrica del quitosano para obtener el grado DD según Zhang *et al.* (2011). El grado de desacetilación (DD) se define como la fracción molar de unidades desacetiladas en la cadena del polímero. Este valor está estrechamente relacionado con la calidad y las propiedades químicas del quitosano. Por ejemplo, los productos con diferentes valores de DD tienen diferente solubilidad, viscosidad, capacidad de intercambio de iones, capacidad de floculación y reacción con el grupo amino (Liu *et al.*, 2003).

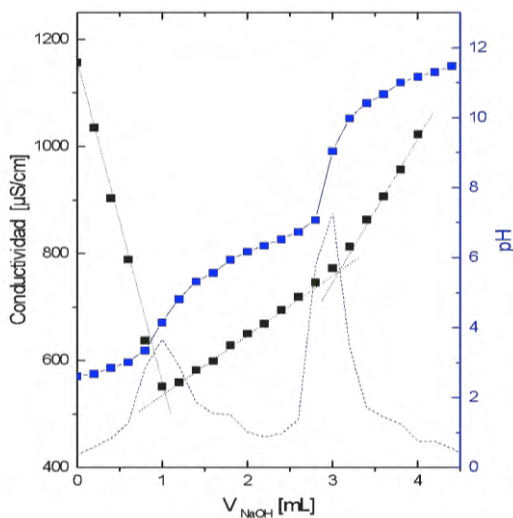


Figura 7. Curvas de titulación típicas para el quitosano mediante conductimetría (■--■--■--■) y potenciometría (■--■--■--■). Líneas que muestran el cambio en la pendiente de la gráfica de conductimetría (.....) y 1ra derivada para la gráfica de potenciometría (.....).

El análisis conductimétrico, se basa en la alta conductancia de los iones hidrógeno (H^+) e hidroxilo (OH^-), por ser los iones más conductivos (dos Santos *et al.*, 2009; de Alvarenga, Pereira de Oliveira & Roberto Bellato, 2010). En esta técnica se calculan los cambios mediante la intersección de líneas rectas en esos puntos que representan el volumen de NaOH necesario para neutralizar los grupos amino presentes en la molécula. En la Figura 7 (color negro) el primer punto de equivalencia corresponde a la neutralización del ácido (en exceso) y el segundo punto corresponde a la neutralización del grupo amino.

6.2.2 Alginato

Las características iniciales de la muestra de alginato usado para la formación de las cápsulas son mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros de caracterización inicial del alginato, material usado para la encapsulación mediante FCPE.

Muestra	G	M	M/G	Peso molecular [g/mol]
	%	%		
Alginato de baja densidad (Sigma)	46%	54	1.17	$1.2 \times 10^5 \pm 0.007$

M: β -D-manurónico; G: α -L-gulurónico;
FCPE: Formación de complejos polielectrolitos

El cálculo de los valores de la Tabla 6 se realizó empleando la relación M/G, del método de Filippov & Kohn, (1974), el cual emplea preferentemente la relación entre las absorbancias de las bandas a 1320 y 1290 cm^{-1} (A_{1320}/A_{1290}).

El peso molecular tiene un impacto significativo en algunas de las propiedades del encapsulado de alginato, incluyendo la estabilidad, la resistencia mecánica, la permeabilidad, la biodegradabilidad y lo más importante la formación de la cápsula (Mazzitelli *et al.*, 2013).

6.3 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LAS CÁPSULAS

6.3.1 Morfología de las cápsulas

Por medio de microscopía óptica se observó la morfología y el tamaño de las cápsulas obtenidas en húmedo y después de ser sometidas a un proceso de liofilización; para los dos métodos de obtención utilizados, GI y CPE.

De manera general para ambos procesos de encapsulación se puede establecer que las cápsulas húmedas, (Figura 8 a, b y c; Figura 10 a, b y c), muestran una

aparición preferentemente esférica, excepto aquellas muestras que sólo contenían conidios (Figura 8b) donde se apreció una ligera forma ovoidea. En todos los tratamientos los bordes de las cápsulas podían verse bien delimitados, también se podía apreciar la transparencia de la cápsula, permitiendo observar claramente hacia el interior. En todos los tratamientos donde se inmovilizó conidios o conidios más sustrato, se aprecia que la distribución del material inmovilizado es uniforme, debido a la presencia de manchas o puntos negros dispersos dentro de toda la cápsula (Figura 8 b-c y 10 c).

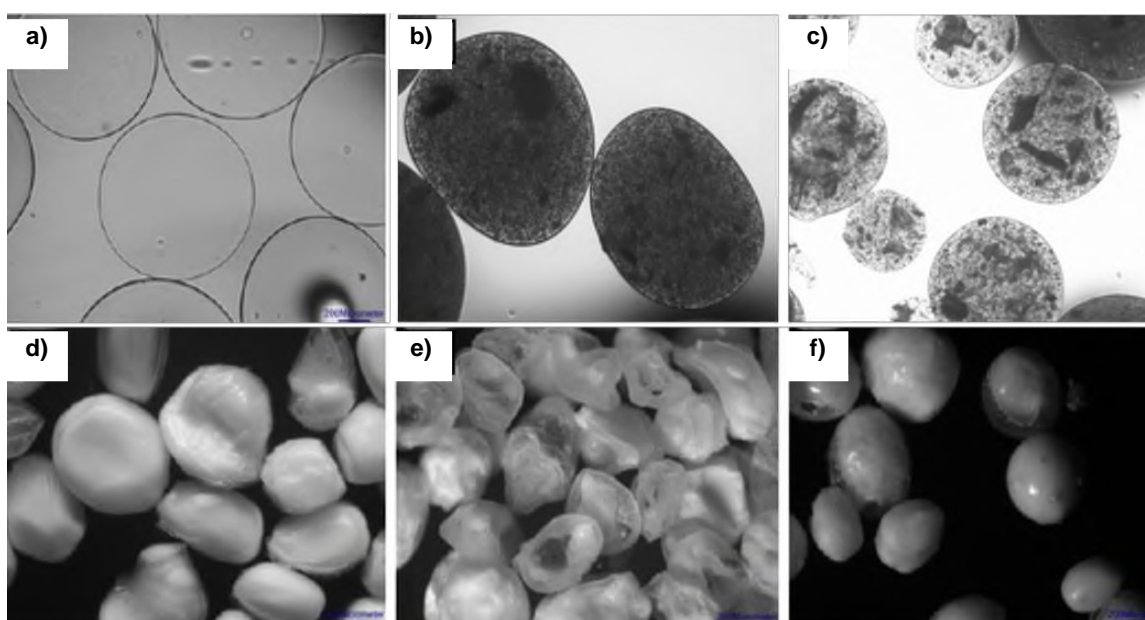


Figura 8. Morfología de cápsulas de quitosano-TPP, observadas mediante microscopía óptica, a 4X. Esferas húmedas: a) Qv, b) Q+C, c) Q+C+Ch; esferas secas mediante liofilización: d) Qv, e) Q+C, f) Q+C+Ch.

Las esferas húmedas fueron congeladas en nitrógeno líquido, y colocadas en el liofilizador para su secado. Después del proceso de secado, todas las partículas muestran un cambio significativo en la morfología, donde la mayoría presenta una forma de elipse. Los tratamientos de GI a pH 1.5, de acuerdo a las imágenes (Figura 9), podemos dilucidar que las muestras vacías (Qv) son predominantemente esféricas, mientras que las muestras Q+C y Q+C+Ch, muestran una forma elíptica, esto pudo deberse al aumento de viscosidad debido a la inclusión del agente controlador y el sustrato en la solución inicial de

quitosano. Como ya se menciono anteriormente, se observa una distribución uniforme del material inmovilizado, en cuanto a la presencia de partículas de mayor tamaño, estas pueden corresponder a partículas del medio de fermentación sólido (arroz) y al chapulín; sin embargo, no se considera como un factor que pueda interferir en la viabilidad del hongo debido a que sigue siendo un sustrato que el microorganismo puede degradar.

Por otro lado, las muestras secas presentan una apariencia lisa, sin poros visibles. Sin embargo algunas cápsulas se notan colapsadas (Figura 8 d, e y f) esto muestra una fuerte influencia del proceso de secado sobre la morfología de las muestras secas. Lo que nos indica que no en todos los casos el proceso de liofilización fue eficiente. Esto puede deberse a un fallo en la etapa de congelación que tendría efecto sobre la nucleación de los cristales de hielo, previos a la liofilización (Franks, 1998). Sin embargo, es importante hacer notar que las muestras tienen la capacidad de recuperan su morfología esférica inicial durante el proceso el hinchamiento.

La Figura 9 muestra la comparación entre la morfología a dos valores de pH's con mediante GI. En los tratamientos de GI a pH 4, se observó que el aumento en el pH de la solución de quitosano tiene como consecuencia cambios significativos de los tamaños de muestra de las cápsulas obtenidas (Figura 9). Del mismo modo, podemos observar que la morfología de las cápsulas formadas a pH 4 presenta una apariencia lisa y cristalina ligeramente colapsada en la morfología.

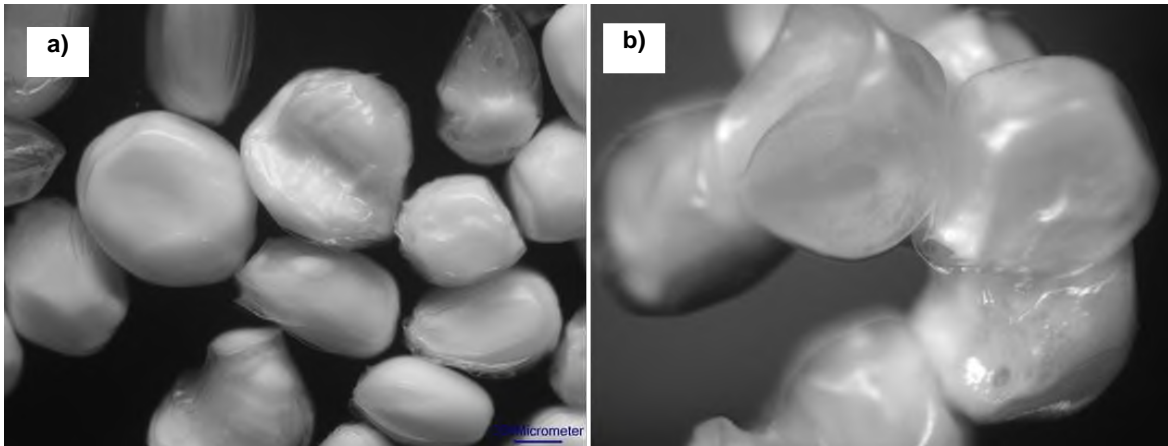


Figura 9. Morfología de cápsulas de GI microscopía óptica, 4X. Esferas liofilizadas a) Qv; pH 1.5, b) Qv; pH 4.

Las esferas húmedas hechas mediante FCPE (Figura 10 a, b y c) presentan un patrón similar a las cápsulas de *GI*, sin embargo, la principal diferencia es la presencia de una segunda capa, que se hace mucho más evidente en *Av* (Figura 10 a), que aparece cuando las esferas de alginato entran en contacto con la solución de quitosano. Cuando las muestras están secas (Figura 10 d, e y f), se aprecian diferencias en la superficie en comparación con las cápsulas *GI*. En este caso las irregularidades son más marcadas en la superficie de las cápsulas, podemos observar presenta una apariencia áspera y arrugada. Lo que nos hace pensar que del mismo modo que en algunas muestras de *GI*, el proceso de congelamiento pudo afectar morfológicamente a las cápsulas (Franks, 1998).

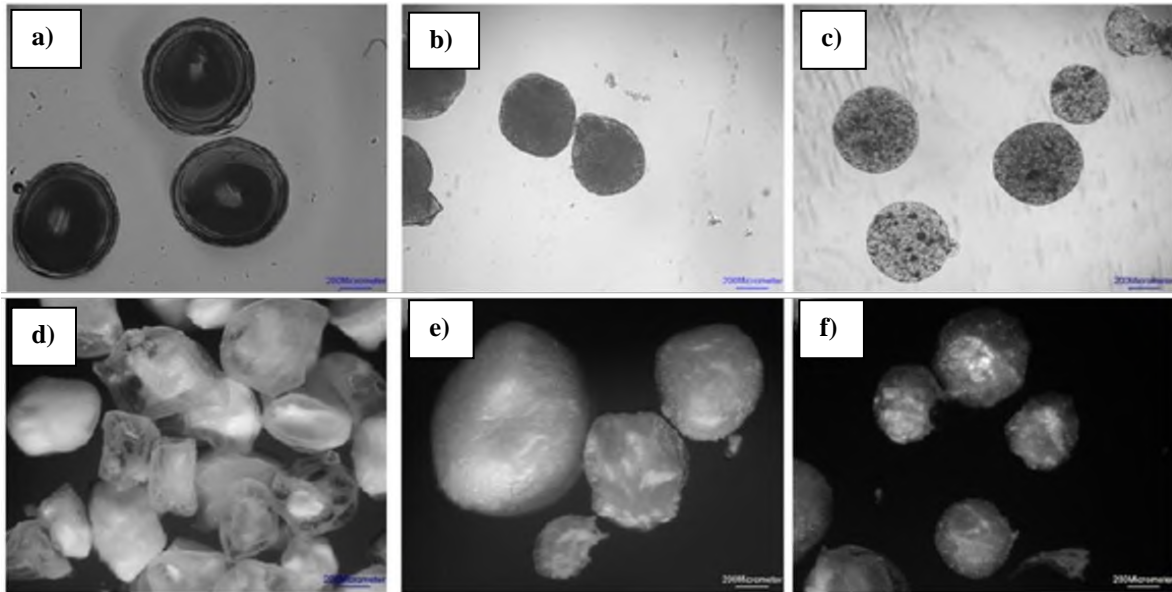


Figura 10. Morfología de cápsulas de alginato mediante microscopía óptica, 4X. Esferas húmedas: a) Av, b) A+C, c) A+C+Ch; esferas secas mediante liofilización: d) Av, e) A+C, f) A+C+Ch.

6.3.2 Tamaño de las cápsulas

Se realizó el análisis de tamaño de las muestras secas, tomando en cuenta una muestra de 100 cápsulas. Para aquellas micropartículas que presentaron forma elíptica, el análisis de tamaños se realizó de acuerdo a la longitud del eje más largo de la cápsula. Cada clase se organizó, considerando una diferencia de 50 unidades, es decir, la longitud menor más 50 micras.

En el histograma de frecuencia para las cápsulas de GI, se observa que el tamaño general se encontraba en un rango de distribución que va desde 300 a 900 μm (Figura 11).

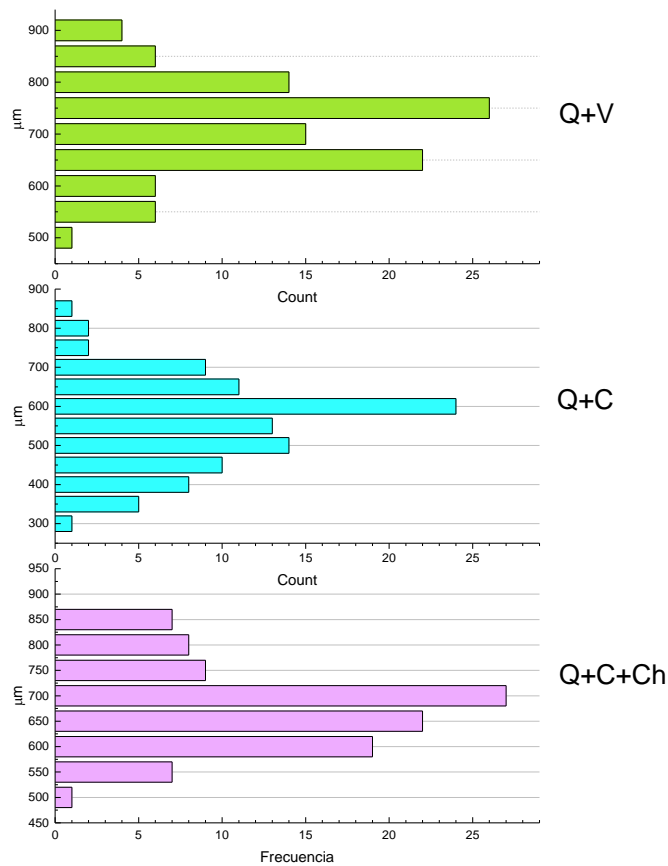


Figura 11. Dispersión del tamaño de las cápsulas de GI. Tratamientos: ■Qv, ■Q+C, ■Q+C+Ch.

Las cápsulas de quitosano-TPP, no presentan diferencias significativas, sin embargo, Q+C+Ch muestran el menor rango de dispersión de tamaño, de 500 µm a 850 µm (Figura 11). Debido a la variedad de tamaños observados, se muestra que este proceso de formación de cápsulas da como resultado partículas micrométricas con una distribución de tamaños poli dispersa.

Las cápsulas de alginato oscilan, en cuanto a tamaño, en un rango de 300 a 900 µm (Figura 12). Entre los tamaños de las cápsulas de Av y A+C, no existe diferencia significativa en cuanto al tamaño promedio, mientras que A+C+Ch es estadísticamente más pequeño, entre 350 a 550 µm (Figura 12).

En la literatura se reporta gran variedad de tamaño para la encapsulación de HEP. Entre ellos se encuentra Gerding-González *et al.* (2007) quien obtuvo cápsulas entre 2 y 3 mm de diámetro, Batista *et al.* (2014) con cápsulas de 650 y 1150 μm y (Wu *et al.*, 2012) con encapsulados de 980-1300 μm ; encapsulando *B. bassiana*; en este trabajo se lograron obtener tamaños de muestra menor.

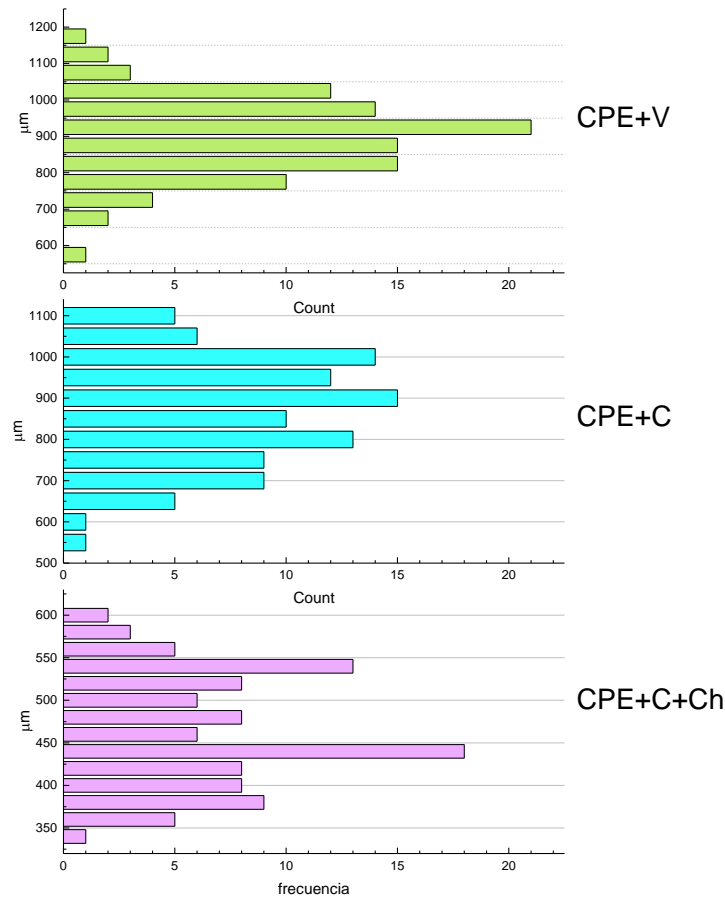


Figura 12. Dispersión del tamaño de las cápsulas de CPE. ■ Qv, ■ Q+C, ■ Q+C+Ch.

De acuerdo a los valores obtenidos en la Tabla 7 se observan tamaños promedio inferior a 1mm, es decir, en el rango micrométrico. De acuerdo a la medición en todos los casos se produjeron materiales de tamaño micrométrico en promedio, cuyos valores oscilan en un rango de 453-971 μm ; también se observa que existe diferencia significativa entre los tamaños de las cápsulas en casi todos los tratamientos (superíndice a, b, c, d), es decir, el tamaño si cambia en esos tratamientos. Lo que no sucede con los superíndices e y f, donde estadísticamente el tamaño no difiere a pesar de la dispersión de tamaño.

Tabla 7. Tamaño de cápsulas secas por liofilización de las cápsulas hechas mediante gelificación ionotrópica (GI) y formación de complejos polielectrólitos (FCPE) en función del valor de pH.

Cápsulas	Quitosano-TPP, pH 1.5	Quitosano-TPP, pH 4	Alginato-CaCl, pH 4
	Tamaño	Tamaño	Tamaño
(v)	692.30±10.48 ^e	809.85±26.57 ^f	900.50±10.48 ^a
(+C)	531.65±11.02 ^e	970.87±12.21 ^f	844.32±12.8 ^b
(+C+Ch)	658.20±8.13 ^d	940.78 ±45.70 ^f	455.62±6.53 ^c

Cápsulas: (v) vacías; (+C) con agente controlador; (+C+Ch) con agente controlador y chapulín.

6.3.3 Identificación química de los compuestos mediante FTIR

Para confirmar el entrecruzamiento de los materiales, se obtuvieron espectros FTIR de los materiales vacíos obtenidos. Los datos arrojados de las cápsulas vacías se compararon con espectros de los polímeros empleados en su elaboración.

La Figura 13 presenta los espectros FTIR del quitosano y de las cápsulas vacías de GI, Qv. En el espectro de quitosano se pueden apreciar las bandas características del polímero, a 3363 cm⁻¹ una banda que corresponde a los grupos OH, a 3286 cm⁻¹ del grupo N-H, a 1651 cm⁻¹ la presencia la banda de amida I, a 1580 cm⁻¹ se aprecia la señal asociada al doblaje del grupo -NH₂, a 1317 cm⁻¹ la banda que corresponde a la amida III. Por otro lado el espectro de las cápsulas formadas por gelificación ionotrópica, Qv, se observa un desplazamiento de las bandas de los grupos OH y N-H hacia 3199 cm⁻¹, lo cual se asocia a un incremento en puentes de hidrógeno debidos al entrecruzamiento, además en las microcápsulas la banda del amida I se desplaza a 1631cm⁻¹ y la de 1580 cm⁻¹ desaparece y aparece una nueva banda a los 1530 cm⁻¹ esto se atribuye a la unión entre los grupos fosfato y los iones amina (Hu *et al.*, 2008), lo que refleja que los grupos NH₂ se entrecruzan con los grupos fosfato del TT (Bhumkar & Pokharkar, 2006; Dimzon& Knepper, 2015).

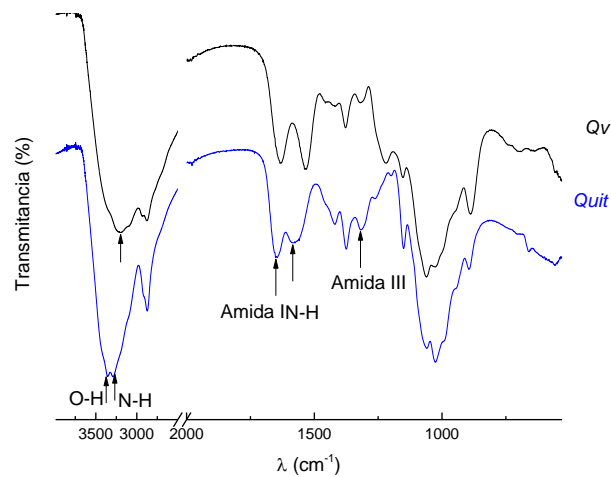


Figura 13. Espectro FT-IR de los polímeros, Quit -) quitosano, así como de las cápsulas vacías, Qv -).

Por su parte, en la Figura 14, podemos observar en el espectro del alginato, quitosano y las cápsulas vacías de CPE, en el espectro de quitosano la presencia de una banda amplia a los 3254 cm^{-1} que corresponde a los grupos hidroxilo, y los picos característicos a 1593 cm^{-1} y 1404 cm^{-1} , debidos a las vibraciones simétricas y asimétricas (stretching) de los grupos COO^- , respectivamente, mientras que en Av, después de la formación del CPE, estas mismas bandas se desplazan a 1589 cm^{-1} y 1411 cm^{-1} y reducen su intensidad, lo cual se puede deberse principalmente a la formación de enlaces entre el alginato y el cloruro de calcio o bien a la formación del CPE con el quitosano.

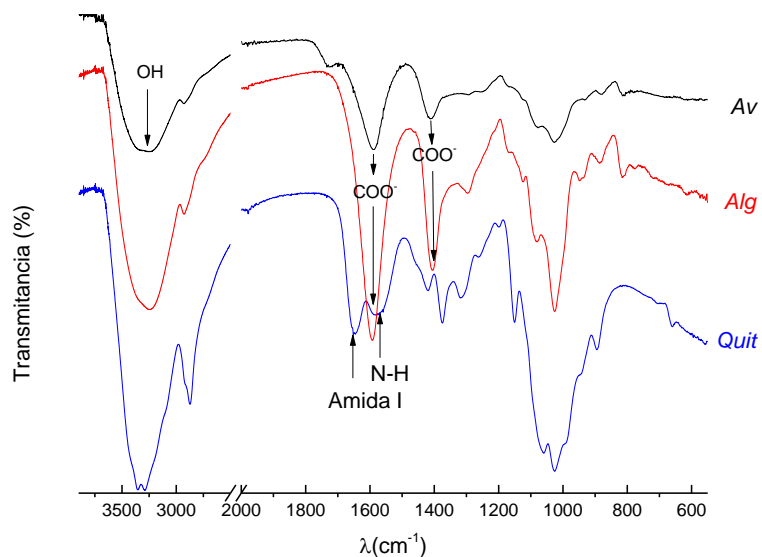


Figura 14. Espectro FT-IR de los polímeros, espectro del alginato (Alg -), quitosano (Quit -) y las cápsulas vacías (Av -) de CPE.

Esto nos puede indicar que los grupos carboxilo de alginato cargados negativamente podrían estar interactuando con los cationes (Ca^{++} y grupos amino del quitosano). Por lo tanto, esos enlaces de hidrógeno intermolecular causan numerosos puntos de contacto para la creación de la red y demuestran la formación de matrices poliméricas similar a lo reportado por Batista *et al.* (2014). Por otro lado podemos observar la ausencia de bandas propias del quitosano en Av, lo que puede indicar un agotamiento de los grupos amino durante la formación del complejo, o bien que, la concentración de quitosano en la formulación de las microcápsulas es tan baja, que las señales del alginato se superponen a las de quitosano.

6.3.4 Porosidad

El área superficial específica de las cápsulas secas (CI y CPE) se midió por el método de sorción de N_2 utilizando el modelo BET (Brunauer-Emmett-Teller). La Figura 15 muestra las isotermas de adsorción de N_2 para los diferentes tratamientos realizados. De acuerdo a la forma obtenida durante el análisis de adsorción-desorción de N_2 , para los tratamientos GI, el comportamiento puede

clasificarse del tipo IV con un bucle de histéresis, éste comportamiento se asocia a un proceso de condensación capilar por lo cual podemos suponer que se trata de materiales mesoporosos de múltiples capas según lo reportado por (Sing, 1985). Sin embargo, se observan claras diferencias en el comportamiento del proceso de adsorción-desorción en función del polímero utilizado para encapsular.

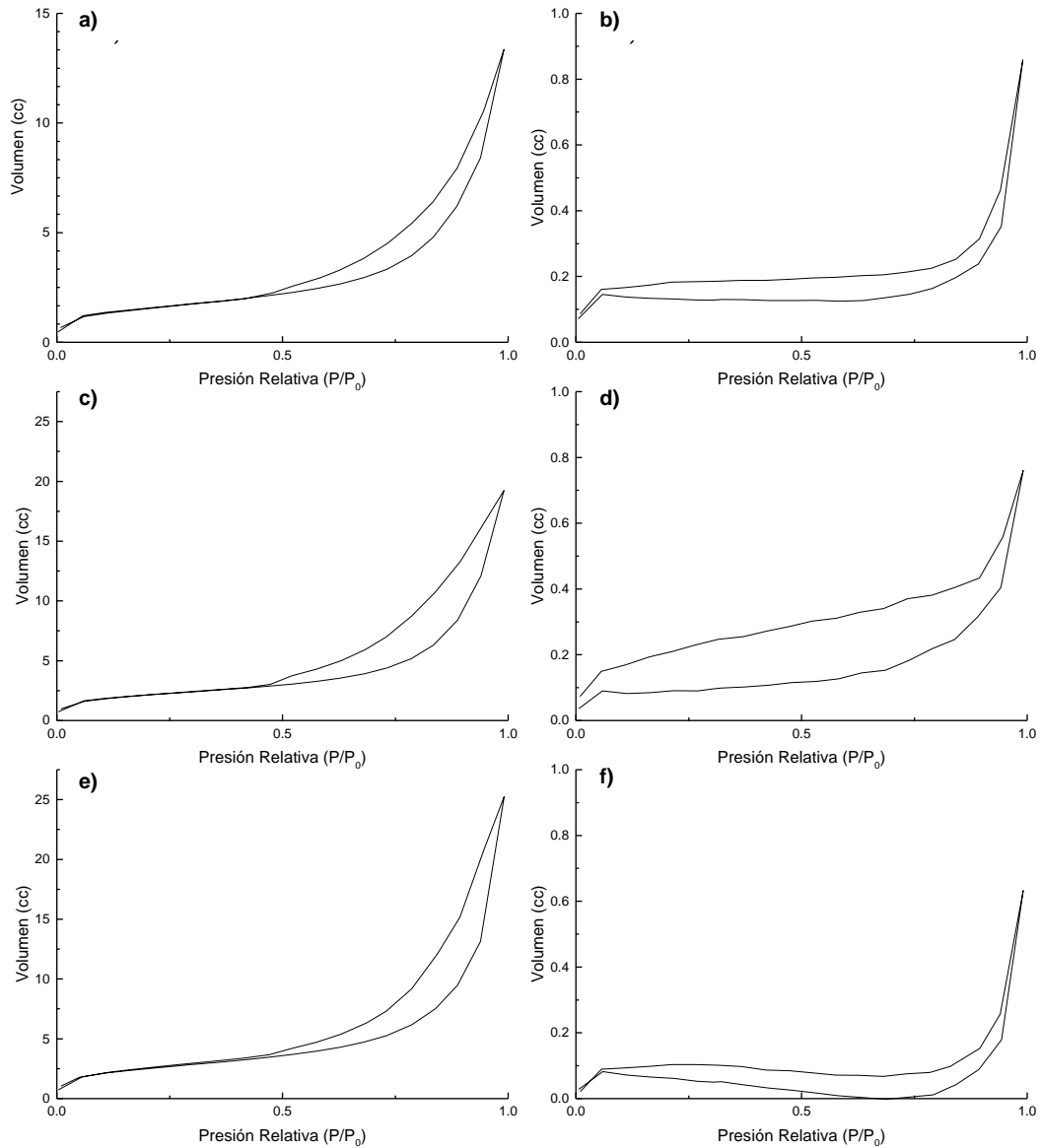


Figura 15. Isothermas de adsorción de N₂ de las cápsulas a) Qv, b) Av, c) Q+C, d) A+C, e) Q+C+Ch y f) A+C+Ch.

Para el caso de las cápsulas preparadas con quitosano-TPP a pH 1.5 (GI), a) Qv, c) Q+C, y e) Q+C+Ch, podemos observar un comportamiento muy similar en los tres casos, lo cual nos hace suponer que la incorporación de las partículas suspendidas en el proceso (conidios y sustrato) produjo cápsulas con una estructura similar. Además, podemos observar que la histéresis obtenida puede clasificarse como H₃ indicativa de poros estrechos. Constatando el incremento en el volumen de la gráfica i) respecto a la iii), que fue del doble de la i), y comparado con la gráfica v) fue 1.4 veces mayor, y entre iii) y v) fue apenas de 1.25 veces el incremento de volumen. Además es importante recalcar que para la misma presión relativa en los tres encapsulados, se observa la desorción, lo que confirma la similitud estructural en este tipo de cápsulas.

Por otro lado, las cápsulas preparadas con alginato (CPE) pH 4, Figura 15 b) Av, d) A+C, y f) A+C+Ch, muestran un comportamiento que se ajusta al tipo II, y está asociado a materiales macroporosos, la curva también presenta un bucle de histéresis, el cual podemos clasificar como H₄, que están asociados a materiales complejos que contienen macroporos y microporos (Sing, 1985). Se observa que tanto la forma como la presencia de histéresis se mantienen en los tratamientos, por lo que podemos asumir que la estructura es similar en los tres casos. Lo que nos permite observar una reducción de volumen conforme se incorporaba un nuevo componente en la cápsula

A través de un análisis BET, se obtuvieron los valores de área superficial específica (S_{BET}) y tamaño de poro (T_p) de las cápsulas, resumidos en la Tabla 8.

Tabla 8. Área superficial específica (S_{BET}) y tamaño de poro de la GI (pH 1.5 y 4) y FCPE (pH 4).

Tratamiento	Quitosano-TPP, pH 1.5		Quitosano-TPP, pH 4		Alginato-CaCl, pH 4	
	S (BET) (m ² /g)	Tamaño de poro (nm)	S (BET) (m ² /g)	Tamaño de poro (nm)	S (BET) (m ² /g)	Tamaño de poro (nm)
(v)	14.9±1.3	7.64 ^a	6.098±0.5	6.13 [*]	1.25±0.05	0.69 ^{a*}
(+C)	17.8±1.1	9.36 ^a	14.79±0.001	16.4	0.87±0.02	1.25 ^{a*}
(+C+Ch)	30.2±5.8	8.7 ^a	19.05±1.41	16.07	0.672±0.21	1.24 ^{a*}

Cápsulas: (v) vacías; (+C) con agente controlador; (+C+Ch) con agente controlador y chapulín.

El área superficial específica es el valor obtenido al medir el grado en el que un sólido interactúa con los alrededores, especialmente líquidos o gases, y puede representar el potencial de energía superficial para la unión con otra superficie (Thommes, 2010). Los resultados muestran claras diferencias entre el área superficial de los materiales GI, en comparación con aquellos formados por CPE. Se puede apreciar que los valores de área superficial de GI son mayores a los observados para CPE, lo que nos hace suponer que el proceso de gelificación ionotrópica produce materiales con superficies muy compactas que contienen poros de tamaño nanométrico, mientras que las cápsulas CPE resultan en materiales menos compactos, con áreas superficiales más pequeñas, así que podríamos suponer que se trata de materiales con tamaño de poro mayor (macroporos), sin embargo, los valores resultantes muestran tamaños menores <10 μm , posiblemente debido a que las cápsulas CPE tienen superficies complejas y cuentan con nanoporos dispersos sobre las paredes de los macroporos, y el valor obtenido corresponde a los primeros.

Por otro lado, a pesar de que entre tratamientos con el mismo polímero, se producen partículas con estructura superficial similar, se observa claramente que la incorporación del inóculo y el sustrato afecta el comportamiento de los materiales. Podemos observar en el grupo de GI, el valor va aumentando, lo que hace suponer que la presencia de un compuesto orgánico presente en el sustrato

interacciona con la matriz y modifica la superficie, es por ello que al agregar el sustrato, que contiene un sin número de compuestos, incrementa en mayor medida el área superficial. Por el contrario, en los tratamientos CPE, el comportamiento es a la inversa.

El incremento del pH a 4 en la GI (Tabla 8) tiene un efecto sobre la superficie que denota un descenso del área superficial, esto nos indica la existencia de poros más grandes gracias a la neutralización de los grupos amino funcionales, lo cual pudo no favorecer el entrecruzamiento dando como resultado redes más abiertas (Mi *et al.*, 1999), esto beneficia al microorganismo puesto que al tener poros más grandes incrementa la interacción de la cápsula con el medio, lo cual puede llevar a mayor absorción de vapor, y agua que incrementa la humedad dentro de la cápsula, sin embargo también tiene sus riesgos, como que se filtre algún microorganismo extraño y cause contaminación dentro de la cápsula.

6.3.5 Hinchamiento

En la Tabla 9 se enlistan los valores de W a $t=240$ minutos, tiempo en el que se logra el equilibrio, donde se puede observar la tendencia de hinchamiento para ambos tratamientos (GI y CPE). Por otro lado, las cápsulas GI (Figura 16a) muestran la tendencia de W al llegar al equilibrio, la tendencia observada fue la siguiente $Q_v > Q+C+Ch > Q+C$, lo que se puede interpretar como una consecuencia de interacción entre la matriz y los componentes que forman a los inmovilizados. Los valores de W_{240} para los tratamientos de CPE muestran la siguiente tendencia $A_v > A+C+Ch > A+C$. Al igual que GI, los tratamientos son altamente afines al solvente, todos los materiales muestran una ganancia de peso significativa en los primeros minutos del hinchamiento, además podemos hacer notar un discreto cambio en la pendiente alrededor de $t=30$ min W aumenta, lo cual podría ser indicativo que la difusión se puede estar llevando a cabo en dos etapas, la primera cuando el solvente atraviesa la capa del CPE formado por Quitosano-Alginato y

por último el solvente llega al núcleo, donde el proceso se lleva a cabo más rápido esta teoría se sustenta con lo reportado por (Lee *et al.* 1997).

Tabla 9. Valores de W_{240} , Medición a 25 °C en agua destilada.

Tratamiento	Quitosano (GI)	Alginato (CPE)
	pH 1.5	pH 4
$W_{240}(W/W_0)$ [mg]		
V	16.60±0.4	12.04±2.8
+C	6.79±1.5	10.36±1.9
+C+Ch	9.44±0.8	11.2±0.9

Los resultados experimentales se muestran en las Figuras 16 y 17. El comportamiento experimental en ambos tratamientos muestra que el tiempo que se requiere para alcanzar la mitad del hinchamiento al equilibrio es de aproximadamente 10 minutos, lo cual nos hace suponer que las cápsulas formadas resultaron tener gran afinidad al solvente, es decir son altamente higroscópicas.

Se observó que la presencia del conido influyo en la matriz de inmovilización, influye sobre el proceso de hinchamiento, esto hace pensar que existe alguna interacción de la matriz con el organismo y compromete los grupos funcionales hidrófilos en la matriz de inmovilización.

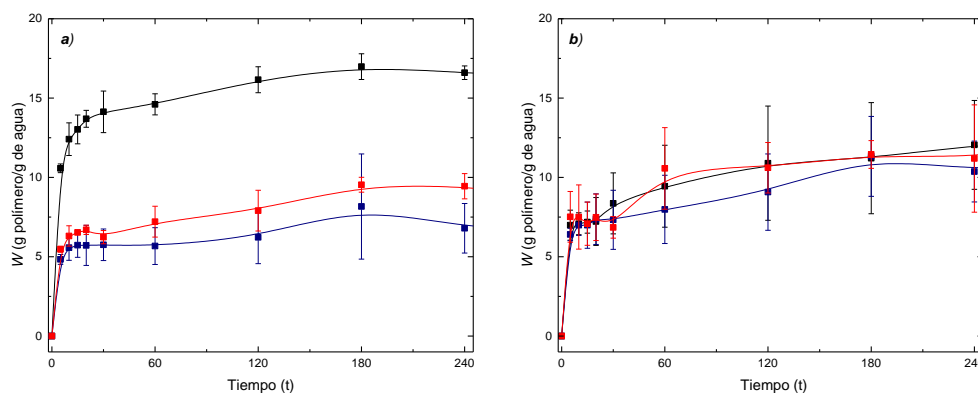


Figura 16. Valores experimentales de hinchamiento W de muestras de cápsulas preparadas por a) GI pH 1.5 y b) CPE pH 4, en agua destilada a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).

Es evidente la influencia del pH de formación de las cápsulas sobre el proceso de hinchamiento. Las Figuras 16 y 17 muestran que al aumentar el pH, el comportamiento del hinchamiento es independiente de la inmovilización, esto puede ser debido a que los grupos amino de las muestras preparadas a pH 4 se neutralizan y ya no contribuyen al proceso de hinchamiento.

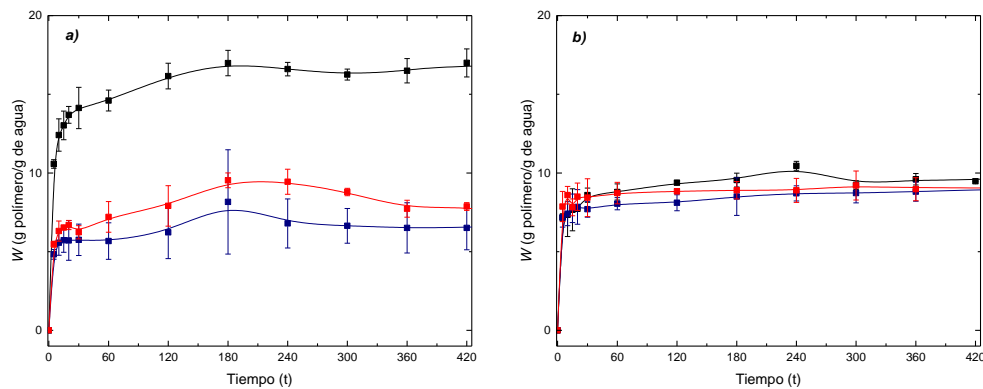


Figura 17. Valores experimentales de hinchamiento W de muestras de cápsulas preparadas por a) GI y b) CPE a pH 4, en ambiente saturado en vapor de agua a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).

La Tabla 10 muestra los valores de W a los 240 minutos solo para el proceso de GI. En el proceso de elaboración de las cápsulas se ajustó el pH de la reacción añadiendo NaOH, esto supone la neutralización parcial de los grupos amino del quitosano, disminuyendo el grado de ionización de la matriz resultante, y restando el efecto electrostático que tiene la presencia de los grupos protonados de la matriz (Peppas & Khare, 1993).

Tabla 10. Valores de W_{240} , para GI, pH 1.5 y 4. Medición a 25 °C en agua MilliQ.

Tratamiento	Quitosano (GI)	
	$W_{240}(W/W_0)$ pH 1.5 [mg]	$W_{240}(W/W_0)$ pH 4 [mg]
V	16.60±0.4	8.1±0.5
+C	6.79±1.5	8.7±0.5
+C+Ch	9.44±0.8	8.89±0.76

La Figura 18 muestra la capacidad de las cápsulas para regresar a su forma original aún después de haber sido liofilizadas. Se muestran las cápsulas al inicio de la prueba de hinchamiento para GI y FCPE (Figura 18 a, c) y al finalizar la prueba (Figura 18 b, d).

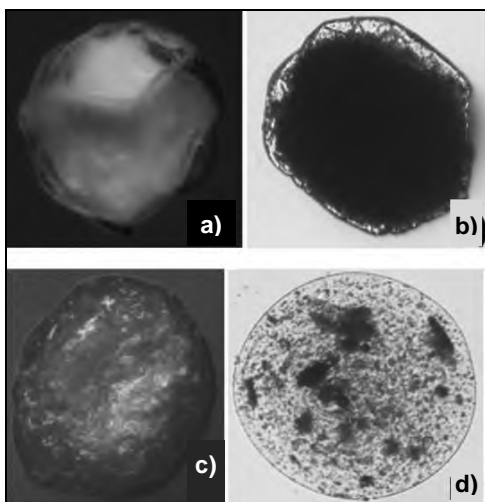


Figura 18. Morfología de cápsulas de quitosano y alginato mediante microscopía óptica, 4X. Esferas antes de iniciar la prueba de humedad: a) GI, c) FCPE; esferas al término del tiempo de hinchamiento (180 min.): b) GI, d) FCPE.

6.3.6 Absorción de vapor

Se evaluó la absorción de vapor, para determinar la capacidad de absorber humedad del medio, a temperatura y presión constante. La interacción de los grupos $-NH_2$ con las moléculas de agua se observó en el proceso de sorción en las cápsulas de GI, donde se obtuvo mayor contenido de agua por gramo de polímero Qv. Esto coincide con los grupos funcionales presentes en quitosano. El

tratamiento que contiene tanto al agente controlador (+C) como al sustrato (Q+C+Ch) puede absorber mayor cantidad de agua, en comparacion con los tratamientos que solo contienen al agente controlador (+C). La Figura 19 y la Figura 20 muestran la ganancia en peso debida a la adsorción en función del tiempo.

De forma similar que el hinchamiento Q_v es el tratamiento que más adsorbe humedad. Podemos observar que para todos los tratamientos preparados por GI, el máximo se alcanza aproximadamente a los 180 min y se mantiene hasta el final del experimento, esto indica que las cápsulas han absorbido la máxima cantidad de agua y el sistema se encuentra en equilibrio (Figura 19).

A pesar que los valores de adsorción final de las cápsulas preparadas por CPE son mayores no existe diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, pueden notarse diferencias en el comportamiento en la adsorción. Podemos observar por la forma de la curva que GI tiene un patrón de adsorción muy semejante al hinchamiento, la adsorción de agua es rápida. Mientras que el valor de adsorción máximo de CPE se alcanza a tiempos mayores en el orden de los 1000 min. Por otro lado, podemos ver que la adsorción comienza muy rápido hasta los primeros 30 min, pasado ese tiempo la adsorción se vuelve gradual, lo que nos hace suponer que, al igual que el hinchamiento, la capa de quitosano adsorbe rápidamente pero una vez que se superó este frente la absorción se vuelve más lenta (Hyunah *et al.*, 2011).

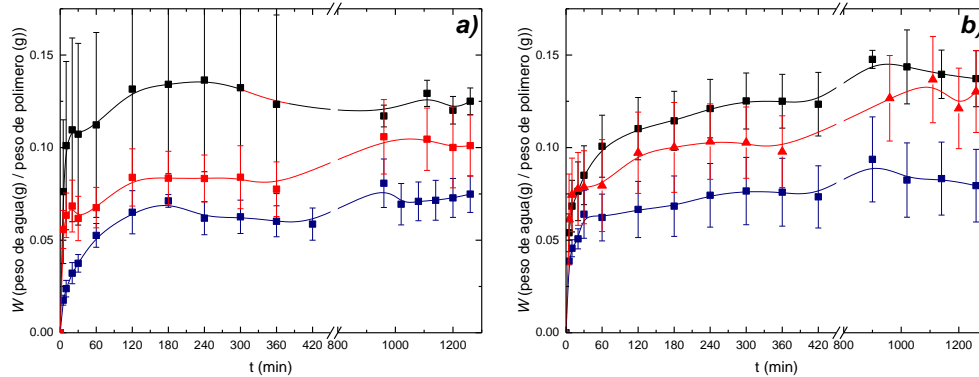


Figura 19. Valores experimentales adsorción de vapor W de muestras de cápsulas preparadas por a) GI, pH 1.5 y b) CPE, pH 4 en ambiente saturado de humedad a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).

Por otro lado, notamos diferencias en los materiales formados con pH mayores. En la Figura 20 la adsorción es mayor en estas cápsulas, y a los mismos tiempos (1300 min), las cápsulas de CPE pH 4 aún no alcanzan el equilibrio.

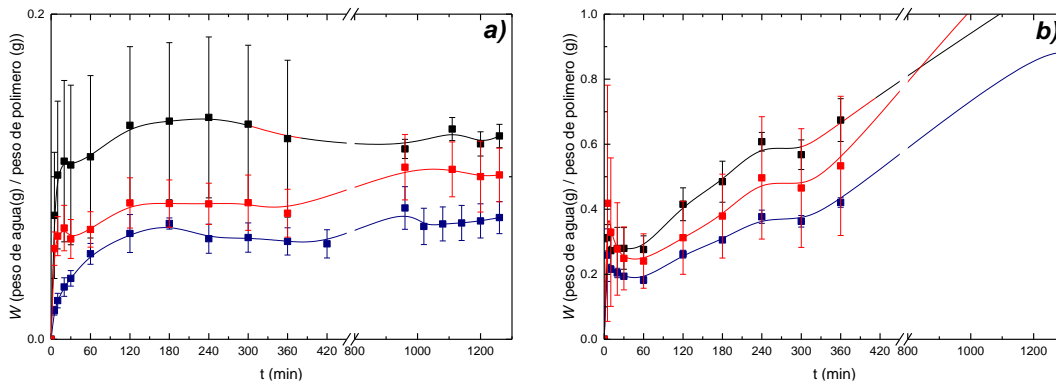


Figura 20. Absorción de vapor de esferas W cápsulas preparadas por a) GI, pH 4 y b) CPE, pH 4 en ambiente saturado en vapor de agua a 25 °C. V (-■-), +C (-■-), +C+Ch (-■-).

La presencia y distribución de humedad en el material de quitosano depende en gran medida de la humedad relativa ambiente (HR). La literatura indica que en condiciones de alta humedad ($HR > 60\%$), las moléculas de agua penetran más intensamente a través de las cadenas de quitosano, por lo que el contenido de humedad de quitosano aumenta significativamente (Despond, Espuche & Domard, 2001; No & Prinyawiwatkul, 2009). El análisis de sorción de agua con quitosano llevado a cabo bajo condiciones ambientales (25 °C, 60% HR) demostró que el

quitosano absorbió 14% -16% (p/p) de agua (en 100 min) y la velocidad del proceso dependía del polímero.

Kurek *et al.*, (2014) reportó que el aumento de la humedad ambiental de 0% a 75% presentaba mayor hinchazón en las películas de quitosano, que lo hace responsable de una liberación mayor y más rápida del compuesto activo. Los quitosanos poseen una muy alta afinidad agua/humedad (Zhang *et al.*, 2011; Szymańska & Winnicka, 2015), lo cual, se vio reflejado en el aumento de peso de las cápsulas con respecto al tiempo, en todos los tratamientos evaluados. Tanto las pruebas de hinchamiento como las de absorción de vapor reflejan la afinidad del quitosano por el agua y la humedad, ya que en ambas el cambio de peso, debido a la exposición de agua y al vapor de agua, se ve reflejado en la tendencia de los tratamientos que se encuentran en las Figura 18 y 19.

6.4 CARACTERIZACIÓN MICROBIOLÓGICA DE LAS CÁPSULAS

6.4.1 Comportamiento y biodegradación de las cápsulas *in vitro*

La importancia del comportamiento y degradación de las cápsulas en medio sólido radica en que es una simulación *in vitro* que semeja las condiciones ideales en un medio sólido, que en la práctica sería lo parecido al suelo; medio con el que estará en contacto el hongo en la naturaleza.

En la Figura 21, se muestran las cápsulas vacías de ambos procesos de encapsulación a lo largo de un mes de observación, las imágenes muestran los días donde se observó un cambio físico en las cápsulas; siendo las cápsulas de alginato (CPE) las que mayor daño presentaron en el menor tiempo; debido que a partir del séptimo día (Figura 21 e) se observaron grietas sobre la superficie de la cápsula, para el día 31 se observaba un ligero hundimiento. A pesar de que las cápsulas comienzan a mostrar daños, ninguna de ellas presenta ruptura. Las cápsulas de quitosano hechas mediante GI son las que menor daño presentan a lo largo de todo el mes, tardando 23 días (Figura 21 b) para mostrar al menos un

cambio en su forma que se mantiene hasta los 31 días (Figura 21 c); a pesar del cambio, no se logra apreciar una ruptura o fragmentación en la estructura del material.

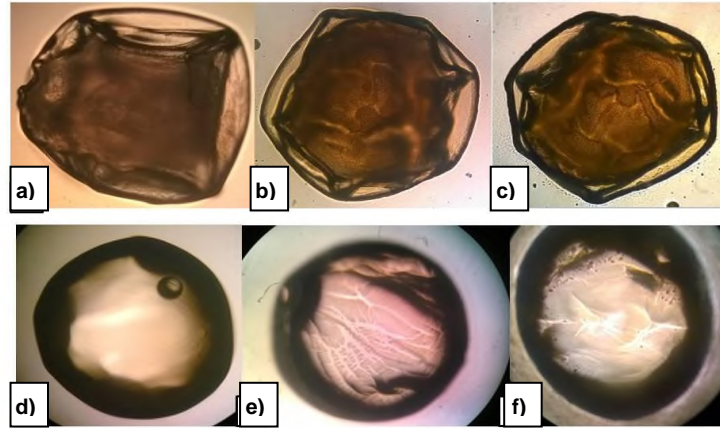


Figura 21. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas *in vitro*. Parte superior: Qv $t=0$ días (a), 23 días (b) y 31 días (c). Parte inferior se muestran las cápsulas hechas mediante CPE al inicio de la observación $t=0$ días (d), a los 7 días (e) y a los 31 días (f).

En el tratamiento Q+C se observa presencia de conidios fuera de la cápsula a partir del día cuatro (Figura 22 b), también se logra observar a partir del día 13 un ligero crecimiento de hifas en el exterior de la cápsula (Figura 22 c), dando inicio al crecimiento del hongo, sin embargo, este crecimiento se ve interrumpido, porque las hifas que parecían ya germinadas no alcanzaron a formar una colonia y a multiplicar el hongo en el medio sólido (Figura 22 c). Al llegar al día 15 (Figura 22 d), la cápsula presentó fracturas más notorias, que no siguieron incrementando en los días restantes, esto puede indicar resistencia de la matriz de quitosano a la degradación del medio. Al finalizar el mes de observación, no se presentó crecimiento de *Beuveria bassiana* en el medio, y no se observaron más señales de fractura o deformación en la cápsula.

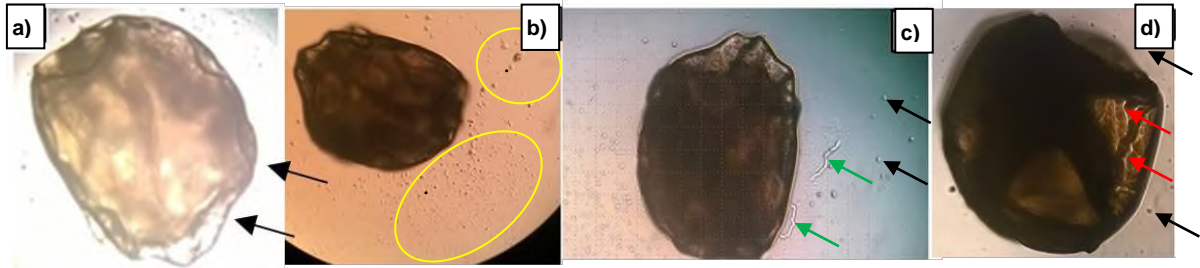


Figura 22. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas *in vitro*. Cápsulas Q+C, t=0 (a), a los 4 días (b), 13 días (c), y 15 días (d). Flechas negras y círculo amarillo: conidios expulsados, flechas verdes: conidios germinando; flechas rojas: cuarteadura en cápsula.

El tratamiento Q+C+Ch presenta hasta el cuarto día (Figura 23 b) la expulsión de conidios al medio, similar al tratamiento Q+C. Al día 13 se comienzan a observar fracturas en la estructura de la cápsula (Figura 23 c), que se vuelven más pronunciadas en el día 19 (Figura 23 d), para el día 31 la cantidad de conidios en el exterior del medio aumenta (Figura 23 e), a pesar de que la cápsula no mostró signos visibles de rumpura, indicativo de la existencia de poros. Se puede suponer que la liberación del contenido de la cápsula se da a través de las fracturas de la matriz, las cuales aumentan con el tiempo. Del mismo modo en el tratamiento Q+C, las cápsulas no generaron crecimiento, esto puede ser debido a que el organismo perdió viabilidad en algún momento de la manipulación o proceso de preparación.

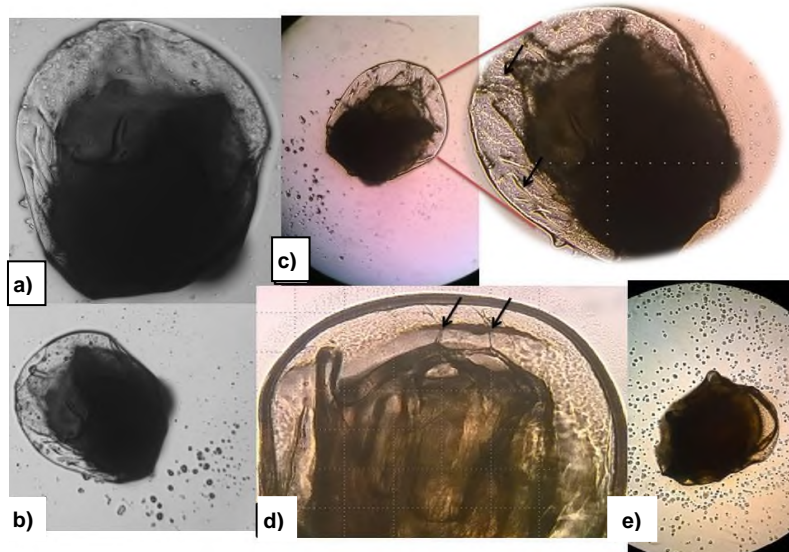


Figura 23. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas *in vitro*. Cápsulas Q+C+Ch hechas mediante GI. Al inicio de la observación al t=0 días (a), 4 días (b), 13 días (c), 19 días (d), y 31 días (e).

Del mismo modo en los tratamientos de CPE, se observa la liberación progresiva de conidios al medio a partir del 4to día de cultivo, contrario a los resultados del tratamiento anteriormente descrito. El tratamiento A+C (Figura 24 b), mostró crecimiento micelial que comenzó a salir de la cápsula; diferente a lo que se esperaba, con un rompimiento previo de la cápsula o liberación de los conidios al exterior para que el hongo pudiera crecer. Sin embargo, el hecho de que los conidios puedan salir de la cápsula sin romperla (Figura 24 c), refuerza el hecho de que se obtuvo una cápsula porosa, que permite la interacción e intercambio con el medio, lo que favorece el crecimiento de conidios. Las hifas crecieron en los días posteriores hasta completar el mes de observación, sin embargo en ese tiempo el hongo o agente de control biológico no colonizó la caja completamente. Indicativo de cierta pérdida en las funciones biológicas del hongo, estrés o falta de adaptación al medio, debido a que su periodo reproductivo se vio detenido.

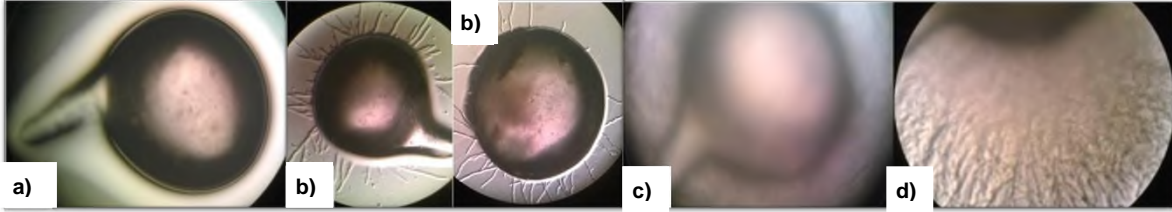


Figura 24. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas *in vitro*. Cápsulas A+C hechas mediante FCPE. Al inicio de la observación, (a), día 3 (b), día 5 (c).

Las cápsulas del tratamiento A+C+Ch comienzan la liberación de conidios a partir del cuarto día (Figura 25 b), y los cambios en la estructura de la cápsula comienzan a verse a partir del día 13 (Figura 25 c). Manifestándose mayormente el día 15 (Figura 25 d); a partir del día 23 el daño en la cápsula se hace más visible (Figura 25 e y 25 f). Cabe hacer notar que este tratamiento tarda más tiempo en sufrir daños, 13 días, en comparación con las cápsulas vacías (Av), 7 días. Una posible explicación a la resistencia al daño podría deberse a la adición del sustrato, el chapulin, el cual al estar formado en su mayor parte por proteína y al fusionarse con la matriz de alginato, le puede adicionar fuerza y resistencia a la estructura.

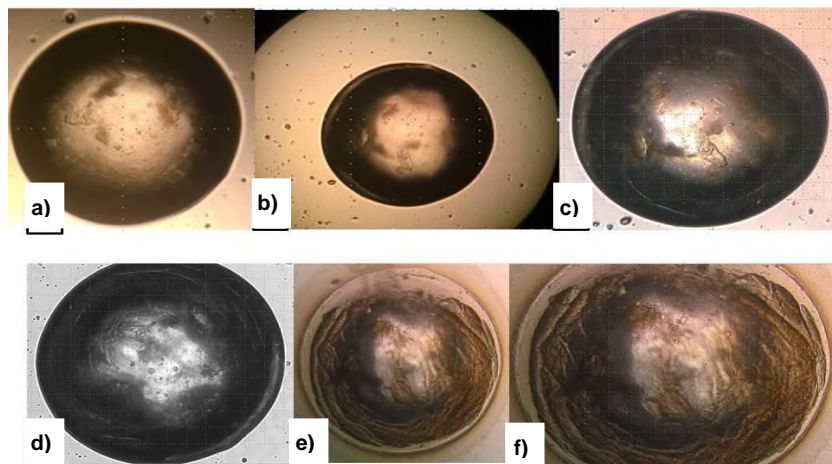


Figura 25. Comportamiento y biodegradación de las cápsulas *in vitro*. Cápsulas A+C+Ch hechas mediante FCPE. Parte superior izquierda, tiempo cero, al inicio de la observación, (a), día 4 (b), 13 días (c), 15 días (d), y 23 días de observación (e y f).

En resumen, las cápsulas comienzan con la liberación del material a partir del cuarto día en las dos formas de encapsulación GI y FCPE esto nos da pauta para

ir conociendo el comportamiento de la cápsula después de su fabricación y aspersión en un medio húmedo. De todos los tratamientos, las cápsulas de alginato recibieron mayor daño en menor tiempo en comparación con las cápsulas de quitosano, que tardaron más en sufrir cambios; pero las cápsulas de A+C fueron las únicas capaces de mantener conidios aún viables con crecimiento de *B. bassiana*, puesto que los demás tratamientos sólo mostraron liberación de material biológico pero no crecimiento.

Para los tratamientos con pH 4 de GI, se presentó crecimiento del ACB en un periodo de 3 días, al sexto día ya había invadido la cápsula completamente, hasta el octavo día la caja de cultivo fue invadida completamente; lo mismo sucedió para los tratamientos de CPE. Todas las cápsulas que contenían +C y +C+Ch coincidieron con el mismo tiempo de crecimiento (Figura 26 a, b, c). El hecho de que ambos tratamientos GI y CPE tuvieran un crecimiento de *Beauveria* similar, puede estar indicando que la matriz polimérica, cápsula, no es un impedimento directo para el crecimiento biológico cuando las condiciones de encapsulación se alinean mínimamente con las requeridas por el microorganismo, más que las requeridas por el material. Un ejemplo de ello, el cambio de pH de la solución del quitosano; porque aunque la literatura indique que para una matriz polimérica de quitosano es mejor con un pH ácido ~1, la realidad experimental muestra que para el organismo biológico, es un impedimento; es necesario buscar el punto en donde ambos puedan estar presentes. El rápido crecimiento también puede ser indicativo de que no hay presente, por lo menos los primeros dos meses, una pérdida de la actividad metabólica del hongo dentro de la cápsula. Muestra de ello es el incremento de conidios observados, y la existencia de concentración enzimática.

La Figura 26 muestra de manera general como se observaron los tratamientos, a partir de que el hongo comenzó a mostrar señales de crecimiento, hasta la formación de la colonia, cabe mencionar que en todos los tratamientos de GI y CPE la manera de crecimiento fue la misma.

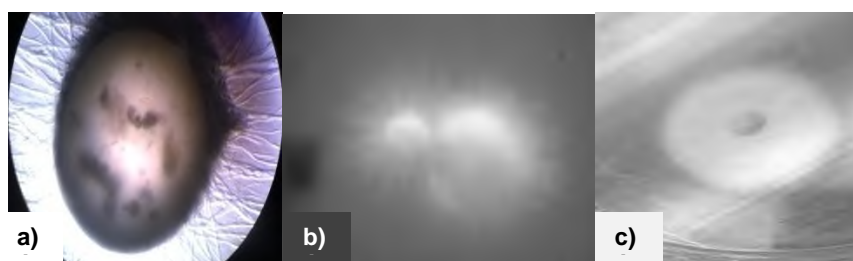


Figura 26. Comportamiento y crecimiento del hongo, para todos los tratamientos de GI y CPE, al someterlo a un medio de cultivo sólido. (a) 3 días, (b) 6 días, (c) 8 días.

6.4.2 Estudios de estabilidad (Viabilidad)

La prueba de viabilidad de las cápsulas para el tratamiento a pH 1.5 con tres meses de almacenamiento mostró nulo crecimiento del ACB en todos los tratamientos hechos mediante GI. La baja viabilidad pudo deberse a diferentes causas, como la antigüedad del inóculo, debido a que antes de ser encapsulado ya contaba con un periodo de 4 meses de almacenamiento, el bajo pH de la solución de quitosano, alrededor de 1.5. Para encontrar la causa de la pérdida de viabilidad del ACB, se evaluaron distintos tratamientos (Tabla 11). Para la evaluación del porcentaje de viabilidad, en las cápsulas a pH 4, se tomó en cuenta un inóculo reciente, y con una mayor concentración conidial. En los experimentos se observó que la cepa que contaba con un período de almacenamiento de 1 año tenía una viabilidad por debajo de la cepa recién activada.

Tabla 11. Viabilidad de conidios en diferentes medios. El inóculo con almacenamiento de 1 año (viabilidad terminada a los 8 días) y el inóculo reactivado (viabilidad terminada a los 2 días).

Tratamientos	Inóculo viejo [% Viabilidad]	Inóculo nuevo [% Viabilidad]
Agua	30 ± 0.06	80±0.085
Ácido acético 1M	0	80±0.97
HCl 1M	0	80±0.87
Quitosano pH 1.5	0	0
Quitosano con A. acético pH 4	10±0.99	80±1.24
Quitosano con HCl pH 4	10±1.00	80±1.00

Se observó en los experimentos de la Tabla 11 que los tratamientos con ácido acético eran más propicios a la contaminación que aquellos que contenían HCl a pH 4, por esta razón los tratamientos se realizaron con HCl, evaluando la viabilidad después de encapsular y después del proceso de secado.

La viabilidad de las cápsulas después del proceso de inmovilización del nuevo inóculo se presenta en la Tabla 12. Se observó que los tratamientos hechos mediante GI tenían una viabilidad menor (65% en promedio) a los tratamientos hechos por CPE (75% en promedio), los cuales mantuvieron la viabilidad cercana a la del inóculo (85%); indicando que el proceso de encapsulación podría estar afectando a la célula. Después de encapsular, el producto se liofiliza para poder almacenar y conservar los conidios, las pruebas de viabilidad realizadas después de este proceso presentaron una disminución en la viabilidad para todos los tratamientos y además un retraso de 4 días en el crecimiento de *Bb 885.2*, en comparación a las viabilidades realizadas al inóculo inicial y a las cápsulas recién elaboradas, que presentaban crecimiento a las 48 horas. La disminución de la viabilidad y el retraso del crecimiento del hongo pueden deberse al proceso de secado, ya que la obtención de los conidios antes de encapsular es mediante liofilización, y durante el secado de las cápsulas, estas se vuelven a liofilizar. Este doble proceso de extracción de agua de la célula, podría afectar su funcionamiento; otra razón podría deberse al congelamiento con nitrógeno líquido (-195.8 °C) al que son sometidas las cápsulas antes de ser liofilizadas, ya que con este proceso en la etapa de desorción, los productos alcanzan una humedad final alrededor del 2%, la cual no fuera suficiente para que el hongo reactivara su crecimiento, por esta razón el método puede ser agresivo para la célula y provocar daños en su funcionamiento por la baja temperatura. La viabilidad realizada después de la liofilización, refuerza esta hipótesis, mostrando una notable disminución en la viabilidad para todos los tratamientos (Tabla 12); además el crecimiento se registró al cuarto día (96 horas), el doble de tiempo que tardaron las viabilidades realizadas al inóculo y a las cápsulas recién elaboradas.

Sin embargo se conoce que la congelación mediante nitrógeno líquido es inmediata, provocando la formación de diminutos cristales de agua que no dañan a la célula; una congelación a una temperatura mayor propicia la formación de cristales de mayor tamaño que al ser amorfos pueden causar el rompimiento de paredes celulares (Mazur, 1977).

Tabla 12. Porcentaje de viabilidad de *Beauveria bassiana* como inóculo (Mes 0, viabilidad t=2días) y dentro de las cápsulas recién preparadas sin liofilizar y liofilizadas a t=0 (recién preparadas) y 1 y 2 meses con pH 4.

Muestra	Viabilidad [%]					
	Mes 0 Antes de liofilizar	Mes 0 Después de liofilizar	Mes 1 25°C	Mes 1 4°C	Mes 2 25°C	Mes 2 4°C
Q+C	70.84±2.43 ^a	61.36±2.43 ^a	79.66±2.35 ^a	80.00±2.30 ^a	54.50±7.613 ^a	44.70±1.54 _A
Q+C+Ch	63.80±0.74 ^a	50.36±0.74 ^a	68.5±2.48 ^a	69.00±2.44 ^a	51.00±4.036 ^a	78.20±2.79 ^a
A+C	82.08±2.91 ^a	60.84±2.81 ^a	82.8±2.75 ^a	83.50±2.68 ^a	20.00±4.865 ^a	51.70±1.82 ^a
A+C+Ch	70.29±3.11 ^a	58.53±3.11 ^a	77.78±2.63 ^a	77.00±5.5 ^a	71.50±7.028 ^a	53.00±1.85 ^a
Inóculo	85.00±1.35 ^a		85.22±1.889 ^a		81.94±5.373 ^a	

*Misma letra significa que no son significativamente diferentes según la prueba de Tukey (P <0.05).

Datos experimentales: *t de tiempo* de crecimiento de conidios. Frescas = 2 días y *t de tiempo* de crecimiento de conidios liofilizadas = 4 días, se consideran sólo los tratamientos donde se realizó inmovilización.

Durante el primer mes de almacenamiento, se observó un aumento en la viabilidad en todo los tratamientos, en especial en los tratamientos A+C y Q+ C, esto puede deberse a que el ACB se recupera después del proceso de inmovilización; pero el tiempo que tarda en alcanzar una viabilidad del 80% no disminuye, son necesarios 4 días, mientras que el inóculo alcanza una viabilidad del 85% en un período de 2 días.

En el segundo mes, el tratamiento Q+C+Ch a temperatura 4°C mostró un aumento en su viabilidad, seguido del tratamiento A+C+Ch quien a pesar de no aumentar su viabilidad fue el segundo mejor tratamiento, mientras que los restantes mostraron una general pérdida de viabilidad. Estos resultados pueden sugerir que el chapulín como inductor podría estar mostrando el efecto esperado, servir como

fuente de sustrato para el hongo. En apariencia los tratamientos +C+Ch muestran mejores resultados para esta variable y el buen funcionamiento del agente controlador se mantiene durante el primer. Sin embargo, estadísticamente no hay diferencia significativa, ($P>0.005$) entre los tratamientos usados en la encapsulación, el tiempo de almacenamiento y la temperatura de almacenamiento. Estadísticamente tanto el método de CPE y el de GI, pH 4-, son apropiados y eficientes para preservar la viabilidad, conservar y proteger al ACB, lo cual se sustenta aún más con el análisis realizado por chi-cuadrada, la cual muestra dependencia entre estos mismos factores (tratamiento, temperatura, tiempo) ($P>0.005$).

Estudios realizados con biopolímeros han demostrado que la temperatura de almacenamiento tiene un efecto sobre la cantidad de conidios que se producen a lo largo del almacenamiento, estos autores (Fravel, 1985; Gerding-González *et al.*, 2007b; Marques *et al.*, 1999a; Pereira & Roberts, 1991) han observado un aumento de conidios en las cápsulas a lo largo del tiempo, donde la temperatura ambiental (22°C hasta 35°C) no tuvo influencia significativa en el crecimiento de los conidios, pudiendo aguantar hasta 17 semanas. Esto fundamenta el hecho de que la encapsulación ayuda al microorganismo a protegerse del ambiente y de la temperatura, lo cual contribuiría al ahorro de energía para su almacenamiento y además disminuirá el efecto que causa el mal almacenamiento de estos productos cuando se comercializan. Pereira & Roberts, 1991 observaron un aumento de conidios en las cápsulas a lo largo del tiempo, donde la temperatura ambiental (22°C) no tuvo una influencia significativa en el crecimiento de los conidios. Marques, Alves, & Marques, (1999) reportaron cápsulas con *B. bassiana* con la capacidad de mantener conidios viables a diferentes temperaturas (25, 30,35 °C) hasta por 90 días y 120 días. Con el método propuesto se logró mantener la viabilidad de los conidios de *B. bassiana* a temperatura ambiente

Liu & Liu (2009) investigaron formulaciones y la estabilidad de estas formulaciones evaluadas durante 6 meses a una temperatura de 4 °C. Los conidios

encapsulados permanecieron viables hasta el 6^o mes, con un 80% de viabilidad en este período. Mientras que, los conidios del control, presentaban un descenso significativo en las tasas de germinación a lo largo de los meses, alcanzando el 50% en el 6^o mes. Después de siete meses de almacenamiento, todos los liofilizados permanecieron en un estado amorfo, también observaron que las cápsulas se redispersaron fácilmente sin agregación de partículas después de la reconstitución. Sin embargo, la liofilización puede imponer estrés a los materiales lábiles. Esto se debe a que el quitosano experimenta fuertes enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares e interacciones hidrofóbicas que pueden afectar negativamente a las propiedades fisicoquímicas, como la viscosidad y la capacidad de absorción de agua. Además, una eliminación demasiado dura del agua residual del material de quitosano podría dar como resultado la desestabilización de la estructura del polímero. Las formulaciones almacenadas presentan mayor viscosidad y resistencia (Mazzitelli *et al.*, 2013; Szymańska & Winnicka, 2015).

Finalmente, se formuló un producto que permaneció viable durante las condiciones evaluadas. Este es un avance importante, particularmente porque las formulaciones actualmente disponibles duran hasta 90 días en condiciones no refrigeradas, y este producto mantuvo la viabilidad. Una vida útil adecuada para un formulado biológico a temperatura ambiente es un requisito esencial para la aceptación y comercialización. Otra ventaja es la reducción en el volumen de transporte; la presentación en polvo ocupa menos volumen, que cuando se usa el tradicional arroz con el hongo. Todas estas ventajas harán que este producto sea rentable, atractivo y viable para el consumidor, además de cuidar aspectos ambientales como el ser biodegradable, y sin ningún tipo de contaminación por parte del material biológico y la matriz en la que viene envuelta dicho material.

6.5 CRECIMIENTO DE *Beauveria bassiana* DENTRO DE LAS CÁPSULAS.

6.5.1 Conteo conidial

La concentración de conidios presente por miligramo de cápsula para los tratamientos de CPE y GI se resume en las Figuras 27 y 28. En esta gráfica se observa un descenso en la concentración de conidios en los primeros tres meses de almacenamiento y otro descenso a los 6 meses, lo cual nos indica que los conidios no se duplicarán, como se esperaba, esto se confirma con la ausencia de viabilidad en los mismos meses. En las tablas de la sección 9.2 (Sección de Anexos) se presenta el valor numérico de cada tratamiento.

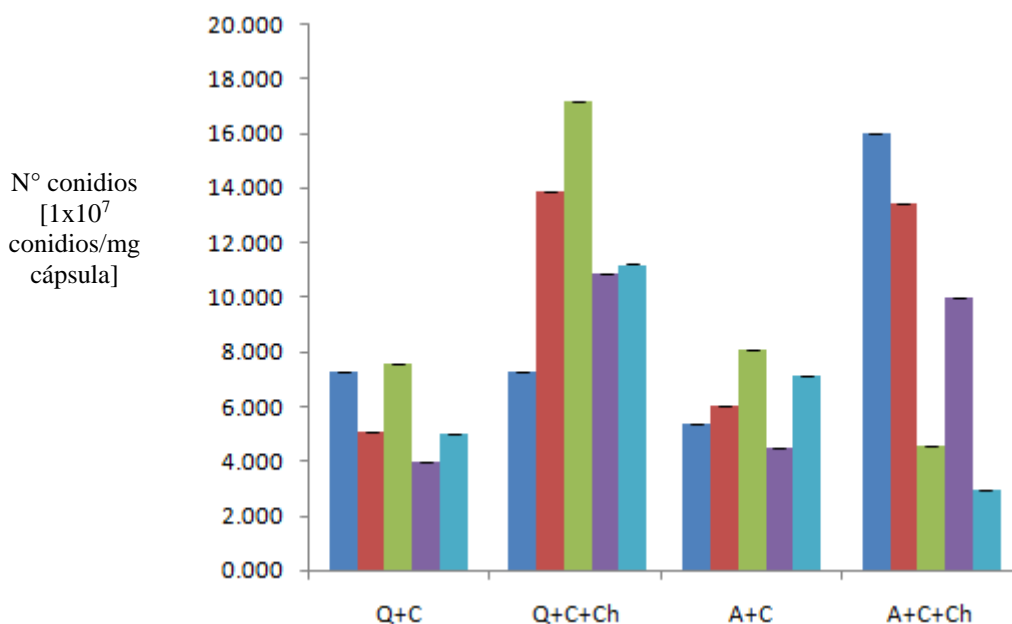


Figura 27. Concentración de conidios por miligramo de cápsula durante el almacenamiento, con variaciones de tiempo (0,3 y 6 meses) y temperatura: TA (temperatura ambiente 25°C) y TF (temperatura fría, 4°C). ■ Mes 0 (TA), ■ Mes 3 (TA), ■ Mes 3 (TF), ■ Mes 6 (TA), ■ Mes 6 (TF).

La disminución de los conidios puede deberse al proceso de encapsulación, que podría estar afectando la integridad de los conidios. Pues a pesar de ser la forma de supervivencia más resistente, no dejan de ser células sensibles, que pueden

ser afectadas por cambios abruptos de temperatura; como el enfriamiento de las cápsulas con nitrógeno líquido, o la liofilización que conlleva el proceso de producción. Se podría considerar que las cápsulas brindan mayor protección a las células y que la liofilización no causaría inconveniente, sin embargo, debido a la porosidad se cree que la liofilización tiene un efecto de deshidratación sobre los conidios, debido a que en este proceso no solo el agua de la matriz se elimina, sino también se extrae agua de la célula (conidios) que previamente fueron liofilizados, esta idea se fundamenta más al ver los resultados de viabilidad, donde la viabilidad de los conidios antes de ser liofilizados es mayor en todos los tratamientos antes del secado y disminuye después de este proceso.

Otro factor del que se podría sospechar es de una inhibición o estrés causado por el sustrato, chapulín, sin embargo, los tratamientos que no contienen chapulín (Q+C y A+C) también sufren una disminución de conidios. Al ver el nulo incremento en los conidios, y que además el pH de la solución de quitosano para la GI es ≤ 1 , mientras que el pH recomendado para su crecimiento son superiores a 4 (Mishra & Malik, 2012; Padmavathi *et al.*, 2003; Pham *et al.*, 2009) se infiere fuertemente que el proceso de producción de las cápsulas y la solución del polímero afecta la integridad de los conidios.

Las cápsulas obtenidas con un nuevo inóculo, mostraron un incremento en la concentración de conidios por miligramo de cápsula durante el primer mes, de 3000-4000 veces más en comparación con el mes cero o inicial, durante el segundo mes de almacenamiento aumentó 1000 veces más en comparación al primer mes de almacenamiento, esto puede deberse a que la cepa estaba activa, es decir, son células nuevas en proceso de crecimiento y reproducción. Prueba de ello fue el comienzo de la germinación que presentaron los conidios al segundo mes de almacenamiento, con un 60% de conidios germinados en los tratamientos +C+Ch y un 50% para los tratamientos +C para ambos procesos de encapsulación (Figura 28). Observar una alta tasa de germinación en los conidios dentro de las cápsulas nos indica que las células están activas y en proceso reproductivo, lo

cual complementa los resultados de viabilidad y las observación en sólido, donde los conidios se están expresando al formar UFC y mostrar crecimiento en el medio (Figura 26 b y c). El hecho de que los conidios aumentaran cada mes, refleja una posible adaptación de la cepa a la matriz polimérica y al sustrato. Además es importante mencionar que estos tratamientos además se mantienen a temperatura ambiente, lo cual es benéfico para el usuario final, productor, debido a que se generó un producto que mantiene activo su metabolismo, germina, y además tiene el plus de que puede o no estar refrigerado. Esto ataca directamente uno de los problemas que presentan los formulados biológicos, y es el hecho de que muchas veces durante la manipulación y el transporte no se mantiene el producto en las condiciones de temperatura requeridas por el fabricante, causando que el microorganismo pierda efectividad al momento de ser aplicado.

Estudios realizados de encapsulación con alginato han demostrado que la temperatura de almacenamiento tiene un efecto sobre la cantidad de conidios que se producen a lo largo del almacenamiento. Se ha observado un aumento de conidios en las cápsulas a lo largo del tiempo, (Fravel *et al.*, 1985; Pereira & Roberts, 1991b; Marques, Alves & Marques, 1999b; Gerding-González *et al.*, 2007a) donde la temperatura ambiental (22°C hasta 35°C) no tuvo influencia significativa en el crecimiento de los conidios, permaneciendo viables hasta 17 semanas. Las concentraciones conidiales obtenidas fueron mayores a los reportados por trabajos similares de encapsulación de *Beauveria bassiana* (Pereira & Roberts, 1991b; Marques, Alves & Marques, 1999b; Gerding-González *et al.*, 2007a), donde las concentraciones alcanzadas se mantenían en órdenes de 1×10^8 con/mL mientras que las de este trabajo tenía concentraciones de 1×10^{14} por miligramo de cápsula.

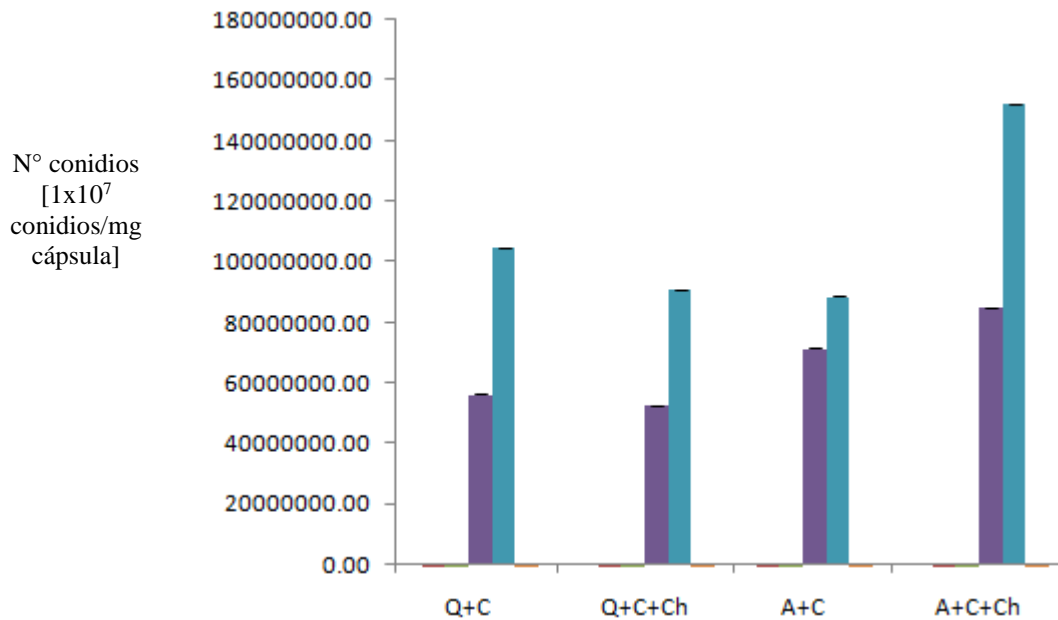


Figura 28. Concentración de conidios por miligramo de cápsula durante el almacenamiento, con variaciones de tiempo (0, y 1 mes) y temperatura: TA (temperatura ambiente 25°C) y TF (temperatura fría, 4°C). ■ Mes 0 (TA), ■ Mes 1 (TA), ■ Mes 1 (TF), ■ Mes 2 (TA), ■ Mes 2 (TF).

Sin embargo, las pruebas estadísticas demuestran que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos y temperatura, pero si hay significancia en cuanto al tiempo de almacenamiento ($P < 0.05$), es decir, en la concentración conidial el proceso de encapsulación o las temperaturas de almacenamiento probadas no tienen efecto significativo, pero el tiempo de almacenamiento sí.

Específicamente en el segundo mes, entre los efectos principales, el método de encapsulación de FCPE es el que tiene mayor efecto; en cuanto a tratamientos A+C+Ch, Q+C+Ch, A+C, Q+C, la temperatura de mayor efecto es la temperatura ambiente (25°C). Pero al comparar contra el inóculo todos los tratamientos evaluados, el tiempo de almacenamiento también deja de influir en los resultados del análisis, volviendo a la concentración del inóculo el factor de mayor significancia.

6.6 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS DE *B. bassiana* DENTRO DE LAS CÁPSULAS

En el seguimiento de la actividad volumétrica enzimática que actúa como mecanismo de defensa contra plagas o de adaptación a nuevos hábitat, se observó que las actividades enzimáticas fueron decayendo con el tiempo. Los resultados obtenidos para GI, pH 1.5, y CPE, pH 4, pueden indicar nula actividad biológica del ACB dentro de la cápsula (Figura 29). Sin embargo, en el sexto mes aún existía presencia de actividad enzimática en las cápsulas almacenadas a temperatura ambiente, lo que puede indicar que la matriz polimérica tiene potencial para la encapsulación enzimática, ya que mantuvo la actividad enzimática aún sin enfriamiento, que es requerido en las enzimas para mantener su actividad y eficacia. Sin embargo, se debe considerar el hecho de que la actividad enzimática disminuye con el almacenamiento. Otro mecanismo sugerido, aparte de la temperatura, que causa la pérdida de actividad es el envejecimiento de la enzima, que se produce debido a la oxidación de las proteínas que modifican los residuos de histidina y lisina afectando su función enzimática o biológica (Machado *et al.*, 1991).

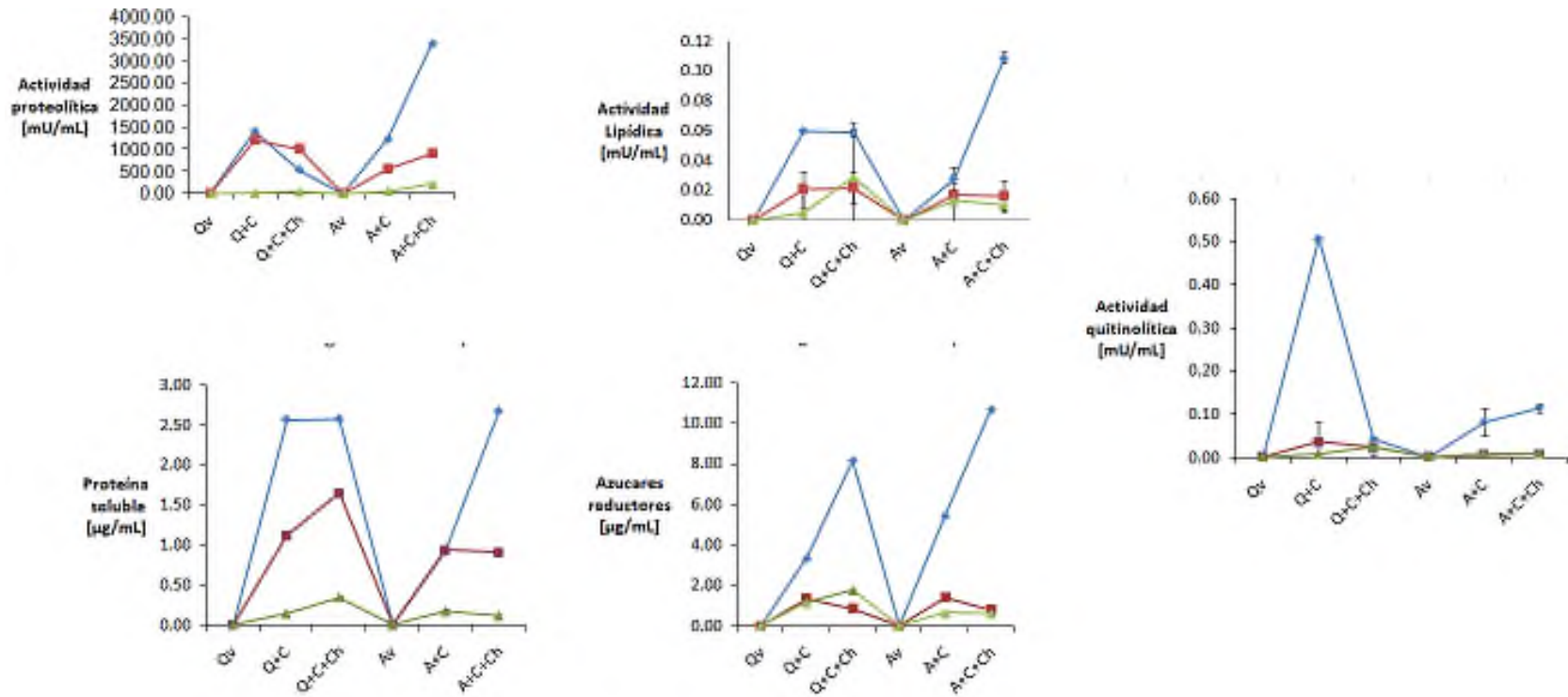


Figura 29. Actividades enzimáticas por miligramo de cápsula en los diferentes métodos de encapsulación (GI, pH 1.5 y FCPE) y en diferentes periodos de almacenamiento (0 y 6 meses) con diferentes temperaturas (TA y TF). ■ Mes 0, (TA), ■ Mes 6 (TA), ■ Mes 6 (TF).

Al comparar el cambio de pH en la encapsulación de GI contra la FCPE se observó que la tendencia en la actividad enzimática es muy similar, pues cuanto más pasa el tiempo, la concentración tiende a disminuir (Figura 30). Sin embargo, entre los tratamientos las cápsulas hechas con alginato, A+C y A+C+Ch, son las que presentaron una actividad enzimática mayor; sumado a esto la actividad quitinolítica también aumentó en comparación con el inóculo, indicándonos que el hongo posiblemente está consumiendo la cápsula, es decir, probablemente se está convirtiendo en sustrato. El hecho de que la actividad enzimática sea mayor, puede ser indicativo de que el hongo se está adaptando al nuevo sustrato. Los tratamientos de GI contienen la mayor concentración de esta enzima, debido a que los tratamientos de Q+C y Q+C+Ch son aquellos donde el quitosano está en contacto directo con el ACB.

Algunos reportes sugieren que los metabolitos secundarios producidos por *B. bassiana* desactivan varios mecanismos inmunitarios del hospedero, que ayuda al hongo a superar y matar a su huésped (Gillespie & Claydon 1989; Zibae *et al.* 2009). Sin embargo, los insectos hospederos también tienden a producir enzimas que juegan un papel importante en la eliminación de compuestos extraños y en el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales, estas enzimas incluyen esterasas, fosfatasa ácida y alcalina, monooxigenasas de citocromo P450 y GST (Gordon, 1961), las cuales protegen a los insectos del ataque de las esporas y metabolitos de los hongos entomopatógenos e incluso de algunos insecticidas, sin embargo, los HEP tiene la capacidad de producir enzimas hidrolíticas que juegan un papel importante en la escisión de los ésteres que comprenden ácidos orgánicos, minerales, alcoholes o fenoles (Flores *et al.*, 2006; Sukhirun *et al.*, 2011).

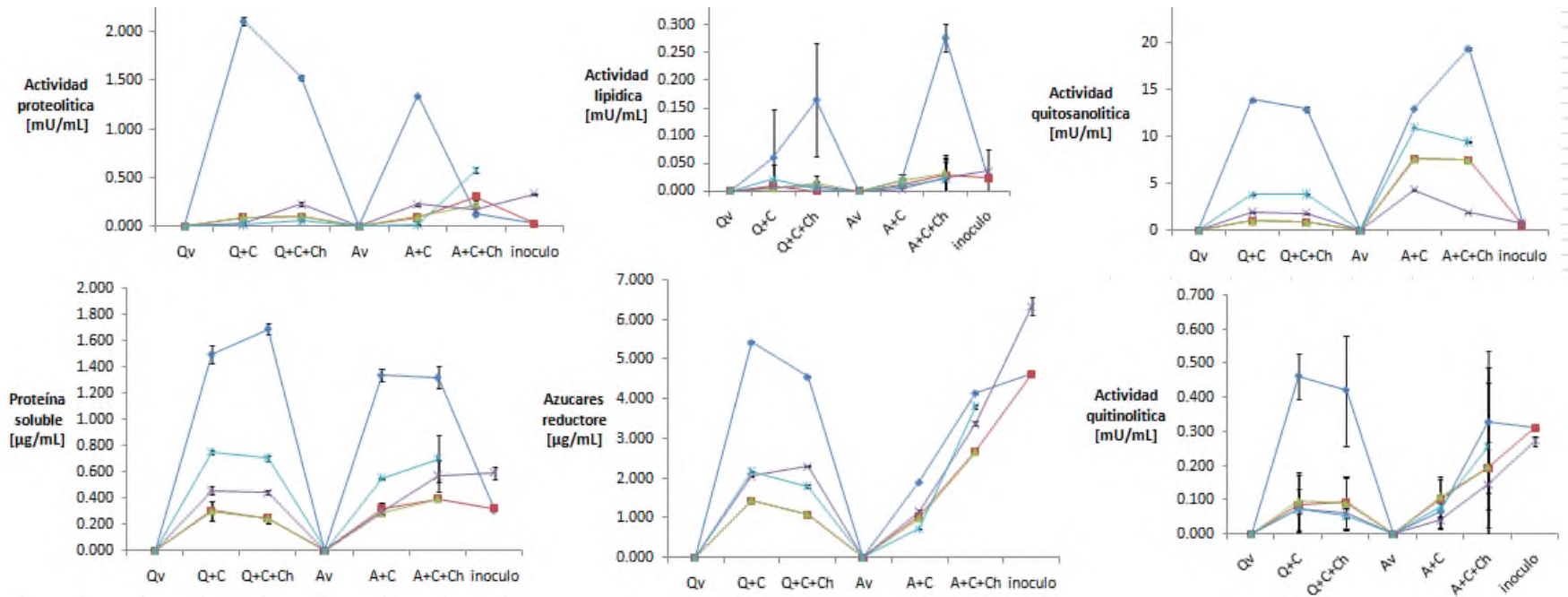


Figura 30. Actividades enzimáticas por miligramo de cápsula en los diferentes métodos de encapsulación (GI pH 4 y FCPE) y en diferentes periodos de almacenamiento (0 y 1 mes) con diferentes temperaturas (TA y TF). ♦ Mes 0 (TA) ■ Mes 1 (TA) ▲ Mes 1 (TF), × Mes 2 (TA), × Mes 2 (TF).

Li *et al.*, (2014) reportó actividades de quitinasa de 4.3-18.7 U/mL, sin embargo, en este proyecto la actividad quitinolítica por miligramo de cápsula se encuentran >1 mU/mL, pero no descarta el hecho de que la cepa sigue siendo viable y además presenta germinación al final de la observación, lo que podría mantener la integridad y la maquinaria enzimática del microorganismo. Algunos autores argumentan que las tasas de crecimiento de colonias, las tasas de germinación de conidios y la cantidad de producción de esporas son necesarias para producir esporas con mayor eficiencia y virulencia durante la producción industrial de pesticidas fúngicos; debido que al llegar a un entorno natural, las cepas tendrán la capacidad de producir más esporas para la próxima infección, y para completar el ciclo de difusión después de terminar de infectar al insecto huésped.

Lo mismo sucede al comparar los resultados de Dhawan *et al.*, (2017) quienes obtuvieron la media máxima de quitinasa (0.51 U/mL), proteasa (1.12 U/mL) y actividad lipasa (1.36 U/mL) por arriba de los valores obtenidos en este trabajo. Sin embargo, en cuanto a la concentración de conidios, este trabajo obtuvo una mayor densidad conidial, mientras se reportan concentraciones de 1×10^7 y 1×10^9 conidios/mL; los valores mínimos obtenidos fueron de 5.6×10^{14} y máximos de $1 - 1.52 \times 10^{15}$. Sugiriendo que las posibles funciones de las enzimas extracelulares en la patogenicidad de *B. bassiana* son efectivas contra algún insecto hospedero. Mientras que otros autores han demostrado que la quitinasa secretada por *B. bassiana* está estrechamente relacionada con la virulencia de la cepa (Gupta *et al.*, 1992; Havukkala *et al.*, 1993). También se ha demostrado que las quitinasas altamente expresadas en *B. bassiana* podrían incrementar significativamente la virulencia (Fang *et al.*, 2005), mientras que (Toledo *et al.*, 2010) observaron que durante el proceso de conidios que germinan y penetran en la epidermis, la quitinasa secretada, la esterasa y la proteasa extracelular destruyen la superficie corporal de los insectos y promueven la invasión exitosa de las hifas, contrastando con la idea de que sólo la quitinasa participa en la degradación de la pared corporal del insecto por si sola; además (Petlamul and Prasertsan, 2012) argumentaron que las cepas con mayor tasa de germinación tenían una virulencia

más fuerte, lo que compensa la baja actividad enzimática obtenida al observarse germinación en el segundo mes de observación; aunque aún no se encuentra una correlación obvia entre la tasa de germinación y la virulencia de los aislados (Lie *et al.*, 2003). No se debe descartar que el amplio rango de hospederos de hongos entomopatógenos pueda tener una ventaja comercial para la industria de control biológico, así como también la combinación de diferentes enzimas para penetrar en sus huéspedes, debido a que juegan un papel importante en el rango de hospederos de hongos aislados.

7. CONCLUSIONES

El proceso de encapsulación mediante GI y CPE permitió la formación de cápsulas con un microorganismo y un sustrato dentro de ellas, las cuales se mostraron estables. Formando cápsulas altamente higroscópicas, con la capacidad de recuperar su forma original incluso después del proceso de secado (liofilizado).

El porcentaje de desacetilación (DD) y peso molecular (PM) de los polímeros utilizados, así como el pH de las reacciones de entrecruzamiento generó cápsulas porosas, permitiendo la facilidad de hinchamiento y permeabilidad de las cápsulas. Todo lo anterior en conjunto, contribuyó a mantener la viabilidad y las condiciones adecuadas para el crecimiento del hongo, estos resultados se vieron reflejados en el aumento conidial, en la estabilidad de las cápsulas, la germinación y el pronto crecimiento (3 días) de micelio fúngico, después de los diferentes periodos de almacenamiento. El aumento de la concentración conidial mejoró la viabilidad frente a las temperaturas evaluadas, el método de encapsulación y la adición del sustrato.

A pesar de que ambos tratamientos de encapsulación resultaron eficaces, el más recomendado es la formación de complejos polielectrólitos, por los mejores resultados presentados en la viabilidad, conteo de conidios y germinación. Sin embargo, la GI no deja de ser una técnica que da valor al desecho de la cáscara de camarón; desperdicio que a la larga, se convertirá en un problema ambiental, para la flora y fauna marina, así como para el ser humano.

La encapsulación biológica ayudó a que el producto pueda almacenarse a temperatura ambiente, manteniendo vivo al ACB, aún cuando no se tenga las condiciones adecuadas de refrigeración o almacenamiento.

8. REFERENCIAS

1. Ahmad, I., Farah Ahmad, F. & John Pichtel (eds.) (2011) Microbes and Microbial Technology. Agricultural and Environmental Applications. *Earth and Environmental Science*. [Online]. Springer New York. Available from: [//www.springer.com/la/book/9781441979308](http://www.springer.com/la/book/9781441979308) [Accessed: 23 October 2017].
2. Alean, I., Morales, A., Holguín, C.M. & Bellotti, A.C. (2004) Patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de *Aleurotrachelus socialis* (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero. *Revista Colombiana de Entomología*. 30 (1), 29–36.
3. Argüelles-Monal, W., Heras, A., Miralles, B., Goycoolea, F.M., *et al.* (2004) Caracterización de Quitina y Quitosano. In: Ana Pastor de Abram (ed.). *Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones*. Lima, Pontificia Universidad Católica del Perú. p.
4. Azamar-Jiménez, I.J. (2016) Caracterización de los perfiles enzimáticos de *Beauveria bassiana* 885.2 en fermentación líquida utilizando chapulín como inductor. *Tesis Licenciatura*. San Juan Bautista, Tuxtepec, Oaxaca, Universidad del Papaloapan. Campus Tuxtepec.
5. Barragán, C.A.R. (2016) Determinación del grado de desacetilación de quitosana mediante titulación potenciométrica, FTIR y Raman. *Journal CIM*. 4 (1). 769-776.
6. Batista, D.P.C., Souza, R. da S., Santos-Magalhães, N.S., de Sena-Filho, J.G., *et al.* (2014) Polymer/Layered Silicate Nanocomposite as Matrix for Bioinsecticide Formulation. *Macromolecular Symposia*. [Online] 344 (1), 14–21. Available from: doi:10.1002/masy.201300208.
7. Benesch, J. & Tengvall, P. (2002) Blood protein adsorption onto chitosan. *Biomaterials*. [Online] 23 (12), 2561–2568. Available from: doi:10.1016/S0142-9612(01)00391-X.
8. Bhumkar, D.R. & Pokharkar, V.B. (2006) Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: a technical note. *AAPS PharmSciTech*. [Online] 7 (2), E50. Available from: doi:10.1208/pt070250.
9. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. [Online] 72 (1), 248–254. Available from: doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
10. Buchholz, K. & Klein, J. (1987) Characterization of immobilized biocatalysts. In: *Methods in Enzymology*. Immobilized Enzymes and Cells Part B.

- [Online]. Academic Press. pp. 3–30. Available from: doi:10.1016/0076-6879(87)35062-1 [Accessed: 23 October 2017].
11. Cortez-Madrigal, H. (2006) Efecto de Coadyuvantes en *Lecanicillium lecanii* (Zimm.) Zare y Gams y su Virulencia hacia *Toxoptera aurantii* Boyer. *Revista Mexicana de Fitopatología*. [Online] 24 (1). Available from: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=61224109> [Accessed: 23 October 2017].
 12. Daoust, R.A., Ward, M.G. & Roberts, D.W. (1982) Effect of formulation on the virulence of *Metarhizium anisopliae* conidia against mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*. [Online] 40 (2), 228–236. Available from: doi:10.1016/0022-2011(82)90120-3.
 13. de Albuquerque Maranhão, E.A. & de Albuquerque Maranhão, E.H. (2013) Hongos Entomopatógenos: Importante Herramienta para el control de 'Moscas Blancas' (Homoptera Aleyrodidae). *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*. 5, 209–242.
 14. de Alvarenga, E.S., Pereira de Oliveira, C. & Roberto Bellato, C. (2010) An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*. [Online] 80 (4), 1155–1160. Available from: doi:10.1016/j.carbpol.2010.01.037.
 15. Despond, S., Espuche, E. & Domard, A. (2001) Water sorption and permeation in chitosan films: Relation between gas permeability and relative humidity. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. [Online] 39 (24), 3114–3127. Available from: doi:10.1002/polb.10064.
 16. Dhawan, M., Joshi, N., Dhawan, M. & Joshi, N. (2017) Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN. *Brazilian Journal of Microbiology*. [Online] 48 (3), 522–529. Available from: doi:10.1016/j.bjm.2016.08.004.
 17. Dimzon, I.K.D. & Knepper, T.P. (2015) Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *International Journal of Biological Macromolecules*. [Online] 72, 939–945. Available from: doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.09.050.
 18. Echeverría-Beirute, F. (2006) Caracterización biológica y molecular de aislamientos del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin. Tesis Bachiller. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
 19. Fan, W., Yan, W., Xu, Z. & Ni, H. (2012) Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. [Online] 90, 21–27. Available from: doi:10.1016/j.colsurfb.2011.09.042.

20. Fan, Y., Pei, X., Guo, S., Zhang, Y., *et al.* (2010) Increased virulence using engineered protease-chitin binding domain hybrid expressed in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbial Pathogenesis*. [Online] 49 (6), 376–380. Available from: doi:10.1016/j.micpath.2010.06.013.
21. Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., *et al.* (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. [Online] 71 (1), 363–370. Available from: doi:10.1128/AEM.71.1.363-370.2005.
22. Filippov, M.P. & Kohn, R. (1974) Determination of composition of alginates by infrared spectroscopic method. *Chemical Papers*. 28 (6) pp.817–819.
23. Flores, A.E., Salomon Grajales, J., Fernández, I., Ponce García, G., *et al.* (2006) Mechanisms of Insecticide Resistance in Field Populations of *Aedes Aegypti* (L) From Quintana Roo, Southern Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 22 (4), 672–677.
24. Franks, F. (1998) Freeze-drying of bioproducts: putting principles into practice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. [Online] 45 (3), 221–229. Available from: doi:10.1016/S0939-6411(98)00004-6.
25. Fravel, D.R. (1985) Encapsulation of Potential Biocontrol Agents in an Alginate-Clay Matrix. *Phytopathology*. [Online] 75 (7), 774. Available from: doi:10.1094/Phyto-75-774.
26. Fravel, D.R., Marois, J.J., Lumsden, E. & Connick, W.J. (1985) Encapsulation of Potential Biocontrol Agents in an Alginate-Clay Matrix. *Phytopathology*. 75 (7), 774–777.
27. Galazzo, J.L. & Bailey, J.E. (1990) Growing *Saccharomyces cerevisiae* in calcium-alginate beads induces cell alterations which accelerate glucose conversion to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. [Online] 36 (4), 417–426. Available from: doi:10.1002/bit.260360413.
28. Gandarilla-Pacheco, F. Lizeth, Galán-Wong, Luis J., Arévalo-Niño, Katiushka, Elías-Santos, Myriam, & Quintero-Zapata, Isela. (2013). Evaluación de aislados nativos mexicanos de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordycipitaceae) provenientes de zonas citrícolas para su producción masiva en cultivo sumergido y bifásico. *Agrociencia*, 47(3), 255-266. Recuperado en 27 de agosto de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000300005&lng=es&tlng=es.
29. Gerding-González, M., France, A., Sepulveda, M.E. & Campos, J. (2007a) Use of chitin to improve a *Beauveria bassiana* alginate-pellet formulation.

Biocontrol Science and Technology. [Online] 17 (1), 105–110. Available from: doi:10.1080/09583150600937717.

30. Gillespie, A.T. & Claydon, N. (1989) The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pesticide Science*. [Online] 27 (2), 203–215. Available from: doi:10.1002/ps.2780270210.
31. Gordon, H.T. (1961) Nutritional Factors in Insect Resistance to Chemicals. *Annual Review of Entomology*. [Online] 6 (1), 27–54. Available from: doi:10.1146/annurev.en.06.010161.000331.
32. Gouli, V., Gouli, S. & Kim, J.S. (2014) Production of *Beauveria bassiana* Air Conidia by Means of Optimization of Biphasic System Technology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. [Online] 57 (4), 571–577. Available from: doi:10.1590/S1516-8913201401745.
33. Gupta, S.C., Leathers, T.D., El-Sayed, G.N. & Ignoffo, C.M. (1992) Insect cuticle-degrading enzymes from the entomogenous fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology*. [Online] 16 (2), 132–137. Available from: doi:10.1016/0147-5975(92)90019-N.
34. Havukkala, I., Mitamura, C., Hara, S., Hirayae, K., *et al.* (1993) Induction and Purification of *Beauveria bassiana* Chitinolytic Enzymes. *Journal of Invertebrate Pathology*. [Online] 61 (1), 97–102. Available from: doi:10.1006/jipa.1993.1017.
35. Horaczek, A. & Viernstein, H. (2004) Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*. [Online] 31 (1), 65–71. Available from: doi:10.1016/j.biocontrol.2004.04.016.
36. Hu, B., Pan, C., Sun, Y., Hou, Z., *et al.* (2008) Optimization of fabrication parameters to produce chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for delivery of tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [Online] 56 (16), 7451–7458. Available from: doi:10.1021/jf801111c.
37. Hyunah, L., Chanmin, J., Kashif, G., Sungyeon, C., *et al.* (2011) Oral delivery of insulin using chitosan capsules cross-linked with phytic acid. *Bio-Medical Materials and Engineering*. [Online] (1), 25–36. Available from: doi:10.3233/BME-2011-0654.
38. Ishihara, M., Obara, K., Nakamura, S., Fujita, M., *et al.* (2006) Chitosan hydrogel as a drug delivery carrier to control angiogenesis. *Journal of Artificial Organs*. [Online] 9 (1), 8–16. Available from: doi:10.1007/s10047-005-0313-0.

39. Jenkins, NE., Heviefó. G., Langewald, J., Cherry, AJ, Lomer Ch. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. *Biocontrol News and Inform.* 1998; 19(1): 21-31.
40. Jiménez-Alejandro, S.E. (2015) Producción de quitinasas en cultivo líquido con hongos entomo y fitopatógenos, utilizando tres fuentes de quitina como inductor. *Tesis Maestría*. San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, Universidad del Papaloapan. Campus Tuxtepec.
41. Khachatourians, G.G. (1986) Production and use of biological pest control agents. *Trends in Biotechnology*. [Online] 4 (5), 120–124. Available from: doi:10.1016/0167-7799(86)90144-7.
42. Knudsen, G.R., Johnson, J.B. & Eschen, D.J. (1990) Alginate Pellet Formulation of a *Beauveria bassiana* (Fungi: Hyphomycetes) Isolate Pathogenic to Cereal Aphids. *Journal of Economic Entomology*. [Online] 83 (6), 2225–2228. Available from: doi:10.1093/jee/83.6.2225.
43. Kunitz, M. (1947) Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor: II. General Properties. *The Journal of General Physiology*. 30 (4), 291–310.
44. Kurek, M., Guinault, A., Voilley, A., Galić, K., *et al.* (2014) Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chemistry*. [Online] 144, 9–17. Available from: doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.132.
45. Lankalapalli, S. & Kolapalli, V.R.M. (2009) Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. [Online] 71 (5), 481–487. Available from: doi:10.4103/0250-474X.58165.
46. Lee, O.-S., Ha, B.-J., Park, S.-N. & Lee, Y.-S. (1997) Studies on the pH-dependent swelling properties and morphologies of chitosan/calcium-alginate complexed beads. *Macromolecular Chemistry and Physics*. [Online] 198 (9), 2971–2976. Available from: doi:10.1002/macp.1997.021980925.
47. Lewis, J.A. & Papavizas, G.C. (1987) Application of *Trichoderma* and *Gliocladium* in alginate pellets for control of *Rhizoctonia* damping-off. *Plant Pathology*. [Online] 36 (4), 438–446. Available from: doi:10.1111/j.1365-3059.1987.tb02260.x.
48. Li, M., Li, S., Xu, A., Lin, H., *et al.* (2014) Selection of *Beauveria* Isolates Pathogenic to Adults of *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Science*. [Online] 14 (32), 1–12. Available from: doi:10.1673/031.014.32.
49. Li, Z., Alves, S.B., Roberts, D.W., Fan, M., *et al.* (2010) Biological control of insects in Brazil and China: history, current programs and reasons for their successes using entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and*

Technology. [Online] 20 (2), 117–136. Available from: doi:10.1080/09583150903431665.

50. Lie, Z., Han, Z., Wang, Y., Zhang, L., *et al.* (2003) Selection for imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: cross-resistance patterns and possible mechanisms. *Pest management science*. [Online] Available from: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300945223> [Accessed: 10 November 2017].
51. Lim, S.T., Martin, G.P., Berry, D.J. & Brown, M.B. (2000) Preparation and evaluation of the *in vitro* drug release properties and mucoadhesion of novel microspheres of hyaluronic acid and chitosan. *Journal of Controlled Release*. [Online] 66 (2), 281–292. Available from: doi:10.1016/S0168-3659(99)00285-0.
52. Liu, C.P. & Liu, S.D. (2009a) Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. *Journal of Microencapsulation*. [Online] 26 (5), 377–384. Available from: doi:10.1080/02652040802365455.
53. Liu, C.-P. & Liu, S.-D. (2009b) Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the Fungus *Beauveria bassiana*. *Drying Technology*. [Online] 27 (6), 747–753. Available from: doi:10.1080/07373930902828005.
54. Liu, C.-X., Chen, G.H., Sun, M.K., Fan, J.S., *et al.* (2003) Determination of the degree of deacetylation of chitosan by multiwavelength linear regression UV spectrophotometry. *Journal of Ocean University of Qingdao*. 133, 148–154.
55. Machado, A., Ayala, A., Gordillo, E., Revilla, E., *et al.* (1991) Relationship between enzymatic activity loss and post-translational protein modification in aging. *Archives of Gerontology and Geriatrics*. [Online] 12 (2), 187–197. Available from: doi:10.1016/0167-4943(91)90027-N.
56. Marques, E.J., Alves, S.B. & Marques, I.M.R. (1999a) Effects of the temperature and storage on formulations with Mycelia of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill and *Metarhizium anisopliae* (Metschn.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. [Online] 42 (2), 0–0. Available from: doi:10.1590/S1516-89131999000200004.
57. Martinsen, A., Skjåk-Bræk, G., Smidsrød, O., Zanetti, F., *et al.* (1991) Comparison of different methods for determination of molecular weight and molecular weight distribution of alginates. *Carbohydrate Polymers*. [Online] 15 (2), 171–193. Available from: doi:10.1016/0144-8617(91)90031-7.
58. Mascarin, G.M., Kobori, N.N., Quintela, E.D. & Delalibera, I. (2013) The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate

- fermentation. *Biological Control*. [Online] 66 (3), 209–218. Available from: doi:10.1016/j.biocontrol.2013.05.001.
59. Mazur, P. (1977) The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. [Online] 14 (3), 251–272. Available from: doi:10.1016/0011-2240(77)90175-4.
60. Mazzitelli, S., Capretto, L., Quinci, F., Piva, R., *et al.* (2013) Preparation of cell-encapsulation devices in confined microenvironment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [Online] 65 (11–12), 1533–1555. Available from: doi:10.1016/j.addr.2013.07.021.
61. Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Lee, S.-T. & Wong, T.-B. (1999) Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*. [Online] 37 (14), 1551–1564. Available from: doi:10.1002/(SICI)1099-0488(19990715)37:14<1551::AID-POLB1>3.0.CO;2-H.
62. Miller, G.L. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. [Online] 31 (3), 426–428. Available from: doi:10.1021/ac60147a030.
63. Miller, I.J. (1996) Alginate composition of some New Zealand brown seaweeds. *Phytochemistry*. [Online] 41 (5), 1315–1317. Available from: doi:10.1016/0031-9422(95)00741-5.
64. Mishra, S. & Malik, A. (2012) Comparative evaluation of five *Beauveria* isolates for housefly (*Musca domestica* L.) control and growth optimization of selected strain. *Parasitology Research*. [Online] 111 (5), 1937–1945. Available from: doi:10.1007/s00436-012-3039-y.
65. Montesinos-Matías, R. (2012) Relación de la inducción/represión de enzimas hidrolíticas con la inefectividad en cepas de *Beauveria bassiana* resistentes a 2-desoxi-D-glucosa. *Tesis Doctorado*. Iztapalapa. México, Universidad Autónoma Metropolitana.
66. Motta-Delgado, P.A. & Murcia-Ordoñez, B. (2011) Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente & Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science*. 6 (2), 77–90.
67. No, H.K. & Prinyawiwatkul, W. (2009) Stability of Chitosan Powder during Long-Term Storage at Room Temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [Online] 57 (18), 8434–8438. Available from: doi:10.1021/jf902012t.

68. Nuñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R. & Loera, O. (2010) Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. [Online] 53 (4), 771–777. Available from: doi:10.1590/S1516-89132010000400004.
69. Padmavathi, J., Devi, K.U. & Rao, C.U.M. (2003) The optimum and tolerance pH range is correlated to colonial morphology in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* – a potential biopesticide. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. [Online] 19 (5), 469–477. Available from: doi:10.1023/A:1025151000398.
70. Palomo, J.M., Muñoz, G., Fernández-Lorente, G., Mateo, C., *et al.* (2002) Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. [Online] 19–20 (Supplement C), 279–286. Available from: doi:10.1016/S1381-1177(02)00178-9.
71. Park, J.K. & Chang, H.N. (2000) Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*. [Online] 18 (4), 303–319. Available from: doi:10.1016/S0734-9750(00)00040-9.
72. Peniche, C., Argüelles-Monal, W., Peniche, H. & Acosta, N. (2003) Chitosan: An Attractive Biocompatible Polymer for Microencapsulation. *Macromolecular Bioscience*. [Online] 3 (10), 511–520. Available from: doi:10.1002/mabi.200300019.
73. Peppas, N.A. & Khare, A.R. (1993) Preparation, structure and diffusional behavior of hydrogels in controlled release. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [Online] 11 (1), 1–35. Available from: doi:10.1016/0169-409X(93)90025-Y.
74. Pereira, R.M. & Roberts, D.W. (1991b) Alginate and Cornstarch Mycelial Formulations of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Economic Entomology*. [Online] 84 (6), 1657–1661. Available from: doi:10.1093/jee/84.6.1657.
75. Petlamul, W. & Prasertsan, P. (2012) Evaluation of Strains of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against *Spodoptera litura* on the Basis of Their Virulence, Germination Rate, Conidia Production, Radial Growth and Enzyme Activity. *Mycobiology*. [Online] 40 (2), 111–116. Available from: doi:10.5941/MYCO.2012.40.2.111.
76. Pham, T.A., Kim, J.J., Kim, S.G. & Kim, K. (2009) Production of Blastospore of Entomopathogenic *Beauveria bassiana* in a Submerged Batch Culture. *Mycobiology*. [Online] 37 (3), 218–224. Available from: doi:10.4489/MYCO.2009.37.3.218.

77. Pretty, J. & Bharucha, Z.P. (2015) Integrated Pest Management for Sustainable Intensification of Agriculture in Asia and Africa. *Insects*. [Online] 6 (1), 152–182. Available from: doi:10.3390/insects6010152.
78. Qiu, J., Song, F., Qiu, Y., Li, X., *et al.* (2013) Optimization of the medium composition of a biphasic production system for mycelial growth and spore production of *Aschersonia placenta* using response surface methodology. *Journal of Invertebrate Pathology*. [Online] 112 (2), 108–115. Available from: doi:10.1016/j.jip.2012.10.010.
79. Recillas, M., Silva, L.L., Peniche, C., Goycoolea, F.M., *et al.* (2011) Thermo- and pH-responsive polyelectrolyte complex membranes from chitosan-g-N-isopropylacrylamide and pectin. *Carbohydrate Polymers*. [Online] 86 (3), 1336–1343. Available from: doi:10.1016/j.carbpol.2011.06.047.
80. Rehner, S.A. & Buckley, E. (2005) A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. *Mycologia*. [Online] 97 (1), 84–98. Available from: doi:10.1080/15572536.2006.11832842.
81. Rehner, S.A., Minnis, A.M., Sung, G.-H., Luangsa-ard, J.J., *et al.* (2011) Phylogeny and systematics of the anamorphic, entomopathogenic genus *Beauveria*. *Mycologia*. [Online] 103 (5), 1055–1073. Available from: doi:10.3852/10-302.
82. Rinaudo, M. (2014) Biomaterials based on a natural polysaccharide: alginate. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. [Online] 17 (1), 92–96. Available from: doi:10.1016/S1405-888X(14)70322-5.
83. Rinaudo, M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. [Online] 31 (7), 603–632. Available from: doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001.
84. Rinaudo, M., Milas, M. & Dung, P.L. (1993) Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*. [Online] 15 (5), 281–285. Available from: doi:10.1016/0141-8130(93)90027-J.
85. Rohlf, M. & Churchill, A.C.L. (2011) Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal Genetics and Biology*. [Online] 48 (1), 23–34. Available from: doi:10.1016/j.fgb.2010.08.008.
86. Samson, R.A., Evans, H.C. & Latge, J.-P. (2013) Google-Books-ID: UM7sCAAQBAJ. *Atlas of Entomopathogenic Fungi*. Springer Science & Business Media.

87. Sannan, T., Kurita, K. & Iwakura, Y. (1975) Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. *Die Makromolekulare Chemie*. [Online] 176 (4), 1191–1195. Available from: doi:10.1002/macp.1975.021760426.
88. Santiago, P. & Orlando, C. (2015) Efectividad de un microencapsulado de *Beauveria bassiana* sobre *Metamasius spinolae*. Tesis Maestría. [Online]. Yautepec, Morelos, Instituto Politécnico Nacional. Available from: <http://tesis.ipn.mx:8080/xmlui/handle/123456789/13450> [Accessed: 23 October 2017].
89. dos Santos, Z.M., Caroni, A.L.P.F., Pereira, M.R., da Silva, D.R., et al. (2009) Determination of deacetylation degree of chitosan: a comparison between conductometric titration and CHN elemental analysis. *Carbohydrate Research*. [Online] 344 (18), 2591–2595. Available from: doi:10.1016/j.carres.2009.08.030.
90. Schoebitz, M., López, M.D. & Roldán, A. (2013) Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. [Online] 33 (4), 751–765. Available from: doi:10.1007/s13593-013-0142-0.
91. Schürks, N., Wingender, J., Flemming, H.-C. & Mayer, C. (2002) Monomer composition and sequence of alginates from *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Biological Macromolecules*. [Online] 30 (2), 105–111. Available from: doi:10.1016/S0141-8130(02)00002-8.
92. Shah, F., Allen, N., Wright, C.J. & Butt, T.M. (2007) Repeated *in vitro* subculturing alters spore surface properties and virulence of *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. [Online] 276 (1), 60–66. Available from: doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00927.x.
93. Shah, F.A., Wang, C.S. & Butt, T.M. (2005) Nutrition influences growth and virulence of the insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *FEMS Microbiology Letters*. [Online] 251 (2), 259–266. Available from: doi:10.1016/j.femsle.2005.08.010.
94. Shah, P.A. & Pell, J.K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*. [Online] 61 (5–6), 413–423. Available from: doi:10.1007/s00253-003-1240-8.
95. Shigemasa, Y., Saito, K., Sashiwa, H. & Saimoto, H. (1994) Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *International Journal of Biological Macromolecules*. [Online] 16 (1), 43–49. Available from: doi:10.1016/0141-8130(94)90010-8.
96. Shin-ya, Y., Lee, M.-Y., Hinode, H. & Kajiuchi, T. (2001) Effects of N-acetylation degree on N-acetylated chitosan hydrolysis with commercially

- available and modified pectinases. *Biochemical Engineering Journal*. [Online] 7 (1), 85–88. Available from: doi:10.1016/S1369-703X(00)00129-7.
97. Shu, X.Z. & Zhu, K.J. (2001) Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. *Journal of Microencapsulation*. [Online] 18 (2), 237–245. Available from: doi:10.1080/02652040010000415.
 98. Sing, K.S.W. (1985) Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). *Pure and Applied Chemistry*. [Online] 57 (4), 603–619. Available from: doi:10.1351/pac198557040603.
 99. Sukhirun, N., Pluempanupat, W., Bullangpoti, V. & Koul, O. (2011) Bioefficacy of *Alpinia galanga* (Zingiberaceae) Rhizome Extracts, (E) -p-Acetoxybenzyl Alcohol, and (E) -p-Coumaric Alcohol Ethyl Ether Against *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) and the Impact on Detoxification Enzyme Activities. *Journal of Economic Entomology*. [Online] 104 (5), 1534–1540. Available from: doi:10.1603/EC11080.
 100. Szymańska, E. & Winnicka, K. (2015) Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*. [Online] 13 (4), 1819–1846. Available from: doi:10.3390/md13041819.
 101. Thommes, M. (2010) Physical Adsorption Characterization of Nanoporous Materials. *Chemie Ingenieur Technik*. [Online] 82 (7), 1059–1073. Available from: doi:10.1002/cite.201000064.
 102. Toledo, A.V., de Remes Lenicov, A.M.M. & López Lastra, C.C. (2010) Histopathology Caused by the Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, in the Adult Planthopper, *Peregrinus maidis*, a Maize Virus Vector. *Journal of Insect Science*. [Online] 10 (35), 1–10. Available from: doi:10.1673/031.010.3501.
 103. Tronsmo, A. & Harman, G.E. (1993) Detection and Quantification of N-Acetyl- β -D-glucosaminidase, Chitobiosidase, and Endochitinase in Solutions and on Gels. *Analytical Biochemistry*. [Online] 208 (1), 74–79. Available from: doi:10.1006/abio.1993.1010.
 104. Vega, F.E. & Blackwell, M. (2005) Google-Books-ID: HXb5OXNaRyQC. *Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution*. Oxford University Press.
 105. Vemmer, M. & Patel, A.V. (2013) Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*. [Online] 67 (3), 380–389. Available from: doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.003.

106. Wang, Y.-X., Robertson, J.L., Jr, W.B.S. & Claus, R.O. (2004) Effects of the Chemical Structure and the Surface Properties of Polymeric Biomaterials on Their Biocompatibility. *Pharmaceutical Research*. [Online] 21 (8), 1362–1373. Available from: doi:10.1023/B:PHAM.0000036909.41843.18.
107. Watanabe, Y., Fang, X., Minemoto, Y., Adachi, S., *et al.* (2002) Suppressive Effect of Saturated Acyl L-Ascorbate on the Oxidation of Linoleic Acid Encapsulated with Maltodextrin or Gum Arabic by Spray-Drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. [Online] 50 (14), 3984–3987. Available from: doi:10.1021/jf011656u.
108. Wu, Z., Guo, L., Qin, S. & Li, C. (2012) Encapsulation of *R. planticola* Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. [Online] 39 (2), 317–327. Available from: doi:10.1007/s10295-011-1028-2.
109. Xiao, G., Ying, S.-H., Zheng, P., Wang, Z.-L., *et al.* (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific Reports*. [Online] 2, srep00483. Available from: doi:10.1038/srep00483.
110. Zhang, Y., Zhang, X., Ding, R., Zhang, J., *et al.* (2011) Determination of the degree of deacetylation of chitosan by potentiometric titration preceded by enzymatic pretreatment. *Carbohydrate Polymers*. [Online] 83 (2), 813–817. Available from: doi:10.1016/j.carbpol.2010.08.058.
111. Zibae, A., Bandani, A.R. & Tork, M. (2009) Effect of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*, and its secondary metabolite on detoxifying enzyme activities and acetylcholinesterase (AChE) of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutellaridae). *Biocontrol Science and Technology*. [Online] 19 (5), 485–498. Available from: doi:10.1080/09583150902847127.

9. ANEXOS

9.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN

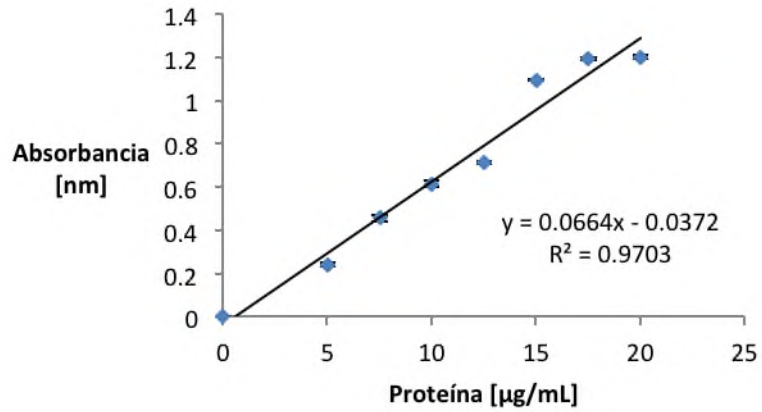


Figura 31. Curva estándar de proteína empleando seroalbúmina bovina (BSA) por el método de micro ensayo de Bradford.

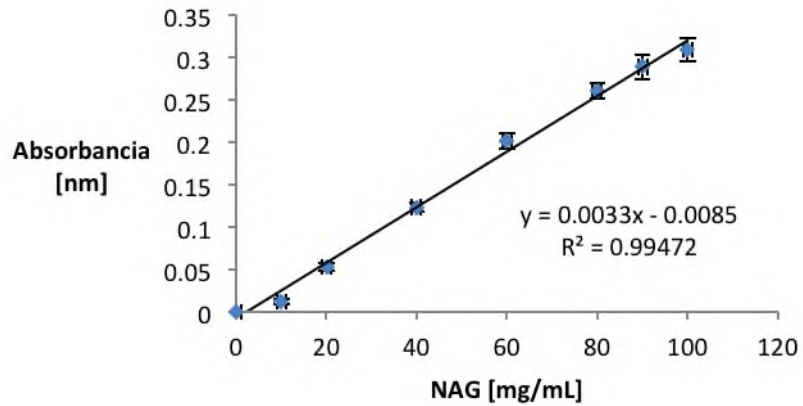


Figura 32. Curva estándar de reductores por el método de Miller (1959) empleando *N*-acetilglucosamina (NAG) como estándar.

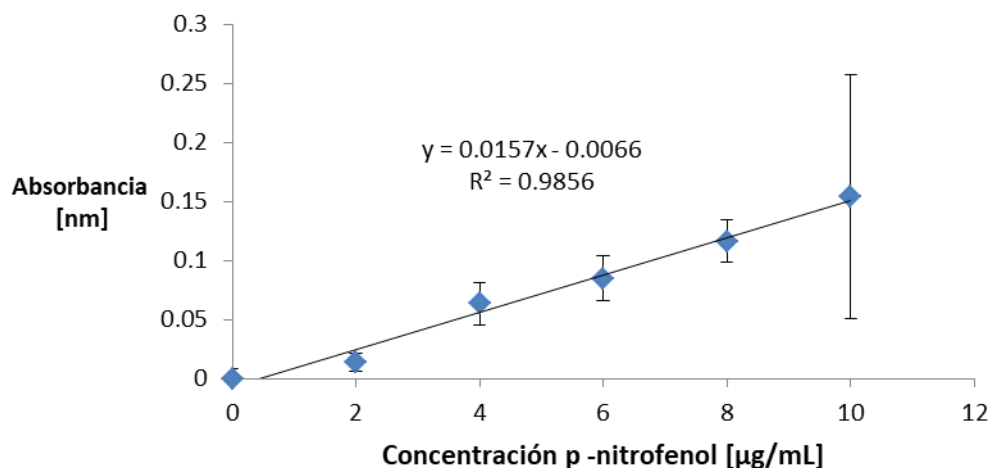


Figura 33. Curva estándar de *N*-acetilhexosaminidasa, empleando una solución madre de *p*-nitrofenol a una concentración de 100µg/mL.

9.2 CONTEO CONIDIAL

Tabla 13. Conidios por miligramo de inóculo [Con/mg], utilizado para hacer las cápsulas en diferentes periodos de almacenamiento.

Tiempo	Inóculo [1x10 ¹⁶ conidios/mg]
Mes 0	5.158 ±.016
Mes 1	5.260±0.15
Mes 2	5.000±.008

Tabla 14. Conidios por miligramo de cápsula [conidios/mg], contenidos en los diferentes tratamientos con un periodo de almacenamiento de 3 y 6 meses.

Muestra	pH	MES 0	MES 3		MES 6	
		[1x10 ⁵ conidios/mg]	[1x10 ⁵ conidios/mg]		[1x10 ⁵ conidios/mg]	
		T = 25°C	T = 25°C	T = 4°C	T = 25°C	T = 4°C
Qv	1.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Q+C		7.30±0.0003	5.00±0.0003	7.60±0.0003	4.00±0.00002	5.00±0.0004
Q+C+Ch		7.30±0.0007	13.90±0007	17.20±0.001	10.90±0.0002	11.20±0.00008
Av	4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A+C		5.33±0.0001	6.03±0001	8.08±0.0002	4.50±0.0002	7.15±0.00007
A+C+Ch		16.0.±0.0001	13.50±0.0001	4.6±0.0001	10.00±0.0001	2.92±0.0007

Tabla 15. Conidios por miligramo de cápsula [conidios/mg], contenidos en los diferentes tratamientos con un periodo de almacenamiento de 1 y 2 meses.

Muestra	pH	MES 0	MES 1		MES 2	
		[1x10 ⁷ conidios/mg]	[1x10 ⁷ conidios/mg]		[1x10 ⁷ conidios/mg]	
		T = 25°C	T = 25°C	T = 4°C	T = 25°C	T = 4°C
Qv	4	0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
Q+C		7.4 ± 0.53	28150.0 ± 35.6	28260.0 ± 35.6	56342000 ± 28.3	104780000 ± 88.8
Q+C+Ch		1.4 ± 0.50	5667.0 ± 5.5	5816.0 ± 5.5	52534000 ± 19.8	90830000 ± 8.1
Av		0.0 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0	0.00 ± 0.0
A+C		17.9 ± 0.71	75254.0 ± 19.7	75660.0 ± 19.7	71476000 ± 11.5	88572000 ± 21.6
A+C+Ch		11.3 ± 0.87	50247.0 ± 41.9	50360.0 ± 41.9	85128000 ± 38.0	152420000 ± 21.5

9.3 ENZIMÁTICOS DE CÁPSULAS

Tabla 16. Proteína soluble [µg/mL] por miligramo de cápsula con tres y seis meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Proteína soluble [µg/mL]				
		Mes 0	Mes 3		Mes 6	
		T = 25°C	T = 25°C	T = 4°C	T = 25°C	T = 4°C
Qv	1.5	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000
Q+C		2.570±0.012	0.629±0.034	0.746±0.008	1.122±0.039	0.138±0.023
Q+C+Ch		2.579±0.004	1.250±0.026	0.965±0.006	1.649±0.03	0.341±0.009
Av	4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000
A+C		0.919±0.010	0.231±0.003	0.410±0.001	0.937±0.026	0.168±0.026
A+C+Ch		2.676±0.005	0.458±0.005	0.371±0.024	0.915±0.036	0.114±0.019

Tabla 17. Actividad quitinolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula con tres y seis meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Actividad Quitinolítica [mU/mL]				
		Mes 0	Mes 3		Mes 6	
		T = 25°C	T = 25°C	T = 4°C	T = 25°C	T = 4°C
Qv	1.5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Q+C		0.506±0.006	0.021±0.006	0.026±0.003	0.036±0.047	0.007±0.002
Q+C+Ch		0.040±0.005	0.037±0.003	0.057±0.014	0.022±0.017	0.024±0.008
Av	4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
A+C		0.080±0.032	0.013±0.001	0.009±0.001	0.006±0.000	0.008±0.006

A+C+Ch		0.114±0.011	0.200±0.060	0.023±0.003	0.007±0.002	0.008±0.005
---------------	--	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

Tabla 18. Actividad lipídica [mU/mL] por miligramo de cápsula con seis meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Actividad Lipídica [mU/mL]		
		Mes 0	Mes 6	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C
Qv	1.5	0.000	0.000	0.000
Q+C		0.060±0.001	0.021±0.012	0.005±0.001
Q+C+Ch		0.059±0.003	0.022±0.011	0.029±0.036
Av	4	0.000	0.000	0.000
A+C		0.028±0.002	0.017±0.001	0.013±0.002
A+C+Ch		0.109±0.004	0.016±0.010	0.010±0.005

Tabla 19. Actividad proteolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula con seis meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Actividad proteolítica [mU/mL]		
		Mes 0	Mes 6	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C
Qv	1.5	0.000	0.000	0.000
Q+C		1414.141±0.003	1220.591±0.025	11.934±0.004
Q+C+Ch		538.721±0.003	1008.418±0.004	37.808±0.013
Av	4	0.000	0.000	0.000
A+C		1234.568±0.004	561.151±0.004	57.130±0.016
A+C+Ch		3407.407±0.005	921.178±0.015	212.833±0.002

Tabla 20. Azúcares reductores [µg/mL] por miligramo de cápsula con seis meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Azúcares reductores [µg/mL]		
		Mes 0	Mes 6	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C
Qv	1.5	0.000	0.000	0.000
Q+C		3.333±0.002	1.325±0.016	1.146±0.004
Q+C+Ch		8.163±0.003	0.859±0.006	1.756±0.026
Av	4	0.000	0.000	0.000
A+C		5.431±0.004	1.395±0.007	0.635±0.012
A+C+Ch		10.667±0.005	0.789±0.007	0.622±0.001

Tabla 21. Proteína soluble [$\mu\text{g}/\text{mL}$] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Proteína soluble [$\mu\text{g}/\text{mL}$]				
		Mes 0	Mes 1		Mes 2	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C	T= 25°C.	T = 4°C
Qv	4	---	---	---	---	---
Q+C		1.498 \pm 0.07	0.304 \pm 0.07	0.304 \pm 0.07	0.459 \pm 0.03	0.751 \pm 0.02
Q+C+Ch		1.692 \pm 0.05	0.247 \pm 0.04	0.247 \pm 0.03	0.440 \pm 0.01	0.706 \pm 0.02
Av	4	---	---	---	---	---
A+C		1.339 \pm 0.05	0.319 \pm 0.05	0.288 \pm 0.01	0.293 \pm 0.02	0.549 \pm 0.01
A+C+Ch		1.321 \pm 0.09	0.394 \pm 0.02	0.397 \pm 0.02	0.569 \pm 0.12	0.702 \pm 0.18
Inóculo		0.3087 \pm 0.05	0.3187 \pm 0.03		0.5942 \pm 0.04	

Tabla 22. Actividad quitinolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula contenida en las cápsulas durante dos meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Actividad quitinolítica [mU/mL]				
		Mes 0	Mes 1		Mes 2	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C	T= 25°C	T = 4°C
Qv	4	---	---	---	---	---
Q+C		0.462 \pm 0.07	0.096 \pm 0.087	0.096 \pm 0.09	0.071 \pm 0.06	0.073 \pm 0.013
Q+C+Ch		0.421 \pm 0.16	0.093 \pm 0.08	0.093 \pm 0.08	0.062 \pm 0.015	0.052 \pm 0.039
Av	4	---	---	---	---	---
A+C		0.066 \pm 0.05	0.102 \pm 0.06	0.102 \pm 0.06	0.040 \pm 0.02	0.817 \pm .034
A+C+Ch		0.328 \pm 0.207	0.196 \pm 0.29	0.196 \pm 0.29	0.144 \pm 0.126	0.257 \pm 0.185
Inóculo		0.3125 \pm 0.022	0.3125 \pm 0.02		0.272 \pm 0.013	

Tabla 23. Actividad lipídica [mU/mL] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Actividad lipídica [mU/mL]				
		Mes 0	Mes 1		Mes 2	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C	T= 25°C	T = 4°C
Qv	4	0.000	0.000	0.000	---	---
Q+C		0.060 \pm 0.011	0.009 \pm 0.001	0.009 \pm 0.001	0.007 \pm 0.006	0.020 \pm 0.02
Q+C+Ch		0.165 \pm 0.103	0.014 \pm 0.013	0.014 \pm 0.013	0.009 \pm 0.007	0.004 \pm 0.001
Av	4	0.000	0.000	0.000	---	---
A+C		0.021 \pm 0.011	0.020 \pm 0.011	0.020 \pm 0.011	0.003 \pm 0.002	0.010 \pm 0.001
A+C+Ch		0.278 \pm 0.025	0.033 \pm 0.032	0.033 \pm 0.032	0.024 \pm 0.02	0.021 \pm 0.035
Inóculo	-----	0.0237 \pm 0.009	0.0237 \pm 0.0092		0.036 \pm 0.039	

Tabla 24. Actividad proteolítica [mU/mL] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Actividad proteolítica [mU/mL]				
		Mes 0	Mes 1		Mes 2	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C	T= 25°C	T = 4°C
Qv	4	0.000	0.000	0.000	---	---
Q+C		2.114±0.049	0.093±0.020	0.090±0.018	0.029±0.005	0.019±0.005
Q+C+Ch		1.530±0.026	0.107±0.001	0.105±0.006	0.225±0.020	0.0631±0.005
Av	4	0.000	0.000	0.000	---	---
A+C		1.341±0.003	0.093±0.008	0.097±0.007	0.226±0.011	0.019±0.008
A+C+Ch		0.121±0.014	0.304±0.039	0.216±0.015	0.166±0.010	0.577±0.028
Inóculo	-----	0.0244±0.008	0.0244±0.008		0.331±0.006	

Tabla 25. Azúcares reductores [µg/mL] por miligramo de cápsula contenida en las esferas durante dos meses de almacenamiento.

Tratamiento	pH	Azúcares reductores [µg/mL]				
		Mes 0	Mes 1		Mes 2	
		T= 25°C	T= 25°C	T = 4°C	T= 25°C	T = 4°C
Qv	4	0.000	0.000	0.000	---	---
Q+C		5.428±0.018	1.448±0.018	1.448±0.018	2.044±0.011	2.169±0.024
Q+C+Ch		4.561±0.018	1.086±0.018	1.086±0.018	2.297±0.021	1.793±0.029
Av	4	0.000	0.000	0.000	---	---
A+C		1.902±0.007	1.041±0.007	1.041±0.007	1.164±0.045	0.733±0.004
A+C+Ch		4.152±0.020	2.693±0.020	2.693±0.020	3.381±0.050	3.806±0.063
Inóculo	-----	4.638±0.163	4.6381±0.163		6.335±0.223	