



INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TOLUCA

“Evaluación de un sistema de perlas de quitosano-esporas para la liberación controlada de azadirachtina”

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS AMBIENTALES**

**PRESENTA:
ANGEL EDUARDO MARQUEZ ORTEGA
No. CONTROL:
1828D0220**

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BEATRIZ GARCÍA GAÍTAN**

**CODIRECTORA DE TESIS:
DRA. MARÍA DE LA LUZ JIMÉNEZ NUÑEZ**

METEPEC, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE DE 2025.



Educación
Secretaría de Educación Pública



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



Instituto Tecnológico de Toluca
Comunicación y Difusión

Metepec, Edo. de México, 03/Noviembre/2025
DEPI-3200-604/2025

ANGEL EDUARDO MÁRQUEZ ORTEGA
CANDIDATO AL GRADO DE DOCTOR
EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTE

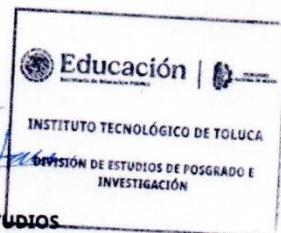
De acuerdo con los Lineamientos para la Operación de los Estudios de Posgrado en el Tecnológico Nacional de México y las disposiciones en este Instituto, habiendo cumplido con todas las indicaciones que la Comisión Revisora realizó con respecto a su Trabajo de Tesis Titulado: **"EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PERLAS DE QUITOSANO-ESPORAS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE AZADIRACHTINA "**, la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este Instituto, concede la Autorización para que proceda al envío del trabajo final vía correo Institucional.

Sin más por el momento, quedo de usted.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
"Educación, integridad y ciencia"


JORGE SÁNCHEZ JAIME
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



ccp. Archivo
JSj/mccl



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, Metepec, Edo. de México.
C.P. 52149, Teles. Dirección: 7222087205, Conmut.: 7222087200
e-mail: info@toluca.tecnm.mx | tecnm.mx | toluca.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Toluca
Comunicación y Difusión

Metepec, Edo. de México, 31/Octubre/2025
DEPT-3200-603/2025

DR. JORGE SÁNCHEZ JAIME
JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

PRESENTE

Por este medio comunicamos a usted que la comisión Revisora designada para analizar la Tesis denominada "EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE PERLAS DE QUITOSANO-ESPORAS PARA LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE AZADIRACTINA", que como parte de los requisitos para obtener el grado académico de Doctor en Ciencias Ambientales presenta el C. ANGEL EDUARDO MÁRQUEZ ORTEGA con número de control 1828D0220 para sustentar el acto de Recepción Profesional, ha dictaminado que dicho trabajo reúne las características de contenido y calidad para proceder a la impresión del mismo.

ATENTAMENTE



DRA. BEATRIZ GARCÍA GAITÁN
DIRECTORA DE TESIS



DRA. MARÍA DE LA LUZ JIMÉNEZ NÚÑEZ
CODIRECTORA DE TESIS



DRA. ROSA ELVIRA ZAVALA ARCE
REVISORA DE TESIS



DR. ALFREDO GARCÍA GONZÁLEZ
REVISOR DE TESIS



DRA. ROSA MARÍA FUENTES RIVAS
REVISORA DE TESIS



DRA. ERICA MUÑOZ REYES
REVISORA DE TESIS

ccp. Archivo
JSJ/mccl



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Tecnológico S/N, Col. Agrícola Bellavista, Metepec, Edo. de México,
C.P. 52149, Tels. Dirección: 7222067205, Conmut.: 7222067200
e-mail: info@toluca.tecnm.mx | tecnm.mx | toluca.tecnm.mx



DEDICATORIA

A mis hijos,

por ser la luz que guía mis días y el motor que impulsa mis anhelos. Su existencia me inspira a ser mejor cada día y a luchar por un futuro digno y lleno de posibilidades.

A mi esposa,

mi compañera de vida, gracias por tu amor incondicional, tu paciencia en los momentos difíciles y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. por caminar a mi lado en cada etapa de este viaje. Sin tu apoyo incondicional, esta meta no habría sido posible.

A mis padres,

por ser el pilar firme sobre el que aprendí a construir sueños. Gracias por su amor, su paciencia, su creencia en mí, sus sacrificios silenciosos y por enseñarme con el ejemplo, el valor del esfuerzo, la honestidad, perseverancia y la integridad.

A la naturaleza,

por recordarme constantemente que la sabiduría no solo se encuentra en los libros, sino también en el silencio de un árbol, en el fluir de un río y en la inmensidad del cielo. Tu equilibrio, belleza y resiliencia han sido fuente de inspiración en este camino.

A mi familia,

por ser hogar, raíz y fuerza. Esta tesis es una expresión de todo lo que me han dado.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más sincero agradecimiento a los doctores del Posgrado en Ciencias Ambientales por su valiosa orientación, su compromiso con la excelencia académica y por brindarme las herramientas necesarias para desarrollar esta investigación. Su conocimiento, exigencia y guía fueron fundamentales en la consolidación de mi formación doctoral. Así mismo aquellos doctores que sin conocerme me extendieron su mano y apoyo incondicional para concluir este paso importante en mi vida.

A los docentes externos, gracias por su valioso apoyo, por su participación activa en el desarrollo de este proceso académico y por haber contribuido significativamente a mi crecimiento profesional y personal. Su experiencia, disposición y dedicación han dejado una profunda huella en mi formación.

A cada uno de los profesores y profesoras que me han acompañado a lo largo de este camino, les agradezco por haber sembrado en mí la pasión por el conocimiento y el pensamiento crítico.

Rindo un especial y sentido reconocimiento a aquellos docentes que, con su ejemplo y entrega, dejaron una huella imborrable en mi camino del aprendizaje, y que hoy ya no están entre nosotros. Su legado vive en quienes fuimos tocados por su enseñanza y continúa manifestándose en cada paso que damos como profesionales y seres humanos. Su memoria es un faro que seguirá guiando el camino de quienes continuamos esta labor.

Gracias a todos ustedes por ser parte esencial de este viaje.

RESUMEN

Las plagas causan pérdidas significativas en la producción agrícola, por lo que se recurre al uso de plaguicidas de origen químico para disminuir dichas pérdidas. Sin embargo, el uso descontrolado de estos plaguicidas ha generado diversos efectos negativos en el medio ambiente y en la salud humana. Por esta razón, los bioplaguicidas (como los hongos entomopatógenos y los extractos vegetales) se han usado como una alternativa para reducir el consumo excesivo de plaguicidas químicos. La encapsulación es una técnica utilizada para la liberación controlada de activos, ya que permite conservar las propiedades biológicas, funcionales y fisicoquímicas de los compuestos o de los microorganismos encapsulados. Para la encapsulación se han empleado biopolímeros como el quitosano. El presente trabajo se enfocó en desarrollar y caracterizar cápsulas en forma de perlas elaboradas con quitosano, extracto de neem y esporas de hongos entomopatógenos, con el objetivo de lograr la liberación controlada del neem, conservar la capacidad de esporulación de hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii* e *Isaria javánica*, y generar un efecto de virulencia sobre las larvas de *Conotrachelus crataegi* (picudo del tejocote) y *Tenebrio molitor* (utilizado como vector de prueba). Ambas especies se consideran plagas, ya que se alimentan de productos agrícolas como el tejocote, granos almacenados, harinas y otros alimentos, facilitando su adaptación y reproducción en diversos ambientes. Las caracterizaciones realizadas fueron fisicoquímicas, morfológicas, biológicas y de virulencia. Los resultados mostraron que las perlas presentaron homogeneidad en parámetros como diámetro, humedad, pH y viscosidad. Además, el estudio morfológico demostró que todas las perlas exhibieron una porosidad similar, lo que permitió la liberación del extracto de neem y la conservación de la actividad biológica de las esporas. Asimismo, las cinéticas de hinchamiento indicaron que las perlas alcanzaron su máxima capacidad de hinchamiento en un tiempo corto. Finalmente, las pruebas de virulencia demostraron que no hubo cambios en la viabilidad de las esporas, y se observó mortalidad en *T. molitor* inoculado con las cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium robertsii*.

ABSTRACT

Currently, pests cause significant losses in agricultural production each year. As a result, chemical pesticides are used to reduce or counteract the damage caused to crops. However, the uncontrolled use of these compounds has generated various negative effects on the environment and human health. For this reason, biopesticides (such as entomopathogenic fungi and plant extracts, including neem) have been used as an alternative to reduce the excessive consumption of chemical pesticides. Encapsulation is a technique used for the controlled release of fertilizers or pesticides, as it preserves the biological, functional, and physicochemical properties of the compounds or microorganisms. Biopolymers such as chitosan have also been used for encapsulation, as it prevents product deterioration during storage and enables the controlled release of the material contained within its matrix. This study focused on developing pearl-shaped capsules made of chitosan, neem extract, and spores of entomopathogenic fungi. The goal was to achieve controlled release of neem, preserve the sporulation capacity of entomopathogenic fungi such as *Beauveria bassiana*, *Metarhizium robertsii*, and *Isaria javanica*, and generate a virulence effect on the larvae of *Conotrachelus crataegi* (haw weevil) and *Tenebrio molitor* (used as a test vector). Both species are considered pests because they feed on agricultural products such as hawthorn, stored grains, flour, and other foods, facilitating their adaptation and reproduction in diverse environments. The research consisted of developing chitosan-neem-spore pearls and determining their physicochemical, morphological, biological, and virulence characteristics. The results showed that the pearls were homogeneous in terms of diameter, moisture content, pH, and viscosity. Furthermore, the morphological study showed that all the beads exhibited similar porosity, allowing the release of the neem extract and preserving the spore's biological activity. Swelling analysis also indicated that the beads reached their maximum expansion in a short time. Finally, virulence tests showed no changes in spore viability, and mortality was observed in *T. molitor* inoculated with the *Beauveria bassiana* and *Metarhizium robertsii* strains.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	1
1. FUNDAMENTOS.....	5
1.1. Antecedentes.....	5
1.2. Plagas de cultivos agrícolas en México.....	8
1.3. Bioplaguicidas.....	11
1.3.1. Extractos vegetales utilizados como bioplaguicidas.....	13
1.3.2. Microorganismos como control biológico.....	15
1.3.2.1. Metabolismo de las células.....	16
1.3.2.2. Factores de la cinética de crecimiento.....	17
1.3.2.3. Curva de crecimiento.....	18
1.3.2.4. Modelos cinéticos de crecimiento microbiano.....	20
1.3.2.5. Hongos entomopatógenos.....	24
1.4. Virulencia de los hongos entomopatógenos.....	26
1.4.1. Modelos o vectores de prueba o ensayo.....	27
1.4.2. Vector de prueba <i>Tenebrio molitor</i>	28
1.4.3. Alimentación y ciclo de vida.....	29
1.5. Polímeros naturales.....	31
1.5.1. Quitosano.....	31
1.5.2. Encapsulamiento de polímeros naturales.....	32
1.5.3. Cinética de hinchamiento de encapsulados.....	33
2. MÉTODO.....	36
2.1. Microorganismos.....	36
2.2. Recolección y mantenimiento de larvas <i>Conotrachelus crataegi</i>	36

2.3.	Medios de cultivo.....	37
2.4.	Propagación de cepas.....	39
2.5.	Fermentación sólida.....	39
2.6.	Fermentación líquida sin agitación.....	40
2.7.	Determinaciones analíticas.....	41
2.8.	Pruebas de inhibición de hongos entomopatógenos con extracto de neem.....	47
2.9.	Efecto de extracto de neem sobre larvas de <i>Conotrachelus crataegi</i> (picudo del tejocote).....	48
2.10.	Perlas de quitosano-neem-esporas.....	49
2.11.	Virulencia de perlas de quitosano-neem-esporas en sustrato inerte con <i>Tenebrio molitor</i> como vector de prueba.....	52
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53
3.1.	Recolección y conservación de larvas.....	53
3.2.	Fermentación sólida.....	56
3.3.	Fermentación líquida.....	58
3.4.	Pruebas de inhibición de hongos entomopatógenos con extracto de neem.....	66
3.5.	Determinación del efecto de extracto de neem sobre larvas <i>Conotrachelus crataegi</i> (picudo del tejocote).....	68
3.6.	Elaboración y caracterización de perlas de quitosano-neem-esporas..	71
3.7.	Virulencia de perlas de quitosano-neem-esporas con <i>Tenebrio molitor</i>	82
	CONCLUSIONES.....	86

RECOMENDACIONES.....	88
FUENTES CONSULTADAS.....	89
ANEXO A. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DNS PARA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA.....	107
ANEXO B. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO BRADFORD PARA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	111
ANEXO C. CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DNS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Principales insectos-plaga en cultivos de importancia en México.	10
Tabla 2.1. Composición de la solución de elementos traza.....	38
Tabla 2.2. Relación de reactivos presentes en el medio Kirk	39
Tabla 2.3. Diseño de experimentos para la prueba de inhibición de hongos con extracto de neem.....	47
Tabla 2.4. Diseño de experimentos para determinar el efecto del extracto de neem sobre larvas de picudo de tejocote.....	48
Tabla 2.5. Diseño de experimentos para la elaboración de las perlas de chitosano adicionadas con extracto de neem y esporas de hongos entomopatógenos.....	49
Tabla 3.1. Concentración de esporas producida por cada cepa de hongo....	57
Tabla 3.2. Parámetros cinéticos de crecimiento a partir del ajuste mediante el modelo de Monod.....	60
Tabla 3.3. Parámetros de crecimiento para cada cepa de hongo estudiado...	65
Tabla 3.4. Crecimiento de los hongos entomopatógenos en la prueba de inhibición por neem.....	68
Tabla 3.5. Valores de viscosidad de las mezclas para la síntesis de las perlas.....	72
Tabla 3.6. Diámetros de cada una de las perlas.....	75
Tabla 3.7. Humedad promedio de las perlas.....	76

Tabla 3.8. Ajustes con el modelo de primer orden de la cinética de hinchamiento de las perlas sintetizadas.....	81
Tabla 3.9. Ajustes con el modelo de segundo orden de la cinética de hinchamiento de las perlas sintetizadas.....	81
Tabla 1.A Soluciones de glucosa de diferentes concentraciones.....	108
Tabla 2.A Absorbancias para la curva de calibración mediante el método de DNS.....	109
Tabla 1.B Soluciones de BSA de diferentes concentraciones.....	111
Tabla 2.B Absorbancias para la curva de calibración mediante el método Bradford.....	112
Tabla 1.C Determinación de las concentraciones de N-acetil-D-glucosamina requeridas para la curva patrón de DNS.....	115
Tabla 2.C Absorbancias adquiridas después del ensayo de la curva patrón de DNS.....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructura química de la azadirachtina.....	14
Figura 1.2. Curva de crecimiento microbiano.....	19
Figura 1.3. Modelo de crecimiento de Monod.....	21
Figura 1.4. <i>Tenebrio molitor</i> en sus diferentes estadios.....	28
Figura 1.5. Ciclo de vida de <i>Tenebrio molitor</i>	30
Figura 1.6. Composición química.....	32
Figura 2.1. Ubicación geográfica de la huerta de recolección de larvas de picudo (<i>Conotrachelus crataegi</i>) en tejocote (<i>Crataegus</i> spp.)...	37
Figura 3.1. Huerta de Tejocote ubicada en la comunidad Primero del Primer Barrio de Huejotzingo Puebla.....	54
Figura 3.2. Frutos de tejocote infestados con la plaga de larvas de Picudo (<i>Conotrachelus crataegi</i>).....	55
Figura 3.3. Conservación de las larvas del picudo.....	55
Figura 3.4. Producción de esporas por fermentación sólida en arroz.....	56
Figura 3.5. Diluciones de cada cepa para el conteo de esporas mediante la cámara de Neubauer.....	57
Figura 3.6. Producción de biomasa, y Consumo de sustrato en las tres cepas de hongos entomopatógenos.....	58
Figura 3.7. Ajuste de la cinética de crecimiento según el modelo cinético de Monod.....	59
Figura 3.8. pH determinado durante la fermentación líquida.....	61

Figura 3.9. Conteo de esporas durante la fermentación líquida.....	63
Figura 3.10. Cuantificación de proteínas durante la fermentación líquida.....	64
Figura 3.11. Actividad quitinolítica específica durante la fermentación líquida.	65
Figura 3.12. Pruebas de inhibición de los hongos por efecto del extracto de neem.....	67
Figura 3.13. Adición por contacto del neem a larvas y pupas del picudo del tejocote.....	69
Figura 3.14. Mortandad de las larvas y pupas después de colocar los extractos de neem.....	69
Figura 3.15. Efecto del extracto de neem, sobre pupa durante la transformación a adulto.....	70
Figura 3.16. Porcentaje de mortandad de larvas y pupas de picudo del tejocote con extracto de neem base agua y base aceite.....	71
Figura 3.17. Preparación de mezclas para la elaboración de perlas de neem.	72
Figura 3.18. Elaboración de las perlas a partir de la mezcla de quitosano.....	73
Figura 3.19. Lavado y conservación de esporas encapsuladas en perlas a base de quitosano.....	73
Figura 3.20. Perlas de quitosano-neem, quitosano-neem-esporas conforme al diseño experimental.....	74
Figura 3.21. Dispersión de los tamaños de perlas elaboradas con quitosano-neem-esporas.....	75
Figura 3.22. Micrografías a 40x de la superficie de las perlas quitosano-neem-esporas.....	77

Figura 3.23. Micrografías a 2000x de la superficie de las perlas quitosano-neem-esporas.....	79
Figura 3.24. Micrografías a 3500x de las perlas fraccionadas de quitosano-neem-esporas.....	80
Figura 3.25. Mortandad de <i>T. molitor</i> con perlas de quitosano-neem-esporas.	83
Figura 3.26. Germinación de <i>B. bassiana</i> en <i>T. molitor</i>	84
Figura 3.27. Germinación de <i>M. robertsii</i> en <i>T. molitor</i>	85
Figura 1.A Conversión de los azúcares reductores mediante la técnica de DNS.....	107
Figura 2.A. Curva de calibración de azúcares reductores por la técnica de DNS.....	109
Figura 1.B Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford.....	113
Figura 1.C Conversión del quitosano en glucosamina mediante la técnica de azúcares reductores de DNS.....	114
Figura 2.C Curva de calibración de azúcares reductores por la técnica de DNS.....	116

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la agricultura ha integrado en los sistemas productivos el manejo de productos mediante la “agricultura verde”, enfocada a involucrar el incremento y dependencia de insumos sintéticos, intensificación y búsqueda de una mayor tasa de retorno financiero para elevar la productividad y rentabilidad agrícola (Pérez Vázquez & Landeros Sánchez, 2009), y al mismo tiempo lograr una producción agrícola sostenible, que sea productiva y eficiente en cuanto a recursos para proveer alimentos suficientes y algunos servicios referentes a los ecosistemas para beneficio de las siguientes generaciones aun cuando existan algunos factores como el cambio climático, gasto de energía, inestabilidad económica y social, y degradación del ambiente en la agricultura tradicional y moderna (Altieri, Koohafkan, & Holt Gimenez, 2012).

En el sector agrícola, las naciones han diseñado e implementado estrategias para la producción de alimentos con mejor calidad, debido a que han desarrollado tecnologías para que exista una mayor disponibilidad y distribución de los productos con un mejor valor nutritivo, además de concientizar a la sociedad con respecto al valor nutrimental de los alimentos, por ello, la agricultura eointensiva está enfocada a la utilización de tecnologías de última generación (drones, sensores remotos entre otros), prácticas agrícolas convencionales, agroecológicas y biotecnológicas que convivan para producir alimentos mejores con un menor impacto ambiental y así satisfacer a las poblaciones, al tener una seguridad agrícola y un entorno socioeconómico sustentables (Pérez-Vázquez, Leyva-Trinidad, & Gómez-Merino, 2018; Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2017).

Por otra parte, el deterioro del campo mexicano ha sido causa de las plagas que generan mermas en los ingresos de los agricultores y pérdidas económicas en la industria por la contaminación de los alimentos a causa de insectos plaga en los granos almacenados, ya que al acopiarlos por un tiempo prolongado desarrollan vulnerabilidad o susceptibilidad a las plagas causando daños cercanos al 30% de

las cosechas (Casas, 2015). Las plagas que atacan a los cultivos se diversifican en insectos que consumen raíces, tallos y plantas hasta transmisores de bacterias y virus, además pueden ser dañinos a corto, mediano y largo plazo para la salud humana. Otro tipo de insectos, son los fitófagos, los cuales atacan a cada órgano de las plantas herbáceas y leñosas provocando daños en la semilla, tallo, raíz, hojas, flores y frutos, o bien alteraciones en los procesos metabólicos y fisiológicos de la planta, causando efectos desde la calidad hasta la muerte de la planta.

En México la problemática del campo no solo radica en el ataque de diferentes tipos de enfermedades, plagas y maleza que afectan a los cultivos desde la semilla hasta el fruto, sino también es la utilización de diversos plaguicidas que son usados de forma indiscriminada y sin control, los cuales provocan transformaciones a nivel físico, químico o biológico (fenómenos de adsorción y absorción sobre suelos y plantas, volatilización, fotólisis y degradación química o microbiana), o bien pueden ser arrastrados por corrientes de aire o agua recorriendo con ello grandes distancias afectando a los ecosistemas a diferentes niveles (García-Gutiérrez & Rodríguez-Meza, 2012). Asimismo, los plaguicidas también tienen efectos nocivos a la salud humana debido a que puede existir acumulación progresiva en la grasa, por ser liposoluble y tener efectos fisiológicos a largo plazo (Del Puerto-Rodríguez, Suárez-Tamayo, & Palacio-Estrada, 2014).

Por lo anterior, el uso de tecnologías ha generado una correlación negativa entre la agricultura intensiva y la biodiversidad, debido al uso excesivo de insumos sintéticos como los plaguicidas o fertilizantes inorgánicos, los cuales han contribuido en la degradación y/o pérdidas de suelos, ecosistemas, agua superficial y subterránea, pobreza nutrimental e inducción a la pérdida de materia orgánica (Gutiérrez-Castorena, Gutiérrez-Castorena, & Ortiz-Solorio, 2015); éstas son consecuencias ecológicas en el entorno por el uso de plaguicidas o insecticidas y se asocian al daño ambiental, debido a que esta herramienta agrícola, no solo mata a la plaga de insectos, si no también impacta de forma letal a organismos que no son su objetivo, como recicladores de nutrientes del suelo, polinizadores de plantas y enemigos

naturales de plagas, provocando con ello contaminación de productos alimenticios que llegan a niveles tróficos superiores (Devine, Eza, Oguzuko, & Furlong, 2008).

Lo anterior a llevado a los agricultores a la utilización de plaguicidas naturales (como los extractos vegetales, entre ellos el neem) y algunos microorganismos (como los hongos entomopatógenos) como medio para el control de las plagas, debido a que pueden permanecer por más tiempo en el suelo minimizando su efecto en las plantas y actúen directamente sobre el insecto dañino para los cultivos agrícolas. El neem es un insecticida natural con la capacidad de controlar a la plaga por ingestión y/o por contacto, produciendo con esto un efecto inhibitorio en el crecimiento o la metamorfosis normal del insecto, reduciendo el costo de tratamiento de la plaga al disminuir la concentración del producto con la intención de mantener un equilibrio en el ecosistema y contribuir con un producto del campo con niveles de toxicidad bajos y ofrecer al consumidor seguridad y calidad en el alimento que se consume (Arriola Santo, 2013).

Asimismo, los hongos entomopatógenos han sido utilizados para el control de plagas, debido a que estos microorganismos son considerados productores de enzimas quitinolíticas (quitinasas), las cuales tienen la capacidad de degradar a la quitina y sus derivados como el quitosano; estos hongos actúan directamente introduciendo sus esporas entre las estructuras externas de quitina presentes en los insectos (cubierta externa o cutícula) donde germinan dando lugar a las hifas, las cuales crecen en forma de micelio degradando a su paso la cubierta hasta lograr la muerte de los insectos plaga.

Por otra parte, existen en la naturaleza diversos biopolímeros que están presentes en abundancia como la celulosa y el quitosano. El quitosano es muy versátil, debido a que tiene aplicación en diferentes áreas de la industria como cosméticos, farmacéutica, química de polímeros, vinícola, cervecera, medicina y ambiental (Navarro, y otros, 2010), además es usado en los procesos de biosorción para la absorción de especies químicas contaminantes como metales pesados y

plaguicidas; también este biopolímero es utilizado para los procesos de dispersión de los plaguicidas en los campos agrícolas, con la finalidad de reducir el impacto de la aplicación excesiva de sustancias químicas sintéticas al ambiente (Nieto Orellana & Orellana Ulloa, 2011).

El presente trabajo tuvo la finalidad de desarrollar un sistema de perlas de quitosano-neem-esporas con la capacidad tanto de mantener en su matriz el extracto de neem y las esporas de hongos entomopatógenos, como de liberar de forma controlada la azadiractina y mantener la viabilidad de las esporas para su germinación después de la dispersión de las perlas en el suelo agrícola; esto llevó a evaluar el sistema de las perlas de quitosano-neem-esporas para la liberación controlada de azadiractina a partir de:

- ✓ Determinar los parámetros de crecimiento de las cepas de hongos entomopatógenos.
- ✓ Realizar pruebas de inhibición de los hongos entomopatógenos en presencia de neem a diferentes concentraciones.
- ✓ Realizar pruebas de inhibición del picudo de Tejocote en presencia de neem base agua y base aceite.
- ✓ Elaborar las perlas de quitosano-neem-esporas para una liberación controlada del bioinsecticida.

1. FUNDAMENTOS

1.1. Antecedentes

El campo en México ha sufrido deterioro, no solo por el manejo inadecuado de las tierras de cultivo o por las plagas que pueda presentar una especie vegetal, sino también por el mal uso de los plaguicidas, debido a que son suministrados de forma excesiva e irracional provocando serias consecuencias a la salud humana y al ambiente. Los insecticidas químicos son utilizados en su mayoría en el campo para controlar las poblaciones de insectos plaga; sin embargo, los insecticidas ejercen una presión al desarrollar resistencia a estas moléculas y eliminar los insectos benéficos que coadyuvan a la regulación de plagas y con ello, realizar esfuerzos para promover el uso eficiente de estos productos, incluyendo la disminución en su uso. Un ejemplo, es el desarrollo de tecnologías enfocadas a generar materiales que liberen de forma controlada a estos productos y así disminuir o controlar las dosis de los insecticidas químicos.

Actualmente, la liberación controlada de principios activos es una tecnología que tiende a mejorar los procesos productivos en diversas áreas de la industria agrícola. Así mismo, se han desarrollado productos con capacidad de controlar la dispersión

de plaguicidas, principalmente complejos poliméricos como hidrogeles a base de quitosano. El quitosano es un biomaterial valioso para el suministro controlado de agroquímicos, debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, no toxicidad y capacidades de adsorción, por lo que, se ha utilizado para la protección de ingredientes y con ello, controlar la liberación de compuestos como los pesticidas, logrando abrir una brecha en el campo de la medicina, la farmacéutica y la agricultura (Krashyap, Xiang, & Heiden, 2015).

Esto ha llevado al desarrollo de geles, con matriz polimérica de carboximetil-quitosano-bentonita como vehículo para encapsular atrazina e imidacloprid, con la finalidad de controlar su liberación en agua y retardar así su lixiviación en el suelo. Los estudios llevados a cabo con este polímero mostraron ventajas tanto de encapsulación por el polímero como de adsorción por la bentonita, debido a que en un tiempo de 50 minutos se liberó el 50% del plaguicida; mientras que, el tiempo de la atrazina fue de 572 horas y 24 horas para el imidacloprid. Así mismo, la cantidad de pesticida disponible para la lixiviación se redujo, disminuyendo significativamente la contaminación ambiental (Li, Yao, Li, & Shao, 2012).

Además, se han desarrollado microesferas de liberación sostenida, con un complejo polimérico de carboximetil-quitosano-goma arábica, para contener en su matriz la acetamiprid, el cual mostró que no existió interacción química entre el complejo y el plaguicida, obteniendo un rendimiento de liberación alto (Zhi, y otros, 2010). Otros experimentos fueron enfocados a la preparación de capsulas de Ca-alginato-quitosano cargados de imidacloprid para su liberación controlada, estas investigaciones revelaron resultados eficaces contra larvas *Aedes aegypti* en dosis inferiores a las requeridas; es decir, valores de carga de 5.9% y una eficacia de 34% (Gim-Pao & Muhammad Syarhabil, 2018).

Otras investigaciones mostraron que la quitina y sus derivados mejoran el rendimiento del cultivo, con efectos principalmente sobre la nutrición, crecimiento, efectos tóxicos sobre las plagas y patógenos de las plantas, además de estimular

el crecimiento y la actividad de organismos benéficos para los cultivos agrícolas; es decir, aumentan y amplifican la acción de microorganismos quitinolíticos generando una interacción planta-microorganismo (Sharp, 2013). Por lo anterior, estudios enfocados a investigar el efecto del quitosano sobre la germinación de las esporas en diversos hongos, mostraron que los nematófagos y entomopatógenos (*Pochonia chlamydosporia*) son más resistentes al efecto tóxico del quitosano, en comparación con *Fusarium oxysporum* f. sp. y *radicis-lycopersici*, hongos más sensibles al quitosano, los cuales presentaron un mayor cambio estructural, sugiriendo en esta investigación que la resistencia al quitosano puede estar asociada a la alta producción de la actividad de las enzimas quitinolíticas extracelulares (Palma-Guerrero, Jansson, Salinas, & López-Llorca, 2008).

En 2014, Zou y col., realizaron estudios con la cepa IfB01 de *Isaria fumosorosea* y cuatro insecticidas químicos (Imidacloprid, Acetamiprid, Spirotetramato y Tiametoxam) para el control de la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), los resultados mostraron acciones sinérgicas sustanciales en las mezclas de conidios de *I. fumosorosea* y los plaguicidas químicos, siendo de mayor relevancia el sinergismo en el índice de virulencia cuando fue utilizado imidacloprid (2.5×10^6 conidios/L y 12.5 mg/L de imidacloprid) con una virulencia cooperativa de 184 en el tercer día.

Actualmente se tiene conocimiento del uso de los bioinsecticidas como el Neem (*Azadirachta indica*) en el control de plagas en cultivos, el Neem es un extracto natural que se aplica como una alternativa para agentes patógenos al hombre, debido a que la mayoría de los agentes químicos utilizados para la descontaminación de alimentos y/o agua, generan diversos residuos que no solo afectan al medio ambiente, sino que además son un riesgo a la salud de las personas que consumen el producto (López-Pantoja, Angulo-Escalante, Martínez-Rodríguez, Soto-Beltrán, & Chaidez-Quiroz, 2007).

Por otro lado, Esparza-Díaz y col. (2010) utilizaron un extracto de neem como insecticida y repelente, para el control del pulgón *Aphis gossypii* Glover, en plantas

de *Ixora coccinea* L., éste estudio mostró una mortalidad del 100% con el extracto metanólico entre las 48 y 72 horas, con una afectación mínima en las hojas de la planta. El aceite de neem ha sido utilizado en el manejo de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), durante un ensayo experimental se colocaron extractos acuosos con dosis de 50 mg/L, los cuales mostraron una disminución en la población de huevos con respecto a una dosis alta (100 mg/L) (Navarrete, Valarezo, Cañarte, & Solórzano, 2017).

Además de utilizarse como bioinsecticida, el neem ha sido estudiado para observar los efectos inhibitorios en microorganismos, tal es el caso de los hongos. En el 2011, Pérez y col. aplicaron extractos de neem a *Collectotrichum ssp.*, este hongo produce la enfermedad de antracnosis en el árbol de ñame en Colombia, después del tratamiento se observó un efecto inhibitorio con el extracto de *Melia azedarach* L, especie china del neem, a partir de una concentración de 50 ppm. Por otro lado, se han realizado estudios de aplicación de aceite de neem a *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, los cuales son considerados hongos entomopatógenos, estos reflejaron que el neem a una concentración del 2%, inhibe la germinación a -45.27%, el diámetro de la colonia a -36.62% y la conidiogénesis a -84.93%, sobre *B. bassiana*; mientras que en *M. anisopliae* el efecto inhibitorio no fue mayor al de *B. bassiana* (Hirose, y otros, 2001). Sin embargo, otros estudios acerca del efecto inhibitorio del aceite de neem sobre cepas de *M. anisopliae* y *B. bassiana* mostraron inhibición a concentraciones de 1% y 1.84%, respectivamente. Es por ello, que ambas cepas pueden ser trabajadas a concentraciones de 0.2 a 1.0% sin algún tipo de inhibición (Castiglioni, Djair Vendramim, & Batista Alves, 2003).

1.2. Plagas de cultivos agrícolas en México

Uno de los principales problemas que enfrenta la agricultura en la actualidad, es la pérdida de cultivos o cosechas de las diferentes especies vegetales provocadas por las plagas y enfermedades. Esta problemática desencadena pérdidas económicas de rendimiento en la cosecha y producción en la industria agrícola, afectando a los

productores, esto se agudiza cuando el agricultor o encargado de la producción en la unidad agrícola presenta una situación de bajos recursos, ya que en muchas de las ocasiones no cuenta con los dineros para controlar un ataque por plagas, o bien para poderlo prevenir, teniendo un efecto catastrófico hasta llegar a una pérdida total del producto (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2011).

Por lo anterior, el ataque de las plagas hacia los cultivos se incrementa debido a factores externos, los cuales afectan las condiciones óptimas para el desarrollo de la planta, como la presencia del cambio climático, que trae consigo un desequilibrio en las regiones agrícolas, ya que modifica el clima, principalmente el aumento de la temperatura y favorece a la plaga, provocando un incremento en la virulencia (grado de patogenicidad que tiene el hongo sobre el huésped y así poder degradar el tejido) o bien en la incubación de huevecillos de insectos que provocan daños al producto (Ruiz-Corral, y otros, 2013). Tan solo en México en el 2015, alcanzo perdidas de hasta el 30% de sus cultivos a causa de las plagas o las enfermedades que atacan al producto, como la presencia de artropodos, hongos, bacterias y otros; estas plagas son competidoras natas con el ser humano por los productos agrícolas.

El significado de la palabra “plaga” ha cambiado en el transcurso del tiempo, debido a que ha tenido diversos significados enfocados a conceptualizar un daño provocado de un ser vivo a otro con un perjuicio económico para el hombre. Dentro de las plagas que se presentan en los cultivos agrícolas se encuentran insectos, ácaros, gasterópodos, aves y roedores. Las enfermedades causadas por hongos, bacterias, virus, nematodos como los más relevantes, así como malezas compiten con el cultivo por nutrientes y espacio (Selfa & Anento, 1997). El daño por insectos plaga es una problemática seria en el manejo de cultivos, por lo que, a continuación se presentan algunas plagas que presentan los cultivos en México:

Tabla 1.1. Principales insectos-plaga en cultivos de importancia en México.

Plaga	Nombre científico	Cultivo afectado	Daños	Referencia
Gusano cogollero del maíz	<i>Spodoptera fugiperda</i>	Maíz	• Causa una reducción de la producción que va desde un 20%. • Produce raspaduras en las partes tiernas de las hojas y se observa una estructura translúcida después de ello.	
Mosca blanca	<i>Bemisia tabaci</i> o <i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Tomate Pepino Chile Frijol Tabaco	• Deteriora el crecimiento de la hoja. • Puede transmitir enfermedades virales a las plantas. • El excremento es pegajoso, el cual se adhiere a la hoja y es motivo de crecimiento de hongos.	(González-Castillo, Aguilar, & Rodríguez-Herrera, 2012)
Picudo del manzano	<i>Amphidees latifrons</i>	Manzano	• Escarabajo de hábitos nocturnos altamente destructivo. • Las hembras depositan huevecillos en las yemas y cuando eclosionan consumen el tejido celular, forman modeduras en "U", pueden llegar a dar muerte a la rama del árbol.	
Minador de la hoja	<i>Liriomyza</i> spp.	Plantas ornamentales y de hojas comestibles	• Viven en el interior de las hojas, consumen el mesofil, dejando intacta la epidermis foliar.	(Savo & Valladares, 2007)
Pulgón o áfido	<i>Toxoptera aurantii</i>	Citricos	• Es un grave problema para los cítricos, debido a que promueve las enfermedades por virus en los cítricos, es poco estudiado este insecto. • Promueve la enfermedad "tristeza de los cítricos".	(Gaona García, Ruiz Cancino, & Peña Martínez, 2000)
Araña roja	<i>Tetranychidae</i>	Plantas diversas	• Daño en los cultivos, principalmente el follaje, frutos y tallos. Aparición de puntos cloróticos, conocido como bronceación	(Badii, Landeros, & Cerna, 2010)
Gallina ciega	Melolonthidae	Maíz	• Daño principalmente en la raíz de la planta, puede llegar a dar muerte por completo a la planta	(Ramírez-Salinas & Castro-Ramírez, 17-41)

El agroecosistema es un complejo de interrelaciones biológicas y ecológicas, en el cual cada elemento tiene una función dada y es necesario el análisis de una forma integral. Los factores que inciden en el desarrollo de insectos plaga incluyen los factores abióticos (condiciones ambientales) y bióticos (organismos). Sin embargo, el factor que muchas veces determina las condiciones para el desarrollo de plagas es el manejo por parte del hombre. Además de los factores naturales antes mencionados, se presentan los no naturales llamados “Plaguicidas”, los cuales ayudan al impacto de las poblaciones de animales presentes sin generar un efecto colateral indeseable y garantiza reducir rápidamente las poblaciones de plaga, conservando un equilibrio en el ambiente en general (Jimenez Martínez, 2009).

1.3. Bioplaguicidas

La aplicación de los plaguicidas sintéticos fue durante muchos años una manera de controlar las plagas de insectos por su rapidez, eficacia, fácil obtención, transporte y largo periodo de acción, debido a su estabilidad química (Montero-Contreras, y otros, 2017). Los plaguicidas son sustancias o mezclas de éstas, las cuales están destinadas a prevenir, controlar o destruir cualquier plaga, además de todas aquellas sustancias utilizadas como reguladoras de crecimiento de plantas, defoliantes, desecantes, entre otros (Ortiz-Hernández, Sánchez-Salinas, Folch-Mallol, Olvera-Velona, & Dantan-González , 2014).

En México existen cerca de 30 plaguicidas que son permitidos para los cultivos, pero que se encuentran prohibidos en otros países por ser agrotóxicos, debido a que representan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente; algunos de estos plaguicidas son: alador, atrazina, azinfos metilílico, captafol, captan, carbarilo, carbofuran, dicofol, diuron, endosulfán, furato, fosfamidón, kadetrina, maneb, paracuat, quintoseno, entre algunos otros (Arellano-Aguilar, y otros, 2016; Muñiz-Paredes, Miranda-Hernández, & Loera, 2017).

Actualmente en nuestro país la utilización excesiva de los plaguicidas químicos o sintéticos, ha llevado a los productores a promover la utilización de bioplaguicidas, es decir el uso de medios biológicos y naturales para el manejo de plagas en la agricultura y así ofrecer la posibilidad de sustituir a los plaguicidas sintéticos a través de medios menos agresivos y de menos impacto ambiental en los agroecosistemas (Montero-Contreras, y otros, 2017). Los bioplaguicidas son sustancias químicas naturales derivadas de extractos de materias naturales de plantas (como el neem), microorganismos o de sustancias que liberan dichos organismos, así también, se incluyen algunos minerales que generalmente solo afectan a la plaga a la cual está dirigido. Existen bioplaguicidas cuyo ingrediente activo está compuesto de algunas sustancias que libera un microorganismo, una bacteria, un hongo (como los hongos entomopatógenos, los cuales son vectores de biocontrol) o un virus y como tal, le permite controlar muchos tipos de plagas, por ejemplo, el *Bacillus thuringiensis*, que segrega proteínas que pueden provocar la muerte a algunas larvas de insectos (Tamez Guerra, y otros, 2001). Los bioplaguicidas se pueden clasificar según su ingrediente activo y según su modo de acción biológica (Ramírez, 2012).

Los bioplaguicidas se distribuyen en cuatro grupos. El primer grupo está compuesto por microorganismos que pueden ser virus, bacterias y hongos. El segundo grupo, está constituido por insectos entomófagos y nemátodos entomopatógenos. El siguiente grupo, está enfocado a los ingredientes activos de bioplaguicidas a base de sustancias bioactivas, dentro de las cuales están los extractos botánicos y algunos minerales, y el último grupo son sustancias afines que están relacionadas con sustancias bioactivas derivadas de microorganismos. Los bioplaguicidas son altamente específicos contra las plagas objetivo y generalmente representan poco o ningún riesgo para las personas o el medio ambiente (Nava-Pérez, García-Gutiérrez, Camacho-Báez, & Vázquez-Montoya, 2012).

Los plaguicidas tradicionales, por el contrario, en general son materiales sintéticos, que no sólo afectan a la plaga objetivo, sino también organismos no deseados, tales como insectos benéficos, la vegetación circundante y la vida silvestre. El desarrollo

de nuevos bioplaguicidas estimula la modernización de la agricultura y sin duda, va a reemplazar gradualmente a una cantidad de los plaguicidas químicos. En la producción agrícola, en ambientes libres de contaminación, los bioplaguicidas son sustitutos ideales para sus homólogos químicos tradicionales (Ramírez, 2012).

1.3.1. Extractos vegetales utilizados como bioplaguicidas

Las plantas han sido utilizadas por el ser humano en diversas necesidades básicas como alimento, medicina, vivienda, vestido entre otras; así mismo, se ha observado que las plantas producen metabolitos secundarios que presentan propiedades fungicidas, insecticidas y bactericidas contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Celis, y otros, 2008). Además de que estos extractos vegetales son de origen natural, biodegradables y pueden transformarse en subproductos no tóxico para la planta o bien para la salud del humano (Salgado-Garciglia, Pérez-López, García-Munguía, & Loeza-Lara, 2019).

En los extractos vegetales producidos por las plantas se conocen cerca de 100,000 sustancias de bajo peso molecular conocidas como metabolitos secundarios (terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares, esteroides entre otros), los cuales son seleccionados por tener características o propiedades insecticidas, antibacterianas o fúngicas o bien, tener alguna acción de defensa contra insectos, virus, bacterias, etcétera (Vera Delgado, y otros, 2016). En la actualidad, se conocen cerca de 2,400 especies de plantas como plaguicidas, las cuales se aplican para repeler o ahuyentar insectos (mosquitos, gorgojos, palomillas, etc.) de los graneros y evitar el ataque a las diferentes semillas (frijol, maíz, etc.) producidas en las zonas agrícolas (Villavicencio-Nieto & Pérez-Escandón, 2010).

Existen diversos metabolitos secundarios de las plantas con poder insecticida, como el caso de las piretrinas (derivados de la nicotina) caracterizadas por tener un rápido efecto sobre los insectos voladores provocando su derribo, convulsiones e hiperactividad, ya que este tipo de compuestos actúan de forma neurotóxica para el

insecto. Los aceites esenciales son monoterpenos o sesquiterpenos que tienen acción neurotóxica para diversos insectos, debido a que interfieren a nivel del neuromodulador octopamina y el bloqueo de los canales GABA. Algunos otros bioplaguicidas utilizados son las acetogeninas, ésteres de sacarosa, lantana cámara y aceite o extracto de neem, siendo este último utilizado por su docena de triterpenos complejos con acción insecticida por tener la actividad antialimentaria como la familia de la nimbina o salanina (Pérez-López, 2012).

El árbol del neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) es nativo de la India, es utilizado por sus propiedades contra los insectos y la salud humana, debido a que produce varios compuestos bioactivos (tetranortriterpenoides) como al azadirachtina, el cual es un agente activo que presenta un efecto insecticida, regulador del crecimiento y antiapetitivo (Pijoan, 2004; Estrada, López, Castillo, & Puig, 2007), este compuesto fue aislado en el año de 1968 de la semilla de la planta de neem, teniendo como estructura.

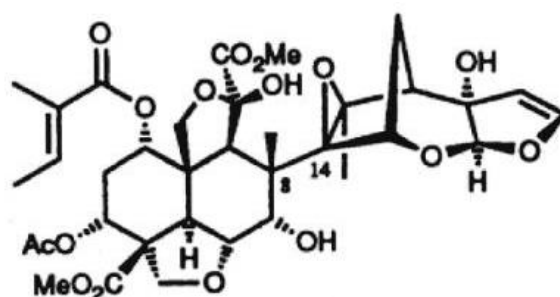


Figura 1.1. Estructura química de la azadirachtina (Fuente:

<https://www.metroflorcolombia.com/azadirachtina-una-alternativa-para-el-manejo-de-plagas-en-su-cultivo/>).

La azadirachtina es un insecticida natural y biodegradable, ya que se ha comprobado su poder insecticida en cerca de 500 especies de insectos plaga y su baja toxicidad en vertebrados e insectos benéficos. Además la azadirachtina y algunos limonoides del extracto de neem presenta efectos a nivel fisiológico sobre los insectos, ya que bloquea la síntesis y liberación de las hormonas implicada en la muda de los insectos y provoca una muda incompleta, inhibe la enzima que cataliza y convierte la ecdisoma en la hormona activa 20-hydroxyecdysone,

destacando la inhibición en el proceso de apareamiento y comunicación sexual, impidiendo la ovoposición y eclosión de huevos provocando esterilidad en las hembras maduras (Pérez-López, 2012; Villamil Montero, Naranjo, & Van Straghlen, 2012; Vázquez-Luna, Pérez-Flores, & Díaz-Sobac, 2007). Así mismo, existen microorganismos utilizados en el control biológico por su acción insecticida, como es el caso de los hongos entomopatógenos.

1.3.2. Microorganismos como control biológico

El control biológico se define como una práctica agrícola que busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plaga mediante el uso de sus enemigos naturales (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019). Los hongos entomopatógenos son agentes biológicos utilizados para el control de plagas, son capaces de producir enfermedad y muerte de los insectos. Estos microorganismos infectan a los artrópodos directamente, a través de la penetración de la cutícula y ejercen múltiples mecanismos de acción, confiriéndoles una alta capacidad para evitar que el hospedero desarrolle resistencia. Sin embargo, para su utilización como control biológico es necesario prácticas agrícolas en donde se manipule el ambiente para beneficiar las poblaciones de entomopatógenos, donde el conocimiento de los aspectos ecológicos del hongo es necesario, tales como la humedad relativa, temperatura, patogenicidad, virulencia y hospederos a los que infecta activamente (Espinel-Correal, y otros, 2018).

Entre los aspectos básicos se encuentran el aislamiento del hongo, cultivo, pruebas biológicas y predicción de los efectos sobre las poblaciones de plagas en el medio ambiente, así como un desempeño predecible sobre cambios de las condiciones medioambientales y una mayor eficiencia de producción. La producción de hongos para el control de plagas implica una amplia investigación donde se involucran disciplinas como la patología, ecología, genética y fisiología, además de técnicas para la producción masiva, formulación y estrategias de aplicación (Motta-Delgado & Murcía-Ordoñez, 2011). Además de que el metabolismo de las células es

importante para la producción de diversos metabolitos primarios y secundarios como las enzimas.

1.3.2.1. Metabolismo de las células

Existen procesos metabólicos en la célula enfocados a la proliferación y crecimiento celular denominado metabolismo primario, que incluye todas las rutas bioquímicas e intermediarios (metabolitos primarios) en la obtención de energía, la reproducción celular y viabilidad. Estos intermediarios son producidos en la etapa activa de crecimiento o fase exponencial en la curva de crecimiento microbiano, siendo algunos de ellos ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos, entre otros. Pero también existen procesos metabólicos que incluyen al metabolismo secundario el cual produce compuestos que comúnmente son excretados al medio donde crece la célula y que no poseen una importancia vital para la misma, obteniéndose a partir de la energía. Los intermediarios o productos finales del metabolismo primario se producen principalmente en etapas donde el crecimiento es lento y sostenido.

La biosíntesis de metabolitos secundarios ocurre generalmente debido a condiciones de agotamiento de nutrientes en el medio, diferenciación y esporulación. Algunos ejemplos de metabolitos secundarios generados en estos escenarios son los antibióticos, toxinas, alcaloides, enzimas, entre otros, los cuales presentan características comunes como la actividad biológica (antimicrobianos, inmunomoduladora, toxoide, antitumorales, antivirales, etc.) la cual es considerada una ventaja para el productor con respecto a sus competidores naturales por la supervivencia en determinado nicho ecológico. Estos compuestos generalmente son de bajo peso molecular, estereoquímica específica, y complejidad química estructural que habitualmente no permite que la síntesis química reemplace a los procesos aeróbicos de fermentación para su producción (Cortés-Sánchez & Mosqueda-Olivares, 2013).

Por otro lado, el crecimiento es importante debido a que los microorganismos producen diferentes compuestos en las distintas etapas como los metabolitos primarios y secundarios, así mismo se ven afectados por factores de crecimiento.

1.3.2.2. Factores de la cinética de crecimiento

En una cinética de crecimiento son importantes los parámetros para la producción de biomasa del microorganismo, como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y la adición de residuos agrícolas, así como también factores físicos como la aireación, el pH y la temperatura logran afectar la producción de quitinasas extracelulares. El pH influye en las funciones de la membrana celular, la morfología de las células, la solubilidad de las sales, el estadio iónico de los sustratos, la absorción de nutrientes y la biosíntesis de productos; en general, las células solo pueden crecer dentro de un intervalo de pH y la producción de metabolitos también se afecta (Fang & Zhong, 2002).

En los hongos entomopatógenos los genes relacionados con la virulencia y la secreción de enzimas que degradan la cutícula de insectos, como las quitinasas, están directamente ligados con factores ambientales como el pH; en consecuencia, los hongos pueden regular su microambiente como un mecanismo de adaptación y supervivencia (Téllez-Jurado, Cruz-Ramírez, Mercado-López, Assaf-Torres, & Arana-Cuenca, 2009).

Por otra parte, la agitación y aireación en los cultivos sumergidos es otro parámetro físico a mencionar ya que la intensidad de agitación puede tener efecto sobre la morfología del hongo, así como en la transferencia de masa. En algunas fermentaciones fúngicas es necesario aplicar velocidades de agitación altas para tener un mezclado adecuado y favorecer la transferencia de masa, especialmente, cuando las células crecen en forma libre y dispersa, lo que resulta en un fluido no newtoniano con viscosidad aparente alta. Sin embargo, la velocidad de agitación debe controlarse para evitar la generación de esfuerzos de corte altos, ya que

pueden llegar a causar daños en el micelio (Trujillo-Roldan & Valdez-Cruz, 2006). La aireación, es un parámetro crítico tanto en la fisiología de los hongos, como en el proceso de la formación de esporas, por lo que una aireación adecuada favorece las características morfológicas del microorganismo (Fenice, Sermani, Federici, & D'Annibale, 2003).

La temperatura también afecta el crecimiento de los microorganismos y, por lo tanto, la producción de enzimas extracelulares que influencia su inducción y actividad (Delgado & Castillo, 2019). Otro factor a evaluar es el conteo de microorganismos, el cual se basa en poner en evidencia la presencia de los microorganismos vivos. Se emplean medios de cultivo general, enriquecido selectivo y diferencial dependiendo de los microorganismos a cuantificar y entre estos métodos se encuentra el conteo por cámara Neubauer.

En cuanto a la biomasa, se refiere a la cantidad de masa de material vivo y se expresa como gramos o calorías (julios) por mililitro o gramo de muestra, el cual mide la cantidad de energía que se almacena en un segmento determinado de una comunidad biológica, por lo que se disponen diferentes métodos para la cuantificación de la biomasa de una población/comunidad microbiana. Algunos de estos métodos son muy sencillos y no requieren manipulaciones complejas; otros métodos son más complejos, siendo necesarias medidas indirectas; estos generan un comportamiento de crecimiento de microorganismo con respecto al sustrato representándose con modelos de crecimiento como se muestra a continuación.

1.3.2.3. Curva de crecimiento

Los microorganismos al ser inoculados en un sistema cerrado al cual no se le añade más cantidad de cultivo que el inicial, las concentraciones de nutrientes disminuyen y las de residuos aumentan (Prescott, Harley, & Klein, 1999). Durante este proceso se observa un crecimiento individual, es decir, un aumento de biomasa y volumen, aunque posteriormente el crecimiento de la población, por lo que continuamente

habrá continuo aumento de masa (Gamboa-Delgado, Márquez-Reyes, & Godínez-Siordia, 2025; Pantoja Guerra, Mendoza Reyes, & Valero Valero, 2018); este crecimiento de los microorganismos se multiplica por fisión binaria como el logaritmo del número de células frente al tiempo de incubación (Prescott, Harley, & Klein, 1999).

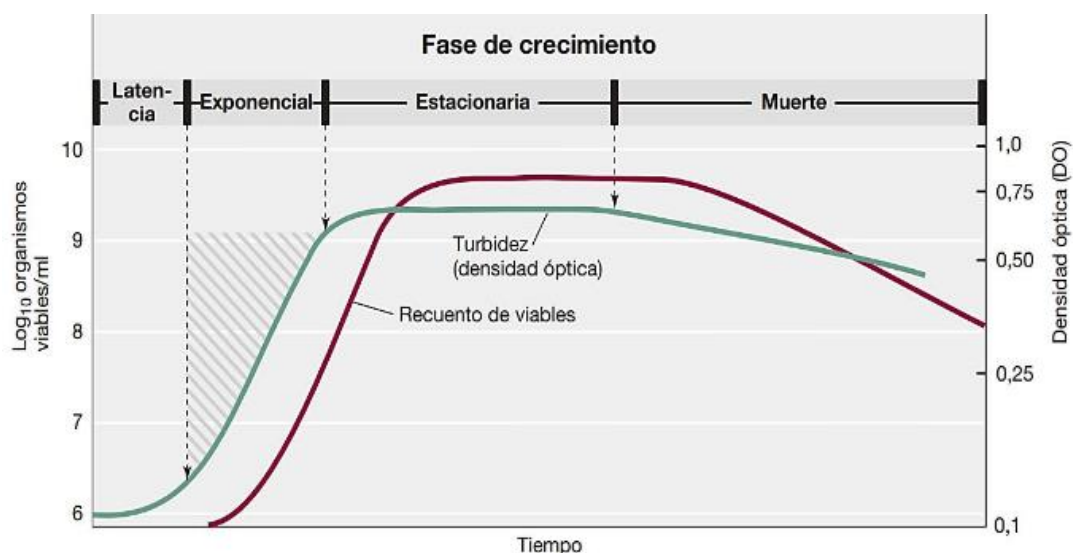


Figura 1.2. Curva de crecimiento microbiano (Fuente: [https://evelia.unrc.edu.ar/evelia/archivos/idAula13881160495/materiales/2_Teoricos/crecimientos iat.pdf](https://evelia.unrc.edu.ar/evelia/archivos/idAula13881160495/materiales/2_Teoricos/crecimientos%20microbianos.pdf))

La curva de crecimiento microbiano representa el comportamiento del microorganismo a través del tiempo respecto al sustrato para determinar cuando hay mayor producción de biomasa o bien metabolitos primarios y secundarios.

Las principales fases presentes en este modelo de crecimiento son latencias, exponencial, estacionaria y muerte. La fase de latencia coincide con el periodo de adaptación de los microorganismos a las nuevas condiciones nutricionales y ambientales, la cual se presenta inmediatamente después de la inoculación y su duración depende del estado fisiológico de la célula inoculada y de las condiciones ambientales. Durante este periodo el aumento de células es mínimo, ya que el microorganismo utiliza la energía disponible para sintetizar las enzimas que requiere

para su desarrollo en el medio; esta fase puede disminuirse durante la inoculación si el microorganismo presenta fase exponencial.

La siguiente fase es la exponencial, donde las células se multiplican a la máxima velocidad y su crecimiento puede ser cuantificado con base en el número de células que se producen por unidad de tiempo (para levaduras o bacterias) o por el aumento en la biomasa por unidad de tiempo. La velocidad de crecimiento durante este periodo permanece constante y es independiente de la concentración del sustrato, siempre y cuando este se encuentre en exceso; esta fase termina cuando los nutrientes se agotan, las condiciones ambientales indispensables para la célula se modifican, y cuando la célula produce metabolitos tóxicos o que inhiben su reproducción (Trinidad Bello, 2014).

La fase estacionaria ocurre cuando la velocidad de crecimiento (reproducción) del microorganismo es igual a la velocidad de deceso y esto implica un equilibrio celular, la cual varía con el tipo de fermentación. Finalmente, la fase de muerte inicia cuando los nutrientes que están en el medio de cultivo no son suficientes para que el microorganismo pueda reproducirse o bien cuando hay producción de sustancias tóxicas que impiden la multiplicación de las células. La curva de crecimiento puede ajustarse por medio de modelos cinéticos de crecimiento microbiano, los cuales nos permiten predecir el desarrollo, optimización de las condiciones de proliferación y la seguridad del microorganismo, así mismo la calidad de los microorganismos en diferentes condiciones ambientales (Caycedo Lozano, Corrales Ramírez, & Trujillo Suárez, 2021).

1.3.2.4. Modelos cinéticos de crecimiento microbiano

Los modelos de crecimiento microbiano describen el crecimiento, supervivencia o muerte de diferentes especies en función de los factores de desarrollo, por lo que permiten interpolar puntos de datos experimentales y así predecir respuestas a condiciones no estudiadas (Camacho Kurmen, Lancheros Díaz, & Guzmán Luna,

2024) y con ello, crear hipótesis existentes entre las relaciones matemáticas de las variables medibles y no medibles en un sistema, proceso o experimentación.

Dentro de estos modelos se tienen los primarios, los cuales se basan en la descripción del número de unidades formadoras de colonias en función del tiempo, y valoradas en distintas condiciones experimentales, es decir su objetivo principal es calcular la cinética de crecimiento de distintos microorganismos con el mínimo de parámetros posibles, evitando la pérdida de exactitud de los valores con cálculos muy elevados. Por lo tanto, estos modelos nos proporcionan información específica de los microorganismos a estudiar (Rincón Santamaría, Cuellar Gil, Valencia Gil, & Sánchez Toro, 2019). Dentro de estos modelos se encuentran Monod, logístico y Gompertz.

Modelo del Monod

La ecuación de Monod representa el modelo de crecimiento celular, el cual describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento y la concentración del sustrato limitante en un cultivo microbiano como se muestra en la Figura 1.3.

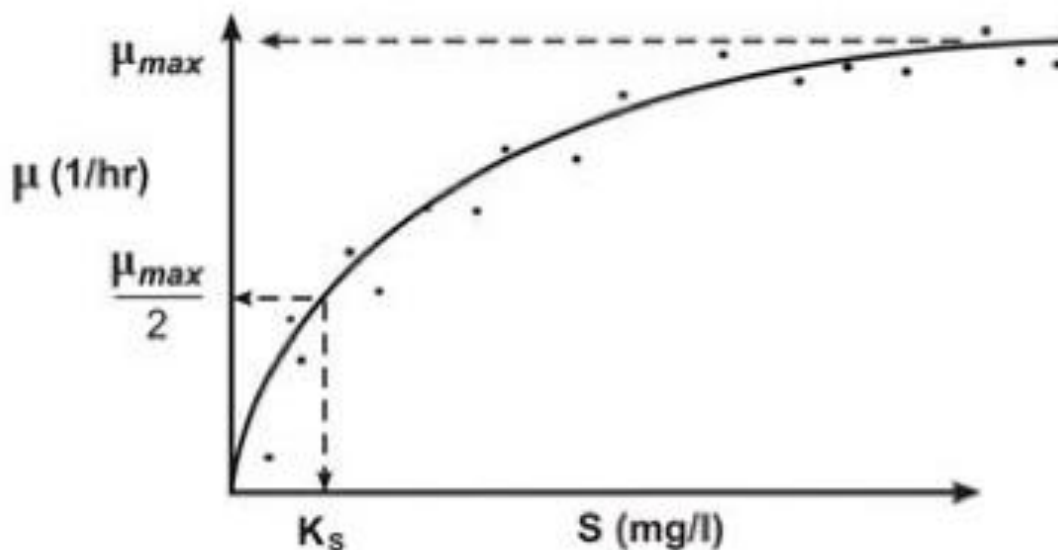


Figura 1.3. Modelo de crecimiento de Monod (Fuente: <https://w3.ual.es/~jfernand/ProcMicro70801207/tema-3---cinetica-del-crecimiento-de-microalgas/3-2-modelos-estaticos.html>)

Donde la ecuación que representa el modelo es

$$\mu = \mu_{max} \left(\frac{S}{S+K_s} \right) \quad (1.1)$$

Donde:

μ = Tasa de crecimiento específico (1/h)

μ_{max} = Tasa máxima de crecimiento específico (1/h)

S = Sustrato (mg/L)

K_s = Constante de saturación del sustrato

El modelo se caracteriza por alcanzar un grado de ajuste cercano a datos experimentales, aunque es un modelo sencillo el tratamiento matemático es integral. El modelo logístico es otro que debe considerarse para el crecimiento microbiano.

Modelo logístico

El modelo logístico de crecimiento describe el comportamiento de la biomasa en distintos procesos de fermentación tomando en cuenta la siguiente ecuación (Ibarra Ulloa & Rodríguez Carrillo, 2010).

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m} \right) \quad (1.2)$$

Al integrar obtenemos

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu t}} \quad (1.3)$$

Donde:

X_m = Concentración máxima de biomasa (mg/L)

μ = Tasa de crecimiento específica (1/h)

X_0 = Concentración de biomasa inicial (mg/mL)

t = tiempo (h)

Además de los modelos mencionados se tiene el modelo cinético de Gompertz, el cual se explica a continuación.

Modelo de Gompertz

El modelo de Gompertz está diseñado para describir los procesos de mortalidad en algunas poblaciones humanas, aunque después fue considerada como modelo cinético de tipo primario, ya que puede ser capaz de la descripción de la concentración de la biomasa al largo del tiempo. Según Cedrón Castro (2016) el modelo de Gompertz describe el número de microorganismos en función del tiempo cuantificando las unidades formadoras de colonias (UFC)/mL, formación de toxinas, metabolitos o en función de la absorbancia. Por lo tanto, este modelo se define como un modelo cinético, ya que es basado por la respuesta del agente de estudio, crecimiento o supervivencia bajo determinadas condiciones (Cayré, Vignolo, & Garro, 2007), es por ello que se describen dicho modelo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y(t) = y_0 + (y_{max} - y_0)e^{\left[1 + \mu_{max}e^{\left(\frac{\tau-t}{y_{max}-y_0}\right)}\right]} \quad (1.4)$$

Donde:

$y(t)$ = Densidad bacteriana (UFC/g) al tiempo

y_0 = Densidad bacteriana inicial (UFC/g)

y_{max} = Máxima densidad bacteriana (UFC/G)

μ_{max} = Tasa máxima de crecimiento específico (1/h)

τ = tiempo de latencia (t)

Los modelos aplicados para el ajuste del crecimiento de diversos microorganismos como los hongos entomopatógenos, por lo que pueden ser importantes debido a que pueden describir el comportamiento de los parámetros cinético como la tasa de

crecimiento específica y optimizar la producción de metabolitos como las enzimas quitinasas o proteasas, las cuales son fundamentales al control biológico de plagas.

1.3.2.5. Hongos entomopatógenos

En la actualidad, es conocido que los hongos entomopatógenos son aquellos utilizados en control biológico de plagas, debido a que son organismos secretores de enzimas como quitinasas, proteasas, lipasas entre otras; estos hongos tienen la capacidad de adherirse y germinar en la epicutícula del insecto, penetrar en la cutícula, propagarse dentro del insecto y dar muerte (Samuels, dos Santos, & Peres Silva, 2011; Sapna Bai, Remadevi, Sesidharan, Balachander, & Dharmarajan, 2012). Dentro de estos hongos entomopatógenos se encuentran los géneros de *Metarhizium anisopliae* (33.9%), *Beauveria bassiana* (33.9%), *Isaria fumosorosea* (antes de *Paecilomyces fumosoroseus*) (5.8%) y *Beauveria brongniartii* (4.1%) (Sánchez-Pérez, Barranco-Florido, Rodríguez-Navarro, Cervantes-Mayagoitia, & Ramos-López, 2014).

Género Beauveria

Este hongo es conocido por ser capaz de infectar a diferentes especies de insectos como orugas, temitas, mosca blanca áfidos, escarabajos entre otro. Lo anterior, se debe a sus fases de desarrollo sobre los hospederos, las cuales consisten en la germinación de la espora, penetración al interior del caparazón, colonización y reproducción del patógeno, es decir, presenta una reproducción sexual dura la etapa infectiva y después una reproducción asexual en la etapa invasiva al hospedero. En la etapa invasiva, la hifa con ayuda de un proceso físico, donde actúa la presión rompe las áreas membranosas esclerosadas del hospedero y después secreta enzimas como proteasas, lipasas y quitinasas para degradar el caparazón y con ello, facilitar la penetración mecánica (Del Puerto-Rodríguez, Suárez-Tamayo, & Palacio-Estrada, 2014; Carr-Espinoza, 2015).

Género Metarhizium

Metarhizium anisopliae es un hongo entomopatógeno, el cual tiene un bajo impacto al ambiente, la fauna benéfica y rentabilidad en su uso, es por ello, que es reproducido de forma artificial, por lo que, es una alternativa viable para el control de plagas (Torres, Córtes, Ortiz, Cappello, & De la Cruz, 2013). Este género de microorganismo asimila muy bien las fuentes de carbono inorgánico y orgánico, así mismo no exige requerimientos especiales de carbohidratos; además es un organismo mesófilo, debido a que crece en un rango de temperatura de 25 a 30°C, la coloración puede ser de verde olivo a amarillo verdoso (Padilla-Melo, Bernal-Urbe, Vélez-Arango, & Montoya-Restrepo, 2000). Este tipo de hongos entomopatógenos excretan enzimas hidrolíticas como proteasas, quitinasas, lipasas entre otras que degradan componentes cuticulares y proporcionan nutrientes para la proliferación del hongo dentro del insecto (Márquez-Gutierrez, Gato- Cárdenas, & Lequerque, 2017).

Género Isaría

Este género de hongo entomopatógeno está ampliamente distribuido por varias ciudades de Norteamérica, Sudamérica, Europa, África, Australia y Asia, debido a que existen diversas especies, las cuales son aisladas del suelo, ya que tienen la capacidad de infectar a diferentes insectos en sus distintos estadios de desarrollo (Gallou, y otros, 2016); esta cepa es considerada una de las más efectivas para el control de la mosquita blanca, ya que puede tener una acción sinérgica con mezclas de insecticidas químicos como acetamitrida e imidacloprida debido a su índice de virulencia contra *Bemisia tabaci* (Zou, Li, Dong, Zhang, & Hu, 2014). Asimismo, este microorganismo ha mostrado gran potencial para el control de plagas, siendo este inofensivo contra organismos benéficos (Flores-Macías, y otros, 2013). En la actualidad se sabe que el género *Isaria* es productor de enzimas similares a las producidas por *Beauveria* como son proteasas, quitinasas, lipasas que ayudan a degradar la cutícula de los insectos, por lo cual puede crecer en medios de cultivo con quitina como fuente de carbono (Téllez-Jurado, Cruz-Ramírez, Mercado-López, Assaf-Torres, & Arana-Cuenca, 2009). La mayoría de estos microorganismos entomopatógenos son productores de enzimas quitinolíticas, las cuales son

capaces de degradar quitina, quitosano y sus derivados presentes en diversas plagas en sus estructuras. Asimismo, la producción de estas enzimas ayuda a la virulencia de los hongos entomopatógenos para su aplicación como agente de control biológico para las plagas.

1.4. Virulencia de los hongos entomopatógenos

La virulencia de los hongos entomopatógenos se relaciona con el grado de especificidad y capacidad de exterminio que presenta hacia un insecto específico en condiciones controladas y cualquier factor que se encuentre asociado con sus hábitos, biología y el medio ambiente donde se involucra el proceso de infección, durante la etapa de germinación, desarrollo y esporulación (Ceceña-Durán, y otros, 2017); este efecto es determinado a partir de la dosis letal 50 (DL_{50}), la cual mide la toxicidad aguda de ciertos compuestos en animales vivos, es decir consiste en la administración a través de la ingesta, inhalación o vías parenterales de distintas cantidades de una sustancia lo que provoca la muerte del insecto; esta prueba se detiene cuando muere el 50% de la población, mientras que el otro 50% que sobrevive es sacrificado para determinar diferentes parámetros de órganos y tejidos (Trujillo Ruiz, y otros, 2008).

Por otra parte, los hongos entomopatógenos tienen su proceso infectivo hacia los insectos hospederos cuando las esporas viables están en contacto en la superficie del integumento y encuentran el espacio necesario para establecer la asociación patógeno-hospedero y con esto, formar túbulos germinales y a veces el apresorio facilitando la invasión del hongo, iniciando así la germinación, la cual comienza al hincharse la espora con un entorno del 70% de humedad durante las primeras 14 horas y se incrementa debido a los carbohidratos presentes en las proteínas de la cutícula del insecto (Pucheta Díaz, Flores Macías, Rodríguez Navarro, & de la Torre, 2006).

El proceso de virulencia de los hongos entomopatógenos hacia los insectos hospederos se realiza en algunos casos mediante modelos o vectores de ensayo, ya que existen insectos que solo se presentan en ciertas épocas del año y por lo tanto son de difícil acceso y recolección para los ensayos de DL₅₀.

1.4.1. Modelos o vectores de prueba o ensayo

En la actualidad, existe organismos utilizados como modelos o vectores de prueba en las investigación biológica, médica y ambiental, debido a su distribución mundial, importancias ambientales, además de su posibilidad de extrapolar estudios de investigación a vertebrados y su costo bajo de crianza, dentro de estos modelos se encuentran los insectos como *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Apis mellifera*, *Bombyx mori*, *Periplaneta americana*, *Locusta migratoria* y *Tenebrio molitor*. Los modelos más utilizados son la familia de coleópteros como *Nicrophorus vespilloides*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Coccinella septempunctata*, *Poecilus cupreus*, *Tenebrio molitor* y muchas otras, además, las áreas en las cuales se utilizan estos vectores son en la biomédica y ambiental, esta última se centra en pruebas para el desarrollo de nuevos pesticidas ya sea de origen sintetizados químicamente o naturales (Adamski, y otros, 2019).

Por otra parte, los insectos son utilizados como modelos por su importancia en el contexto de su desarrollo, comportamiento, neurobiología, la biología evolutiva y aspecto genético debido a que se han secuenciado diversos genomas y encontrado similitudes genéticas y fisiológicas con el humano, por lo que son organismos que comparados con los animales de laboratorio tienen ventajas ya que son económicos de alojar y criar en grandes cantidades, haciéndolos adecuados para pruebas de alto rendimiento, así mismo tiene un ciclo de vida corto que facilita el análisis de los efectos generacionales cumpliendo con el principio 3R (reemplazo, reducción y refinamiento); estos factores favorecen a los insectos como modelos de alto rendimiento de animales completos en la investigación en varias áreas como la biológica, biomédica y ambiental (Tonk-Rügen, Vilcinskis , & Wagner, 2022). Por lo

anterior, fue utilizado *Tenebrio molitor* como vector de prueba para determinar la virulencia de las cepas de hongos entomopatógenos estudiados en el presente trabajo.

1.4.2. Vector de prueba *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor se conoce como gusano de harina o escarabajo molinero, fue descrito por Linnaeus en el año 1748 y forma parte de la familia Tenebrionidea; esta larva presenta dos tipos de escarabajos, *Tenebrio molitor* Linnaeus, el cual es color amarillo y *Tenebrio obscurus* Fabricius, llamado escarabajo oscuro. En la actualidad, la familia de los tenebrios es bastante amplia y se conocen alrededor de 14,600 especies que presentan diferentes características morfológicas como el color, tamaño y forma, las cuales varían de acuerdo a la especie. La especie *T. molitor* se diferencia considerablemente de otras especies de su mismo género debido a su tamaño y sus características morfológicas fácilmente distinguibles, es un coleóptero de color castaño oscuro de cuerpo compacto con bordes paralelos como se muestra en la Figura 1.5 (Jara & Urra, 2022); este coleóptero es un organismo que puede localizarse en cualquier lugar que sea rico en materia orgánica fresca o en descomposición, además prefiere lugares cálidos, oscuros y húmedos, por ejemplo debajo de troncos, hojarasca, harinas, trigo, trozos de madera y avenas, es por esto que se adapta fácilmente a su medio y su reproducción (López-Vásquez, Martínez-Puc, Ramírez-Bautista, López-Hernández, & Candelaria-Martínez, 2025).

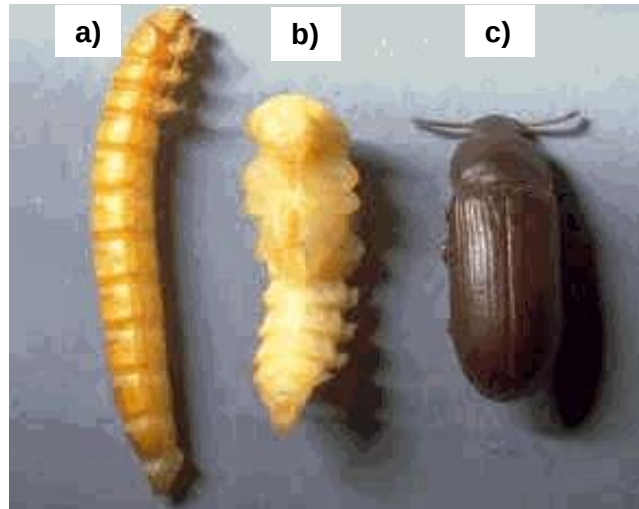


Figura 1.4. *Tenebrio molitor* en sus diferentes estadios: a) larva; b) pupa; c) adulto (Fuente: <https://acuariofilosenaccion.blogspot.com/2014/10/alimento-vivo-el-tenebrio-molitor.html>)

Por lo anterior, *T. molitor* puede consumir cualquier tipo de alimento como se presenta a continuación.

1.4.3. Alimentación y ciclo de vida

Tenebrio molitor es omnívoro debido a que puede alimentarse de casi cualquier tipo de materia vegetal, es decir su alimento principal consiste de cualquier tipo de cereales y granos que se encuentren húmedos y en estado de descomposición, así mismo productos de origen animal; este coleóptero requiere de una fuente de agua para evitar problemas de fertilidad y actividad adulta, además pueden atacar todo tipo de subproductos de la molienda, harinas, semillas, insectos muertos entre otros. A pesar de que estos insectos prefieren los productos de molinería pueden ser alimentados con toda clase de desechos de plantas, harinas de trigo y maíz entre otras, y generalmente son suplementados con fuentes proteicas como la harina de soya y leche en polvo (Granados-López, y otros, 2025).

Por otra parte, *Tenebrio molitor* se caracteriza por hacer una metamorfosis completa en 4 estadios o fases siendo estos huevo, pupa, larva y escarabajo, donde la duración de su ciclo es muy variable y depende de factores como la temperatura y la alimentación, es decir si la alimentación es variada y una temperatura de 27°C se

da una sucesión de generaciones en unas 10 a 12 semanas, mientras que a temperatura de 20°C el ciclo se ralentiza considerablemente y así durar hasta 5 meses, además los escarabajos molineros a 27°C son fértiles de 10 a 12 días después de la metamorfosis (Velásquez Rodríguez, 2022).

La primera fase ocurre cuando las hembras colocan aproximadamente 500 huevos a una semana después de la copulación en un sustrato blando; los huevos son de color blanco y más pequeños que un grano de arena y tardan de 2 a 3 semanas en eclosionar. Después, la segunda fase sucede al eclosionar el huevo para la formación de larvas muy pequeñas, de unos 3 mm de longitud con un color que tiende al naranja claro, y tardan de 10 a 12 semanas en alcanzar el tamaño adecuado y con el tiempo el crecimiento de la larva se acelera y llegan a medir entre 25 y 28 mm de largo, con un grosor de 2.5 a los 3.5 mm y que cambia de color adquiriendo un tono marrón claro. La tercera fase es la pupa, la cual es un estadio intermedio entre larva y adulto, durante esta etapa no necesita alimentarse y tardara aproximadamente una semana en pasar de pupa a adulto pero este tiempo puede reducirse notablemente en condiciones de calor extremo (35 a 40°C). Finalmente, la última fase el adulto que mide entre 1.25 y 1.8 cm de largo, pasados 1 o 2 días los escarabajos, que al nacer son blanquecinos, adquieren el color negro mate característico de los tenebriónidos. Si las condiciones son adecuadas, un escarabajo puede vivir unos tres meses debido a la dependencia de la temperatura y el clima, por lo que se necesitan de 3 a 4 meses para completar el ciclo de metamorfosis en donde el insecto puede vivir hasta 10 meses, siendo la mitad de su vida en forma de adulto (Muñoz-Seijas, y otros, 2024). A continuación se presenta la figura donde se muestra el ciclo de vida de *T. molitor*

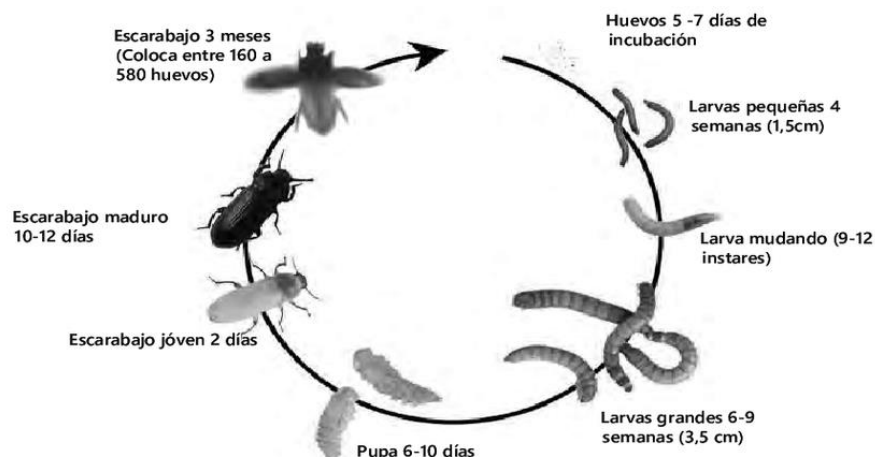


Figura 1.5. Ciclo de vida de *Tenebrio molitor* (Fuente: https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Ciclo-de-vida-de-gusano-de-la-harina-Tenebrio-molitor-Artigas-1994_fig1_346678732)

Por otro lado, existen compuestos naturales que ayudan a formar estructuras poliméricas las cuales tienen la capacidad de encapsular diversos componentes como nutrientes, metabolitos producidos por los organismos o bien plaguicidas entre otro (Rezagholizade-shirvan, y otros, 2024). Los polímeros naturales más utilizados para la preparación de encapsulados biodegradables son polisacáridos como lignina, alginato, cartageninas, agar /agarosa, goma gallan, 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).

Los factores de crecimiento y de producción de metabolitos primarios y secundarios en los microorganismos, son de tomarse en cuenta, debido a que tienen la capacidad de producir enzimas que ayudan a degradar diversos polímeros naturales tal es el caso de celulosa, quitina o sus derivados entre otros.

1.5. Polímeros naturales

En la actualidad, diversos estudios están enfocados a la utilización de polímeros naturales. Los polímeros naturales son materiales producidos por organismos vivos

y son esenciales para la vida; algunos de estos compuestos pueden ser extraídos y modificados para la producción de plásticos de uso comercial como es el caucho natural, los polisacáridos (almidón, celulosa, quitina, etc.), proteínas entre otros (Gómez Ayala & Yory Sanabria, 2018). Los polímeros naturales son utilizados principalmente porque se degradan por completo en un tiempo relativamente corto, donde sus productos de esta reacción es agua, dióxido de carbono y biomasa, Además no tienen efectos a la salud humana y al medio ambiente, se evita la utilización de petróleo y tienen bajo costo de producción (Labeaga Viteri, 2018).

1.5.1. Quitosano

El quitosano se obtiene a partir de la quitina, el cual se obtiene del exoesqueleto de crustáceos industrialmente procesados, y que actualmente, su producción a aumentado en los últimos años, debido a que este producto es una fuente renovable, no toxica y no alergénica, antimicrobiana y biodegradable. La estructura química de esta molécula es presentada en la siguiente figura.

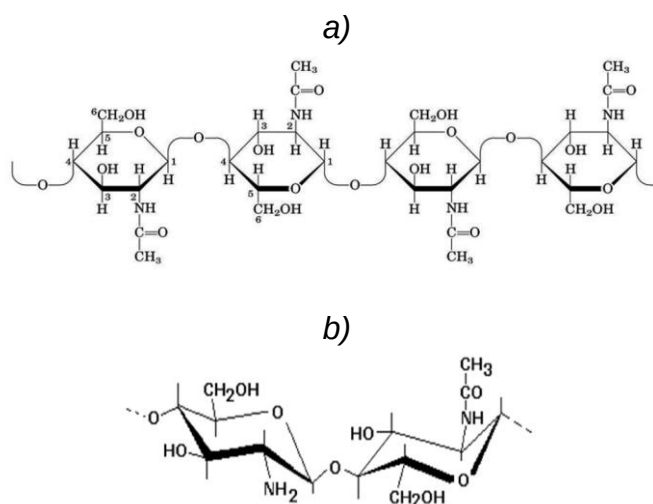


Figura 1.6. Composición química: a) quitina y b) quitosano (Fuente: Mármol, y otros, 2011).

Actualmente, la quitina y el quitosano como biopolímeros han sido utilizados en diversas ramas de la industria (alimentos, farmacéutica, química, etc.) para desarrollar sistemas de liberación controlada a partir de matrices biopoliméricas

generadas por estos materiales, las cuales presentan propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, no tóxico y mucoadhesivo, así mismo estas características han sido empleadas en la agricultura para liberar de forma dosificada diversos agroquímicos, mediante la elaboración de películas, perlas, microencapsulados o hidrogeles (Valderrama Negrón, Jacinto-Hernández, Ponce-García, & Manrique-Pollera, 2017). Por lo anterior, estos polímeros presentan en su estructura nitrógeno conjugado, el cual podría ser liberado durante su degradación, ya que cuenta con una alta biodegradabilidad en presencia de enzimas quitinasas, por lo que, un producto encapsulado con quitosano podría beneficiar a la planta no solo al combate de plagas, sino también en proporcionarle una fuente nutrimental (nitrógeno) con la finalidad de concluir con el ciclo de vida de nuestras materias primas y además que no exista acumulación de sustancias tóxicas en el suelo.

1.5.2. Encapsulamiento con polímeros naturales

La indiscriminada utilización de los plaguicidas ha provocado la contaminación del ambiente y con ello, la acumulación de sustancias tóxicas que afectan a organismos vivos no blanco y la salud humana. En la actualidad, para controlar el uso excesivo de sustancias plaguicidas sean utilizado matrices de polímeros naturales para microencapsular los compuestos y dosificarlos con la finalidad de liberarlos de forma controlada. Algunos de los polímeros usados para este propósito son el almidón de maíz, celulosa, alginato, salvado de trigo, quitosano (Rosas-García & De Luna-Santillana, 2006). Este último, utilizado en la adsorción de agentes contaminantes como los metales pesados en aguas tratadas, así como en diversas aplicaciones en la alimentación, medicina, agricultura, cosmética y farmacia. La quitina y el quitosano es obtenido del exoesqueleto de crustáceos (Hernández-Cocoleta, Aguilar-Almazán, Flores-Agustin, Viveros-Nava, & Ramos-Casellis, 2009).

La encapsulación consiste en el recubrimiento de un principio activo a través de la formación de películas, membranas o partículas esféricas (perlas) semipermeable donde se pueden utilizar diversos polímeros (Vemmer & Patel, 2013), este tipo de

tecnología se ha empleado para el manejo de ciertos compuestos sólidos, líquidos y gaseosos en la industria alimentaria y farmacéutica como aceites esenciales, alimentos susceptibles, colorantes, pigmentos, entre otros (Xu, y otros, 2024), así mismo permite la contención de una sustancia o ingrediente activo en el interior de otra, que constituye al recubrimiento para conservar las moléculas bioactivas, probióticos y productos farmacéuticos (Villafuerte Robles, 2011).

1.5.3. Cinéticas de hinchamiento de encapsulados

Las redes poliméricas tridimensionales formadas durante la encapsulación pueden absorber una gran cantidad de agua o fluidos cuando están en contacto, es por ello que durante el hinchamiento las cadenas que conforman la red se configuran de forma elongada y hay una dilatación acompañada de fuerzas retráctiles en oposición al proceso de hinchamiento, las cuales ejercen presión sobre el disolvente contenido en estas. La presión ejercida es suficiente en el estado de equilibrio para incrementar el potencial químico del disolvente en la disolución y con ello se compensa la concentración debido al exceso de disolventes alrededor del gel hinchado, por lo tanto a mayor entrecruzamiento, mayor cantidad de agente entrecruzante es introducido en la estructura del hidrogel, por lo que si los hidrogeles presentan un mayor entrecruzamiento por su estructura más compacta tienen un menor hinchamiento, en comparación a un hidrogel con menor entrecruzamiento y esto dificulta la movilidad de las cadenas de polímero, disminuyendo así el hinchamiento (García Cruz, 2009).

Por lo anterior, la cinética de hinchamiento puede ser de primer y segundo orden de acuerdo a los modelos propuestos por diversos autores. El modelo de primer orden consiste en un grupo de soluciones de la ley de difusión de Fick para diferentes geometrías, condiciones límite y condiciones iniciales, las cuales estiman la difusividad efectiva del agua y del soluto, simulando los experimentos de condiciones límites de acuerdo a la ecuación del modelo, por lo tanto el uso del modelo de primer orden se convierte en un procedimiento empírico para ajustar los

datos experimentales de acuerdo a ciertas condiciones a un método matemático. Por otro lado, la cinética de hinchamiento de segundo orden asocia las velocidades de transferencia de agua y de solutos que ocurren a través del mecanismo osmótico de difusión, por lo que en la transferencia de masa se cuantifica la ganancia o pérdida de masa que ocurre en el proceso en tiempos cortos (Ochoa Martínez, 2005). Por lo anterior, las ecuaciones que describen los modelos de cinética de hinchamiento son:

Primer Orden:

$$\ln\left(\frac{W_{\infty}}{W_{\infty}-W}\right) = kt \quad (1.5)$$

Segundo Orden:

$$W = \left(\frac{ktW_{\infty}^2}{1+ktW_{\infty}}\right) \quad (1.6)$$

Donde, W representa el hinchamiento de las perlas, W_{∞} es el hinchamiento cuando alcanza el equilibrio en $t = \infty$, k es la constante de velocidad de la reacción y t es tiempo.

Finalmente, el presente trabajo está enfocado a la realización de encapsulado en forma de perlas que contengan esporas de hongos entomopatógenos y extracto de neem como producto para el control biológico de plagas agrícolas.

2. MÉTODO

2.1. Microorganismos

Las cepas de hongos entomopatógenos utilizados en el presente trabajo fueron *Beauveria bassiana* 885.2, *Metarhizium robertssi* Xoch 8.1 e *Isaria javánica* CHE-CNRCB303, los cuales pertenecen a la colección de hongos del Departamento de Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.

2.2. Recolección y mantenimiento de larvas *Conotrachelus crataegi*

La recolección de las larvas de picudo del *Conotrachelus crataegi* (tejocote), fue realizada en una huerta de la comunidad Primero del Primer Barrio de Huejotzingo, Puebla, el cual se encuentra ubicado en las coordenadas 19°18'15.09"N 98°24'19.7"W como se muestra en la Figura 2.1.

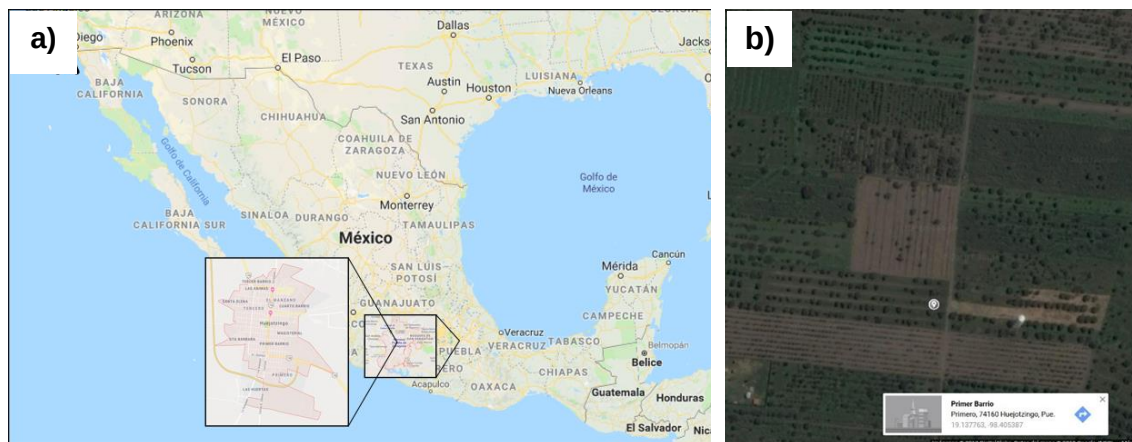


Figura 2.1. Ubicación geográfica de la huerta de recolección de larvas de picudo (*Conotrachelus crataegi*) en tejocote (*Crataegus* spp.): a) Huejotzingo, Puebla; b) comunidad Primero, Primer Barrio de Huejotzingo, Puebla (Fuente: Google Maps, 2018).

Los frutos de tejocote infestados con la plaga de picudo fueron recolectados en el mes de octubre antes de su caída del árbol, con la finalidad de evitar contaminación producida por el suelo de cultivo del huerto. Una vez colectados los frutos de tejocote, fueron colocados en un recipiente con una malla de tela para permitir el intercambio de oxígeno. La revisión de los tejocotes para la detección de la salida de la larva se llevó a cabo diariamente y una vez colectada la larva fue colocada en un recipiente contenedor, el cual contenía de 15 a 20 cm de sustrato estéril Peat Most. Finalmente, las larvas se mantuvieron aisladas hasta su utilización, con humedad aproximada del 50% y una temperatura promedio de 21°C con fotoperiodo de 12:12, L: O.

2.3. Medios de cultivo

A continuación, se describe la preparación de los medios de cultivo empleados:

Medio agar papa dextrosa

El medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) fue utilizado para la propagación, crecimiento de micelio y conservación de las cepas de hongos entomopatógenos utilizadas para los ensayos. La preparación fue agregando 39 g del polvo de PDA

en un litro de agua calentándose hasta ebullición y cuidando que no existiera derrame según el fabricante (MCDLAB).

Agar bacteriológico

El agar bacteriológico fue utilizado para la preparación del medio Kirk sólido, agregando 1.5 % en el medio de cultivo líquido, conforme a las indicaciones del fabricante (MCDLAB) para preparación de medios sólidos.

Medio Kirk

Este medio es considerado un medio definido para el crecimiento de hongos (Márquez-Ortega, 2006; Mendoza-Zurita, 2012), el cual presenta limitación de nitrógeno y contiene los reactivos que se muestran en las Tablas 2.1 y 2.2.

Tabla 2.1. Composición de la solución de elementos traza.

Reactivo	Cantidad
Ácido nitriloacético	1.50 g
Sulfato de manganeso monohidratado ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.50 g
Cloruro de sodio (NaCl)	1.00 g
Sulfato de hierro (II) heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10 g
Cloruro de cobalto (CoCl)	0.10 g
Sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.10 g
Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.01 g
Sulfato de potasio y aluminio dodecahidratado ($\text{AlKSO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	0.01 g
Ácido bórico (H_3BO_3)	0.01 g
Molibdato de sodio dihidratado ($\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.01 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Tabla 2.2. Relación de reactivos presentes en el medio Kirk.

Reactivo	Cantidad
Glucosa ($C_6H_{12}O_6$)	10.00 g
Tartrato de amonio ($(NH_4)_2 C_4H_4O_6$)	0.20 g
Sulfato de magnesio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.50 g
Fosfato de potasio diácido (KH_2PO_4)	2.00 g
Cloruro de calcio ($CaCl_2$)	0.10 g
Tiamina $\cdot$ HCl	1.00 mg
Solución de elementos traza	10.00 mL
Agua destilada	Hasta 1 L

2.4. Propagación de las cepas

La propagación de las cepas monospóricas se realizó a partir de un cultivo inicial del hongo entomopatógeno, la cual consistió en cortar un trozo de medio agar PDA con el hongo de estudio de aproximadamente 1 cm^2 , y fue colocado en el centro del medio de cultivo PDA estéril presente en una caja Petri dejándose en incubación a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta su crecimiento.

2.5. Fermentación sólida

Para la producción de conidios, fue utilizado arroz como sustrato para la realización de una fermentación sólida, la cual consistió en primer lugar en el lavado del arroz (*Oriza sativa* L.) con agua corriente durante 2 min con la finalidad de eliminar las partículas ajenas al sustrato. Después se dejó remojar durante 15 min para luego escurrirse durante 10 min. Posteriormente fueron colocados 100 g (peso húmedo) del sustrato en bolsas de polietileno de alta densidad (HDPE) de 500 g de capacidad para su esterilización en autoclave a 121°C ó 15 psia por 15 min. Una vez esterilizado el sustrato se dejó enfriar durante 24 h para su inoculación.

La inoculación de los diferentes hongos entomopatógenos fue a través de la preparación del preinoculo, el cual consistió en cortar en cuadros de

aproximadamente 1 cm² el cultivo propagado del hongo en PDA y adicionarlos en 200 mL de agua estéril vertidos en un matraz de 500 mL dejando agitar de forma constante para desprender micelio y esporas del medio por 24 horas. Luego, el preinoculo fue inyectando con jeringas estériles 5 mL de una suspensión con una concentración de esporas mayor a 1×10^6 esporas/mL, procurando esparcir la suspensión de forma homogénea en la bolsa de sustrato. A continuación, se dejaron en incubación las bolsas de sustrato inoculadas durante 16 días a temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, exponiéndose a la luz blanca en una proporción 12:12 L:O, tomando en cuenta que las bolsas fueron agitadas cada tercer día para la dispersión homogénea de las esporas en el sustrato. Al finalizar la inoculación, se realizó el conteo de los conidios (Rodríguez-Gámez, y otros, 2017).

La medición de la productividad de las esporas en el sustrato fue realizada después de los 16 días de incubación, tomando en cuenta la medición de la concentración de conidios por gramo de sustrato de cada una de las bolsas para las cepas de los hongos entomopatógenos utilizadas para la experimentación. La determinación fue adicionando 1 g de cada uno de los sustratos más 9 mL de solución estéril Tween 80 al 0.1% (v/v) en tubos de ensayo. Una vez agregado el sustrato, se homogeneizó la solución con agitación constante durante 2 min en Vórtex para desprender los conidios del sustrato. Finalmente, se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) para el conteo de conidios utilizando la cámara de Neubauer (Rodríguez-Gámez, y otros, 2017).

2.6. Fermentación líquida sin agitación

Para el desarrollo de la fermentación líquida previamente se preparó un pre-inóculo, el cual consistió en agregar 10 g de fermentación sólida de arroz que contenía esporas del hongo entomopatógeno (en una concentración mayor de 1×10^6) en 90 mL de agua destilada estéril para obtener una dilución 1:10 (el conteo de esporas se encuentra en apartado 2.7). Una vez realizada la mezcla se dejó durante 24 h a temperatura de 22°C para el desprendimiento de las esporas y su homogenización. Después el pre-inóculo de esporas fue utilizado para la inoculación con 3 mL

(equivalente al 10% del volumen del medio de cultivo líquido) a cada frasco con 27 mL de medio Kirk líquido para alcanzar un volumen total de 30 mL dentro del frasco. El ensayo fue realizado para cada una de las cepas hongos entomopatógenos (*B. bassiana*, *M. robertssi* e *I. javánica*), donde las condiciones de incubación fueron a una temperatura de 22°C, sin agitación durante 30 días por triplicado, tomando muestras cada tercer día con la finalidad de obtener cinéticas de crecimiento, cantidad de biomasa, pH, sustrato consumido, proteína, formación de esporas y actividad enzimática de las quitinasas en el medio durante la fermentación, y así determinar parámetros de crecimiento de cada cepa de hongo entomopatógeno.

2.7. Determinaciones analíticas

El presente apartado está enfocado a cada una de las determinaciones analíticas realizadas en la cinética de crecimiento, las cuales son: consumo de sustrato, cuantificación de biomasa, pH, conteo de esporas, cuantificación de proteínas, actividad quitinolítica y parámetros de crecimiento; éstas fueron desarrolladas durante el muestreo de la cinética de crecimiento por triplicado a temperatura de 22 °C, en los cuales se tomaron cada uno de los frascos con 30 mL de muestra para la experimentación.

Consumo de sustrato

El consumo de sustrato fue determinado mediante la técnica del ácido 3,5-dinitrisalicílico (DNS) para azúcares reductores. En primer lugar, se elaboró una curva patrón o calibración con diluciones de concentración de glucosa de 0 a 1 mg/mL (ver ANEXO A) para la cuantificación de los azúcares reductores presentes durante la fermentación líquida. Una vez realizada la curva, se llevó a cabo el pipeteo de 0.5 mL de la muestra, los cuales se colocaron en un tubo de ensaye de 15 mL, después se adicionaron 0.5 mL de reactivo DNS mezclándolo con Vortex hasta conseguir homogeneidad en la solución, la cual se colocó en agua a ebullición durante 5 minutos.

Posteriormente, se paró la reacción en un baño María con agua fría, para agregar enseguida 5 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 15 min. Finalmente, se realizó la lectura de la absorbancia a 540 nm. El blanco se elaboró adicionando 0.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de reactivo DNS siguiendo los pasos explicados con anterioridad. El procedimiento se realizó por triplicado de las muestras obtenidas de la fermentación líquida (Wang, y otros, 2016; Ávila Núñez, Rivas Pérez, Hernández Motzezak, & Chirinos, 2012).

Cuantificación de biomasa

La determinación de biomasa se realizó mediante la diferencia de pesos secos; este procedimiento en primer lugar consistió en eliminar la humedad de cada filtro, hasta llegar a peso constante, cabe mencionar que un filtro es utilizado para un frasco de muestra con 30 mL de la fermentación líquida. Después se colocaron los filtros en un portafiltro y se llevó a cabo la filtración de la muestra obtenida cada tercer día de la fermentación líquida. Concluida esta etapa, los filtros con micelio se colocaron en una estufa a 60 °C, para su secado, así mismo estos fueron pesados hasta alcanzar peso constante y con ello, obtener la diferencia de pesos que significa la cantidad de biomasa en gramos producidos por unidad de tiempo. La fórmula utilizada fue la que se presenta a continuación.

$$W_b = W_{cm} - W_{sm} \quad (2.1)$$

Donde:

W_b = peso de biomasa producida por el hongo entomopatógeno.

W_{cm} = peso de papel filtro con micelio.

W_{sm} = peso del papel filtro sin micelio.

La determinación se realizó por triplicado durante 30 días con muestreo cada tercer día manteniendo una temperatura de 22°C en el cultivo.

Medición de pH

El pH fue determinado mediante un potenciómetro digital, el cual se calibró previamente utilizando buffers de calibración de pH 10, 7 y 4. Una vez calibrado el equipo, fueron tomadas las muestras de cada día de la cinética de crecimiento de los hongos entomopatógenos por triplicado para realizar la medición del pH a 22°C durante los 30 días de duración de la prueba.

Conteo de esporas

Para el conteo del número de esporas durante los ensayos, fueron tomadas alícuotas de 0.05 mL de cada una de las muestras, las cuales se colocaron en la cámara de Neubauer para su conteo directo, donde fueron contados 13 cuadros al azar de las 25 cámaras (integradas por los 16 cuadros) (Marín Cervantes, 2006), utilizando la siguiente fórmula para expresar el número de esporas por mililitro de suspensión.

$$N = nFD \quad (2.2)$$

Donde:

N = número de esporas/mL de suspensión inicial.

n = promedio del número de esporas contadas en la cámara de Neubauer.

F = factor de la cámara empleada (25×10^4).

D = dilución empleada para el conteo.

Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas fue llevada a cabo por el método propuesto por el fabricante (Bio-rad), este consiste en realizar una curva de calibración con seroalbumina bovina con dilución de concentraciones de 0.0 a 1.0 mg/mL (ver ANEXO B). Una vez realizada la curva patrón, se realizó la cuantificación de proteínas con las muestras obtenidas durante la fermentación líquida por triplicado. Este ensayo consistió en pipetear 0.1 mL de muestra en tubos de ensaye de 15 mL, enseguida fueron adicionados 5 mL de reactivo Bradford diluido como se especifica en la curva de calibración, mezclando homogéneamente con un Vortex y dejándose

reposar durante 5 min a temperatura ambiente. Después la mezcla fue leída en el espectrofotómetro UV-vis (Thermo Scientific™ GENESYS 10S) a una absorbancia de 595 nm. No debe dejarse reaccionar por más de una hora, ya que las lecturas pueden verse afectadas (Pandey & Budhathoki, 2007; Sim, Liew, Ding, Choong, & Intan, 2017; Bio-rad, 2020).

Actividad quitinolítica

La actividad enzimática quitinolítica fue determinada a partir de la técnica del ácido 3,5-dinitrisalicílico (DNS) para azúcares reductores. En primera instancia, se elaboró una curva patrón o calibración con diluciones de concentración de N-acetil-D-glucosamina de 0.2 a 7 mg/mL (ver ANEXO C) para la cuantificación de los azúcares reductores formados durante la incubación de la solución muestra con el quitosano. Una vez realizada la curva, fue llevada a cabo la medición de la actividad quitinolítica, la cual consistió en la toma de 1.0 mL de la muestra, el cual se colocó en un tubo de ensaye de 15 mL, después se adicionó 1.0 mL de solución de quitosano al 5% en buffer de citratos 0.1 M a pH de 7.0, con mezclado.

Una vez mezclado se incubaron las muestras a 37 °C en baño maría durante 30 min. Posteriormente, fueron adicionados 2 mL de reactivo DNS con mezclado homogéneo de la solución utilizando un Vortex para luego, colocarlos en agua en ebullición durante 5 min. La reacción fue parada en un baño María con agua fría, enseguida se adicionaron 10 mL de agua destilada y se dejó reposar durante 15 minutos. Finalmente, la lectura fue realizada en el espectrofotómetro UV-vis (Thermo Scientific™ GENESYS 10S) a 575 nm. El blanco se elaboró adicionando 1.0 mL de agua destilada más 1.0 mL de quitosano al 5 % en buffer de citratos 0.1 M a pH 7.0, repitiendo los pasos realizados con la muestra. Este ensayo se realizó por triplicado con cada una de las muestras obtenidas de la cinética de crecimiento de cada hongo entomopatógenos estudiado en la fermentación líquida (Saadoun, Al-Omari, Jaradat, & Ababneh, 2009).

Parámetros de crecimiento

Los parámetros fueron determinados utilizando Microsoft Excel 2010 con la herramienta Solver, en la cual se realizó un ajuste de la fermentación líquida por medio del Modelo de cinética de crecimiento específica de Monod (Calderón Vargas J. F., 2017), según la siguiente ecuación.

$$X = \frac{K_s}{1 + \frac{K_s - X_0}{X_0} \exp^{-\mu t}} \quad (2.3)$$

Donde:

X = concentración de biomasa (g/mL).

X_0 = concentración de biomasa inicial (g/mL).

K_s = constante de saturación de sustrato (g/mL).

t = tiempo (h).

μ = tasa de crecimiento específica (h^{-1}).

Asimismo, el tiempo de duplicación (Jurado-Gómez & Guzmán-Insuasty, 2015), se obtuvo a través de la ecuación siguiente.

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu_{max}} \quad (2.4)$$

Donde:

t_d = tiempo de duplicación (h).

μ_{max} = velocidad máxima de crecimiento (h^{-1}).

En la determinación de los parámetros de crecimiento, la concentración de biomasa máxima (X_{max}) se calculó mediante la ecuación de Monod tomando en cuenta el valor máximo de biomasa reportado en la curva de ajuste. Asimismo, la actividad enzimática máxima (E_{max}), se obtuvo tomando en cuenta el valor máximo en la curva de actividad quitinolítica específica experimental. El rendimiento de la producción de biomasa con respecto a la concentración del sustrato ($Y_{x/s}$), se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (2.5)$$

Donde:

$Y_{X/S}$ = rendimiento biomasa con respecto al sustrato (g X/ g S).

X_0 = biomasa inicial de la curva de crecimiento (g).

X_f = biomasa final de la curva de crecimiento (g).

S_0 = sustrato inicial de la curva de crecimiento (g).

S_f = sustrato final de la curva de crecimiento (g).

El rendimiento de la actividad enzimática con respecto a la biomasa ($Y_{e/X}$), se obtuvo de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$Y_{e/X} = \frac{E_{max}}{X_{max}} \quad (2.6)$$

Donde:

$Y_{e/X}$ = rendimiento de la enzima con respecto a la biomasa (U /g X).

E_{max} = actividad quitinolítica máxima (U L⁻¹).

X_{max} = biomasa máxima producida en la fermentación (g L⁻¹).

La productividad máxima de actividad enzimática (P_{RO}) fue calculada con la siguiente ecuación.

$$P_{RO} = \frac{E_{max}}{t} \quad (2.7)$$

Donde:

P_{RO} = Productividad máxima de actividad (U L⁻¹ / h).

E_{max} = actividad quitinolítica máxima (U L⁻¹).

t = tiempo de fermentación (h).

2.8. Pruebas de inhibición de hongos entomopatógenos con extracto de neem

Tabla 2.3. Diseño de experimentos para la prueba de inhibición de hongos con extracto de neem.

Muestra	Concentración de neem (%)								Hongos entomopatógenos		
	En agua				En aceite				<i>B. bassiana</i>	<i>M. robertssi</i>	<i>I. javanica</i>
	0.5	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0	1.5	2.0			
Testigo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Testigo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Testigo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
1	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
2	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
3	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
12	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+
13	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
14	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
15	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
17	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
18	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
19	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
22	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
23	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
24	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+

En la Tabla 2.3 se muestra el diseño experimental de la prueba de inhibición, que consistió en la elaboración de medio PDA, el cual se esterilizó dejándose enfriar hasta alcanzar 40°C. Luego, se adicionaron las concentraciones de 0, 0.5, 1.0, 1.5

y 2% de extracto de neem base agua (PHC NEEEM) y base aceite (Azanim, Biokrone). Posteriormente, el medio fue vertido en cajas Petri hasta su solidificación. Una vez solidificados fueron inoculados con un asa de platino con la suspensión de esporas obtenidas de la fermentación sólida con los hongos entomopatógenos en tres puntos de la caja Petri por triplicado. Terminada la inoculación de los hongos, se incubaron las cajas a una temperatura de 23 ± 2 °C con cambios de luz y oscuridad (12:12, L: O) durante 20 días. Finalmente, al término de la incubación se midieron los diámetros del micelio (Castiglioni, Djair Vendramim, & Batista Alves, 2003; Hirose, y otros, 2001).

2.9. Efecto de extracto de neem sobre larvas de *Conotrachelus crataegi* (picudo del tejocote)

Para la prueba fueron utilizadas las larvas recolectadas de picudo del tejocote, las cuales se dosificaron con 2 µL de una solución de extracto de neem al 1.5% (tanto extracto en agua como en aceite). Una vez dosificadas las larvas, se colocaron en cada caja Petri con Pet Most húmedo en grupos de 5 unidades, el ensayo fue realizado por triplicado. El seguimiento del efecto del neem en larvas y pupas fue cada 24 h durante una semana, siguiendo el diseño experimental que se presenta a continuación.

Tabla 2.4. Diseño de experimentos para determinar el efecto del extracto de neem sobre larvas de picudo de tejocote.

Muestra	Extracto de neem	
	En agua	En aceite
Testigo	-	-
Larvas 1	+	-
Larvas 2	-	+
Testigo	-	-
Pupa 1	+	-
Pupa 2	-	+

2.10. Perlas de quitosano-neem-esporas

Para la elaboración de las perlas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato de sodio (TPP), primero fue preparada una solución de quitosano al 4 %(w/v), en ácido acético al 1.5 %(v/v). Esta solución de quitosano se goteó a través de una boquilla de goteo en una solución de TPP al 2 % (m/v), para la formación de las perlas de quitosano entrecruzadas con tripolifosfato (q-TPP) (Sánchez-Duarte, y otros, 2017). Asimismo, fueron preparadas perlas de q-TPP adicionadas con extracto de neem acuoso y en aceite al 1.5 %, y solución de esporas con una concentración mayor a 1×10^6 esporas/mL y finalmente, perlas de q-TPP-neem-esporas, como se muestra a continuación.

Tabla 2.5. Diseño de experimentos para la elaboración de las perlas de quitosano adicionadas con extracto de neem y esporas de hongos entomopatógenos.

Perla	Quitosano	Neem		Hongos entomopatógenos		
		En agua	En aceite	<i>B. bassiana</i>	<i>M. robertssi</i>	<i>I. javanica</i>
Testigo	+	-	-	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-
3	+	-	-	+	-	-
4	+	-	-	-	+	-
5	+	-	-	-	-	+
6	+	+	-	+	-	-
7	+	+	-	-	+	-
8	+	+	-	-	-	+
9	+	-	+	+	-	-
10	+	-	+	-	+	-
11	+	-	+	-	-	+

A las soluciones utilizadas para la elaboración de cada una de las perlas se les comprobó la viscosidad, mientras que a las perlas se les determinó el diámetro, porcentaje de humedad, cinética de hinchamiento y morfología.

Determinación de la viscosidad

La viscosidad fue determinada preparando 250 mL de cada solución mostrada en la Tabla 2.5, es decir, fueron preparadas las soluciones de quitosano, neem y esporas como es indicado en el apartado 2.10. Una vez preparadas las mezclas, se colocaron en un vaso de precipitados para realizar la medición con un viscosímetro rotacional digital marca Cole-Palmer, el cual se calibró previo a su utilización como lo indica el fabricante. Terminada su calibración, fueron realizadas las mediciones de las muestras de mezclas a temperatura de 25°C por triplicado.

Determinación del diámetro de las perlas

El diámetro de las perlas húmedas fue obtenido mediante su extracción en un recipiente con papel absorbente para luego colocarlas en un microscopio estereoscópico y medir su diámetro con un vernier digital Trupper. El conteo de los diámetros fue a partir de la medición de 50 unidades de perlas (Sánchez Duarte, y otros, 2017).

Determinación del porcentaje de humedad

Este ensayo fue a través del pesado de 2 g de muestra y su colocación en una estufa a 60°C durante 24 h. Después fueron retiradas de la estufa y colocadas en un desecador durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se pesaron las muestras, el procedimiento fue repetido hasta alcanzar el peso constante (Rodríguez Hamamura, Valderrama Negrón , Alarcón Caverro, & López Milla, 2010). La fórmula utilizada para esta determinación fue la siguiente.

$$Humedad (\%) = \frac{(Peso\ de\ perlas\ húmedas - Peso\ de\ perlas\ secas)}{Peso\ de\ perlas\ húmedas} \times 100 \quad (2.8)$$

Cinética de hinchamiento

Las muestras de perlas liofilizadas fueron pesadas para obtención de su peso seco y luego, colocadas en agua bidestilada a 22°C para determinar la cinética de

hinchamiento. La prueba se realizó por triplicado, la cual consistió en el pesado de las perlas a distintos tiempos (0, 15, 30, 45, 60, 75, 105, 135, 180 y 240 min) secando la superficie con papel absorbente para eliminar el exceso de agua (Córtes-Ortega, 2013; Kipcak, Ismail, Doymaz, & Piskin, 2014; Kowalski, Kijowska, Witczak, Kuterasiński, & Łukasiewicz, 2019; Ostrowska-Czubenko, Gierszewska, & Pieróg, 2015). El hinchamiento de las perlas (W) fue realizada a través de la diferencia de los pesos de la muestra seca y la hinchada mediante la siguiente ecuación:

$$W = \frac{(\text{Peso perlas húmedas} - \text{Peso perlas secas})}{\text{Peso perlas húmedas}} \quad (2.9)$$

Después fue graficado el hinchamiento contra el tiempo para obtener la cinética de hinchamiento, y con ello, realizar el ajuste con modelos cinéticos de hinchamiento de primer y segundo orden.

Morfología

La determinación de la morfología de las perlas sintetizadas fue realizada seleccionando especímenes de cada tipo; los cuales fueron previamente liofilizados para eliminar el agua que contenían. Para la determinación de la morfología fueron seccionadas por la mitad algunas de las muestras liofilizadas de cada tipo. Como parte de la preparación, adicionalmente a su liofilización las muestras fueron recubiertas con oro en el equipo Denton Vacuum Desk V con un vacío a 30 mA durante 45 s. Finalmente las muestras fueron colocadas en el interior de la cámara del microscopio electrónico de barrido (MEB) marca JEOL, modelo JSM-6390LV, se realizaron varias tomas con la finalidad de determinar las características de su superficie y el interior, con respecto a la textura, rugosidad y porosidad, las condiciones de operación fueron alta resolución, alto vacío con bombardeo de electrones retrodispersados en la estructura sólida de la superficie de las perlas con una aceleración de 20kV.

2.11. Virulencia de perlas quitosano-neem-esporas en sustrato inerte con *Tenebrio molitor* como vector de prueba

El ensayo consistió en simular las condiciones de contacto de las seis diferentes perlas a base de quitosano con *T. molitor* en Peat Moss como sustrato inerte. Se pesaron 200 g de Peat Moss (sustrato inerte) en bolsas de polipapel de 500 g, el cual fue esterilizado a 121 °C (15 psia) por 15 minutos en autoclave. Posteriormente fueron preparados los contenedores tipo bisagra transparentes de poliestireno, los cuales se desinfectaron en el cuarto de cultivo con alcohol por dentro y fuera. A continuación, en cada contenedor se colocaron 100 g de Peat Moss de una de las bolsas esterilizadas para formar la primera capa en el fondo del recipiente, se roció agua destilada estéril, se adicionaron 30 g de perlas (de acuerdo al apartado 2.10 con las perlas sintetizadas: quitosano como testigo, perla 2, perla 3, perla 4, perla 9 y perla 10), los 100 g de Peat Moss restantes fueron colocados en forma de capa, humedeciéndose nuevamente con agua destilada estéril. Una vez preparados los contenedores con el sustrato estéril y las perlas, se procedió a la colocación de 10 larvas de *Tenebrio molitor*, previamente desinfectadas. Las larvas de *T. molitor* fueron desinfectadas al sumergirlas en 10 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 5 segundos, después se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril por 30 segundos y finalmente se agregaron en el contenedor para la realización del ensayo por triplicado con una duración de 44 días con toma de muestra cada tercer día para la medición de la mortandad de las larvas por infección por parte de las perlas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Recolección y conservación de larvas

La recolección del tejocote infestado con la plaga del picudo fue realizada en una huerta de la comunidad Primero del Primer Barrio de Huejotzingo, Puebla en el mes de agosto de 2018. La huerta (Figura 3.1) donde se colectaron los ejemplares presentaba abandono por parte de los dueños, provocando una invasión del picudo en los árboles de tejocote, lo cual podría desencadenar una propagación de la plaga hacia los huertos aledaños, ya que aun en ellos no se ha acentuado la plaga.



Figura 3.1. Huerta de Tejocote ubicada en la comunidad Primero del Primer Barrio de Huejotzingo Puebla.

Durante la recolección fueron considerados algunos cambios físicos en el fruto, principalmente en el color, deformación y orificios de salida de la larva de picudo, así mismo solo fueron recolectados frutos infectados que aún se encontraban en las ramas de los árboles para evitar algún tipo de contaminación del producto por agentes biológicos como bacterias y hongos al caer al suelo, como se muestra en la Figura 3.2. Al término de la colecta, fueron identificados los árboles que presentaban mayor cantidad de frutos de Tejocotes infestados con las larvas, estos mostraron deformación del producto, bajo grado de madurez y algunos presentaban orificios de salida del picudo.



Figura 3.2. Frutos de tejocote infestados con la plaga de larvas de Picudo (*Conotrachelus crataegi*)

Recolectados los tejocotes fueron colocados en recipientes plásticos rectangulares para la recuperación de las larvas de picudo en condiciones adecuadas, como se muestra en la Figuras 3.3 a y 3.3 b.



Figura 3.3. Conservación de las larvas del picudo: a) tejocotes en cajas rectangulares

Recolectados los tejocotes con presencia de larvas en su interior se colocaron en los recipientes, los cuales fueron transportados hasta el laboratorio, en donde a los recipientes plásticos se les agregó una cama de aproximadamente un tercio de volumen del sustrato Pet Most y después fueron introducidos los tejocotes con posibles larvas. Finalmente, se taparon con tela de malla muy fina para el intercambio de aire entre el exterior y el interior para evitar la muerte de las larvas como se muestra en la Figura 3.3 c. Los resultados fueron favorables, debido a que se recuperaron las larvas del picudo para los ensayos de mortalidad con neem,

desafortunadamente las larvas solo se encuentran en una época del año y la gran mayoría no se conservaron es ese estadio, sino que se transformaron en pupa y adultos en un corto tiempo, por lo que ya no se logro realizar el ensayo con las perlas.

3.2. Fermentación sólida

La fermentación sólida en arroz tuvo una duración de 16 días, en cada una de las cepas existió producción de esporas, ya que se observó un residuo parecido a polvo de diferentes colores en la bolsa de plástico, el cual corresponde a las esporas de hongos entomopatógenos. Los colores de las esporas son variados, ya que *I. javánica* produce esporas color beige, *B. bassiana* esporas de color blanco y *M. robertssi* produce esporas color verde como se muestra en la Figura 3.4.



Figura 3.4. Producción de esporas por fermentación sólida en arroz: a) *B. bassiana*; b) *I. javánica* y c) *M. robertssi*.

Una vez concluida la fermentación sólida para la producción de esporas, se tomó un gramo del arroz y se diluyó en solución de Tween 80 para obtener las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000, y con ello, realizar el conteo de esporas de cada cepa de hongos entomopatógenos, como se presenta en la Figura 3.5.



Figura 3.5. Diluciones de cada cepa para el conteo de esporas mediante la cámara de Neubauer.

Realizadas las soluciones de esporas, se observó que las tres cepas alcanzaron la cantidad de esporas deseada (Tabla 3.1), la cual debe ser mayor a 1×10^6 esporas/mL que corresponde a la cantidad de esporas de hongo requeridas para la germinación e infección a las plagas y pueda tener un efecto en el crecimiento del insecto (Acuña Jiménez, García Gutiérrez, Rosas García, López Meyer, & Saíenz Hernández, 2015), en el caso particular del picudo de tejocote como lo consideran algunos autores.

Tabla 3.1. Concentración de esporas producida por cada cepa de hongo.

Tipo de hongo	Concentración (esporas/mL)		
	Diluciones		
	1:10	1:100	1:1000
<i>B. bassiana</i>	1.76×10^8	1.81×10^7	3.14×10^6
<i>I. javánica</i>	1.96×10^8	1.94×10^7	2.15×10^6
<i>M. robertssi</i>	8.58×10^8	2.26×10^7	1.43×10^6

Concluido el proceso de fermentación sólida y el conteo de esporas, fue llevado a cabo el ensayo de la fermentación líquida con el medio definido Kirk, el cual fue

utilizado para determinar el comportamiento en el crecimiento de hongos y calcular algunos parámetros cinéticos de estos microorganismos.

3.3. Fermentación líquida

A continuación, se presentan los resultados de cada una de las determinaciones analíticas realizadas durante la fermentación líquida. En la Figura 3.6 se muestran los resultados de la producción de biomasa durante la fermentación líquida. En dicha figura se puede observar que las tres cepas de hongos entomopatógenos (*B. bassiana*, *M. robertssi* e *I. javánica*) mostraron comportamientos similares, aun cuando *M. robertssi* tuvo un crecimiento en la prueba más lento en los primeros 12 días. Asimismo, *B. bassiana* e *I. javánica* presentaron producción de biomasa similar, alcanzando las dos cepas un máximo de producción de biomasa a partir del día 18 de la cinética de crecimiento.

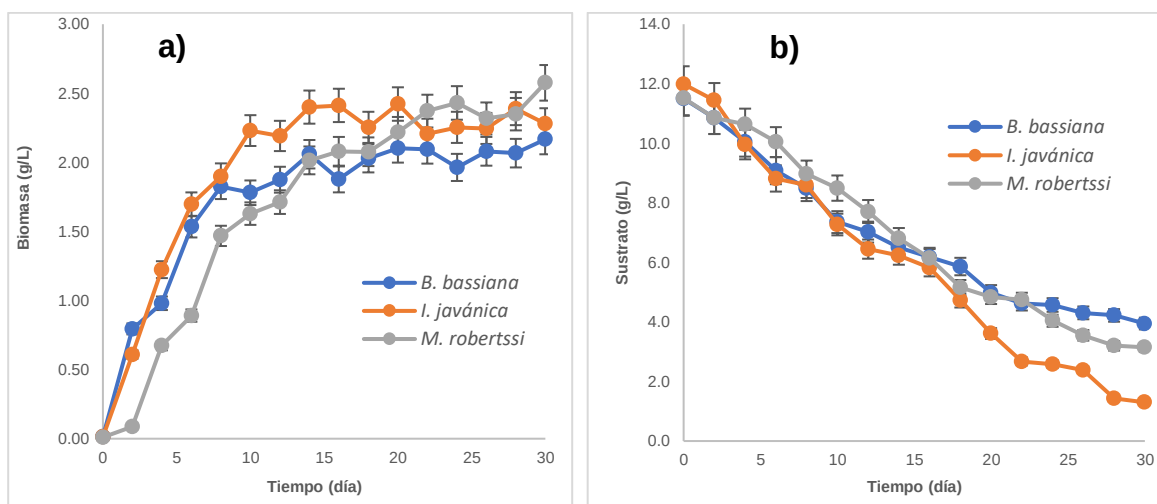


Figura 3.6. a) Producción de biomasa, y b) Consumo de sustrato en las tres cepas de hongos entomopatógenos.

El consumo del sustrato (glucosa) se comportó de forma similar en las tres cepas, mostrando una disminución progresiva del sustrato como se muestra en la Figura 3.6 b, teniendo un mayor consumo la cepa de *I. javánica* en comparación con *B. bassiana* y *M. robertssi*. De acuerdo con la Figura 3.6 a, la cepa *B. bassiana* mostró una menor producción de biomasa con respecto a las otras cepas, esto posiblemente se debe al metabolismo que presentan cada uno de los hongos

entomopatógenos estudiados. Asimismo, la correlación que existe entre la biomasa y el sustrato es negativa y significativamente alta, debido a que conforme se consume el sustrato, la producción de biomasa aumenta en las cepas de *M. robertssi*, *B. bassiana* e *I. javánica*, siendo los valores correlacionales de -0.95, -0.89 y -0.81 respectivamente.

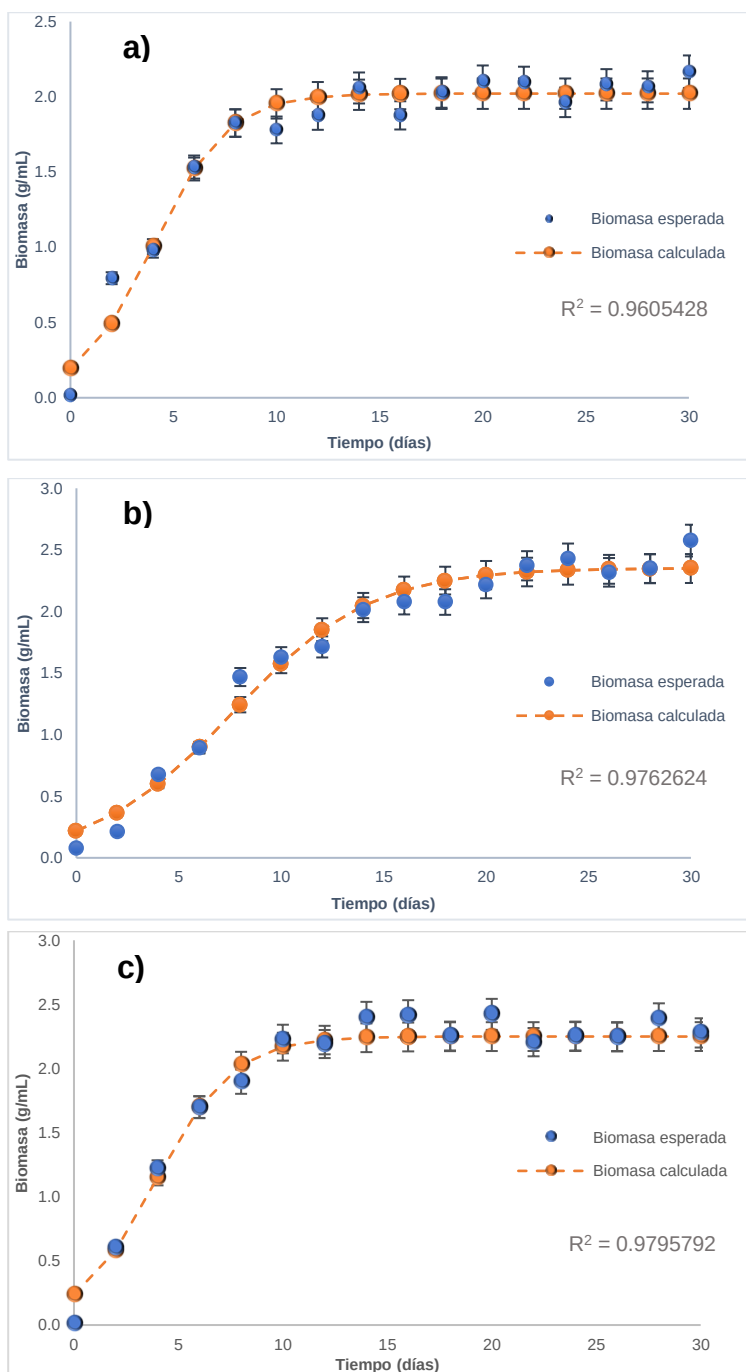


Figura 3.7. Ajuste de la cinética de crecimiento según el modelo cinético de Monod: a) *B. bassiana*, b) *M. robertssi* y c) *I. javánica*.

Asimismo, la correlación que existe entre la biomasa y el sustrato es negativa y significativamente alta, debido a que conforme se consume el sustrato, la producción de biomasa aumenta en las cepas de *M. robertssi* (-0.95), *B. bassiana* (-0.89) e *I. javánica* (-0.81).

Por otro lado, el experimento fue ajustado con respecto al modelo cinético de crecimiento de Monod, el cual describe satisfactoriamente la fase exponencial de crecimiento del proceso, como se observa en la siguiente Figura.

En los ajustes realizados con la ecuación de Monod a las cinéticas de crecimiento de las tres cepas de hongos estudiadas (Figura 3.7), se muestra que estos son adecuados al modelo matemático con respecto a los datos recolectados experimentalmente; sin embargo, la fase de adaptación de *I. javánica* y *B. bassiana* es muy corta; mientras, la cepa de *M. robertssi* (Figura 3.7 b), mostró un crecimiento más lento con respecto a las otras cepas y con ello, se observa de forma clara la fase de adaptación.

Una vez realizado el ajuste en la curva de crecimiento de cada cepa, fueron calculados los parámetros de crecimiento, como es la tasa de crecimiento específico (μ), la cual indica cuanto está creciendo el microorganismo y su afinidad por el sustrato empleado en el diseño experimental (Calderón Vargas J. F., 2017), como se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Parámetros cinéticos de crecimiento a partir del ajuste mediante el modelo de Monod.

Parámetro	Microorganismo		
	<i>B. bassiana</i>	<i>M. robertssi</i>	<i>I. javánica</i>
μ (h ⁻¹)	0.5618	0.2991	0.5456
K_s	2.0209	2.3516	2.2490
MSE (%)	0.23	0.23	0.18

De acuerdo con la Tabla 3.2 el modelo de Monod depende del sustrato presente en el medio de cultivo, por lo que al observar la tasa de crecimiento específico (μ) de las tres cepas de hongos entomopatógenos, sugiere que presentaron un crecimiento microbiano lento a través del tiempo. Por lo anterior, la cepa con un crecimiento lento fue *M. robertssi* (0.2991 h^{-1}) con respecto a las otras dos cepas.

Por otro lado, la constante de saturación de sustrato (K_s), está relacionada con la afinidad que tiene el microorganismo por el sustrato, entre mayor es el valor de K_s la afinidad del microorganismo por el sustrato disminuye (Zapata M, Hoyos R, & Quinchía B, 2005), esto se refleja en los datos experimentales, debido a que *M. robertssi* tiene un valor de $K_s = 2.3516$, lo cual hace que disminuya su afinidad por el sustrato del medio de cultivo, mientras que *I. javánica* y *B. bassiana* son más afines al sustrato, ya que los valores de K_s son 2.2490 y 2.0209, respectivamente.

Otro factor de comparación es el porcentaje de error de mínimos cuadrados (MSE), donde un valor mínimo representa una mayor convergencia de los datos, al observar este dato, podemos deducir que el ajuste realizado para las cepas *M. robertssi* y *B. bassiana* mostraron menor convergencia con respecto a la cepa de *I. javánica*.

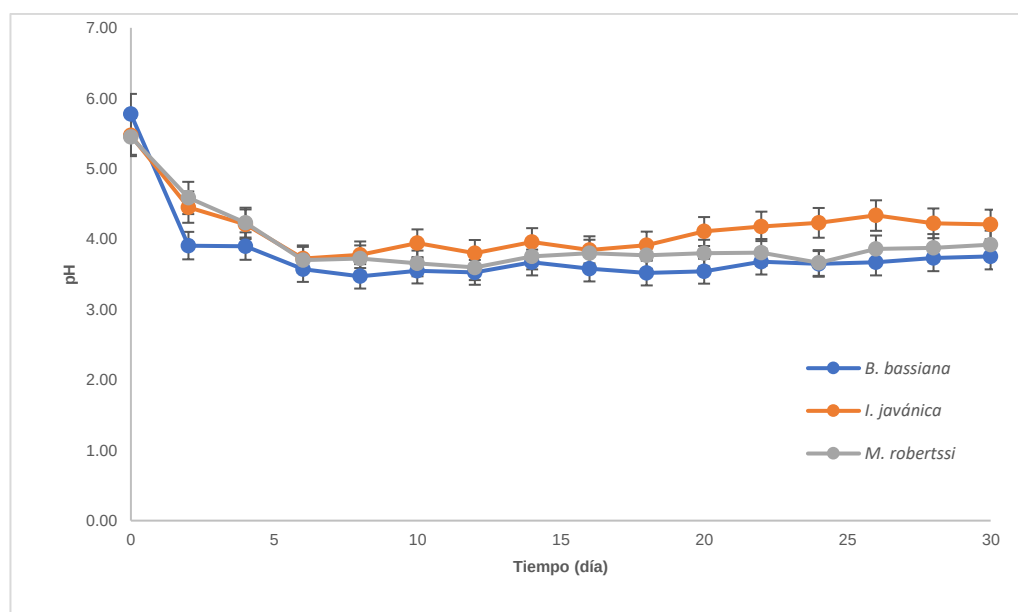


Figura 3.8. pH determinado durante la fermentación líquida.

Por otra parte, el sustrato (glucosa) presente en el medio promueve el descenso en el pH de las muestras, debido a que estos azúcares reductores son consumidos por los microorganismos, los cuales lo transforman y producen metabolitos asociados al crecimiento que disminuyen los niveles en las lecturas de pH. Los resultados mostraron que las tres cepas presentan valores de pH entre un intervalo de 3 a 6, como se observa la Figura 3.7.

Algunos autores han observado que el rango de pH para el crecimiento de *B. bassiana*, está en un intervalo de 5 a 13, tolerando un pH de 4 para la producción de conidios, mientras que a un pH 3 es tóxico para el hongo ya que inhibe la conidiación de acuerdo a la literatura (Padmavathi, Uma Devi, & Uma Maheswara , 2003). El hongo *M. robertssi* presenta un intervalo de pH de crecimiento de 3 a 9 en fermentación líquida, y una esporulación óptima a pH de 8 a 9, con una disminución de crecimiento y esporulación a pH ácido (Gao, Liu, Sun, Li, & Wang, 2009), concordando con los resultados obtenidos, ya que el crecimiento del hongo *M. robertssi* fue lento con respecto a las otras dos cepas a un pH de 3.5 a 4 (Figura 3.8), y una esporulación de alrededor 1×10^5 esporas/mL (Figura 3.9). De la misma manera esta reportado que el rango de crecimiento de *I. javánica* se encuentra de 2.2 a 6.9 en una fermentación líquida, y su pH óptimo es 5.7, durante un periodo de 7 días (Hussein, Ezzat, & Nabil, 2014), esto coincide con lo mostrado en el crecimiento realizado con la cepa, presentando un rango de pH de 3.5 a 4.5.

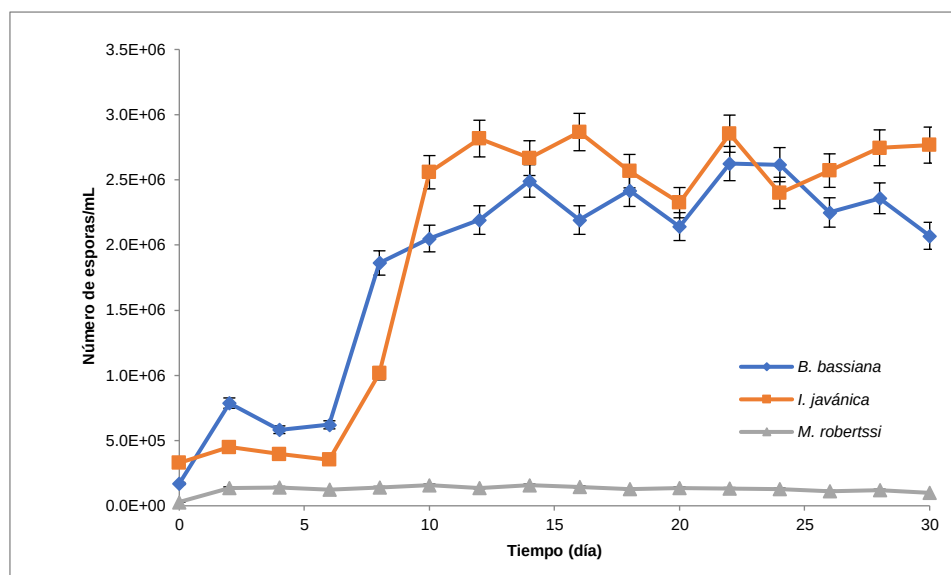


Figura 3.9. Conteo de esporas durante la fermentación líquida.

Por otra parte, durante las cinéticas de crecimiento los hongos presentaron producción de esporas o conidios, en las cuales *I. javánica* y *B. bassiana* alcanzaron un máximo a los 12 y 14 días de haber comenzado el ensayo, respectivamente; mientras que *M. robertssi* mostró menor producción de esporas, 99% menos respecto a las otras dos cepas (Figura 3.9), esto puede deberse a diversos factores como el medio de cultivo, ya que se ha demostrado que la fermentación en medio sólido es más eficiente en la generación de esporas, además de la deficiencia de sustrato que las active como es el caso de falta de quitina o sus derivados como el quitosano.

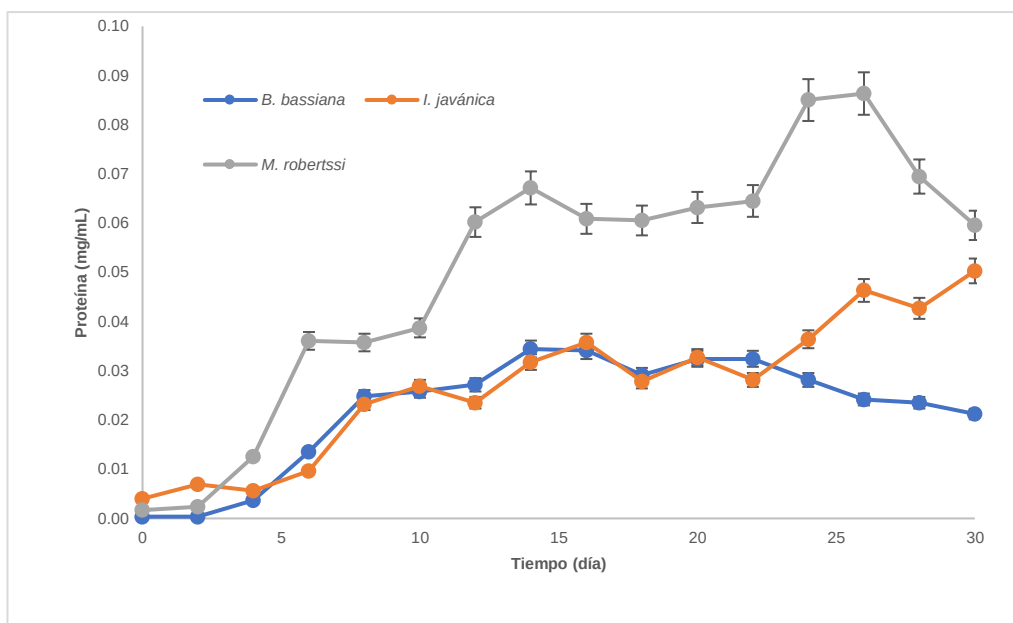


Figura 3.10. Cuantificación de proteínas durante la fermentación líquida.

Al determinar las proteínas solubles del medio de cultivo se observó que *M. robertssi* en comparación a las otras dos cepas, presenta una mayor producción de proteínas solubles a partir del día 4 de haber comenzado la cinética de crecimiento, como se observa en la Figura 3.10. La cepa *M. robertssi* produce la mayor cantidad de proteínas hasta el día 26, un 46% más que la cepa *I. javánica* y un 72% más que la cepa *B. bassiana*. Al término de la prueba de laboratorio la producción de proteínas de *M. robertssi* disminuyó hasta un 30% respecto al máximo obtenido.

Durante la determinación de la actividad quitinolítica específica en cada una de las cepas, se observó que *I. javánica* presentó mayor actividad que las demás cepas al inicio de la cinética de crecimiento, esto pudo deberse a la falta de sustrato afín a la actividad quitinolítica; es decir, la falta de quitina o sus derivados para la activación de las enzimas que provocan su degradación (Figura 3.11). La mayor actividad quitinolítica a partir del día 14 la presentó la cepa *B. bassiana* el día.

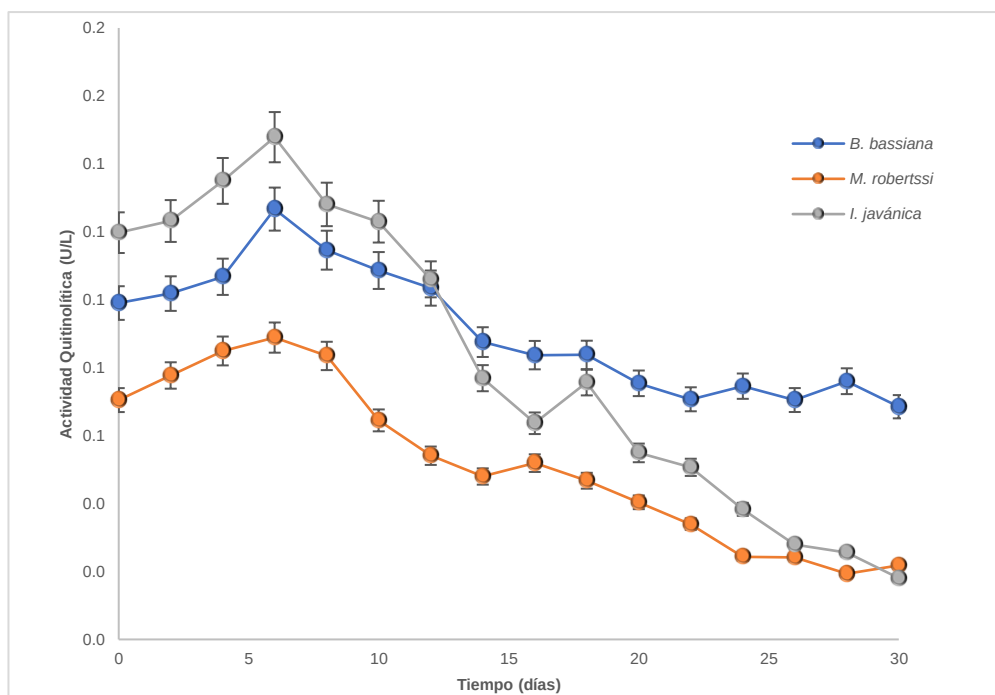


Figura 3.11. Actividad quitinolítica específica durante la fermentación líquida.

Así mismo, algunos autores mencionan que la actividad quitinolítica o quitinasa se presenta a partir de las 72 horas después del comienzo de la fermentación, lo cual concuerda con lo obtenido para *B. bassiana*, *M. robertssi* e *I. javánica*, ya que la actividad máxima en las tres cepas se consiguió en el sexto día (Petlamul & Prasertsan, 2012)

Con respecto a los parámetros de crecimiento, la cepa de *B. bassiana* presentó la mayor velocidad de crecimiento $\mu = 0.5618 \text{ h}^{-1}$ (Tabla 3.2), mientras que su tiempo de duplicación ($t_d = 1.2337 \text{ h}$) fue el menor con respecto a las otras cepas (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Parámetros de crecimiento para cada cepa de hongo estudiado.

Cepa	t_d (h)	X_{max} (g L ⁻¹)	E_{max} (U L ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g X / g S)	$Y_{e/x}$ (U / g X)	P_{ro} (U L ⁻¹ /h)
<i>I. javánica</i>	1.2704	2.249	0.1479	0.2120	0.4868	0.0370
<i>M. robertssi</i>	2.3174	2.348	0.0889	0.2985	0.1034	0.0089
<i>B. bassiana</i>	1.2337	2.020	0.1267	0.2849	0.2192	0.0158

La cepa de *I. javánica* mostró la actividad enzimática máxima $E_{max} = 0.1479$ U/L siendo esta mayor a *M. robertssi* y *B. bassiana*; así mismo, con respecto a la biomasa máxima *B. bassiana* presenta un valor de 2.020 g/L, la cual es menor en comparación a *I. javánica* y *M. robertssi*. Por otro lado, *M. robertssi* y *B. bassiana* (X_{max}) mostraron rendimientos biomasa-sustrato ($Y_{x/s}$) similares y mayores en comparación con *I. javánica*. Finalmente, los parámetros de rendimiento de enzima-sustrato ($Y_{e/s}$) y productividad máxima de actividad quitinolítica (P_{Ro}) mostraron diferencia entre las cepas de hongos, teniendo a *I. javánica* en ambos casos los valores mayores.

3.4. Pruebas de inhibición de hongos entomopatógenos con extracto de neem

En la Figura 3.12 se muestran las pruebas de inhibición de crecimiento de los hongos en presencia de extracto de neem de acuerdo al diseño de experimentos presentado en la Tabla 2.3.

En la Tabla 3.4, se muestran los resultados de la inhibición del crecimiento de cada cepa. Los resultados mostraron que las cepas de *B. bassiana* e *I. javánica* presentaron inhibición con neem en agua al 1.5% y 2% (muestras 3, 4, 11 y 12). En la cepa de *M. robertssi*, solamente existió inhibición con neem en agua al 2% (muestra 8). Por último, las pruebas de neem en aceite no presentaron efecto de inhibición con las diferentes concentraciones hacia cada cepa.

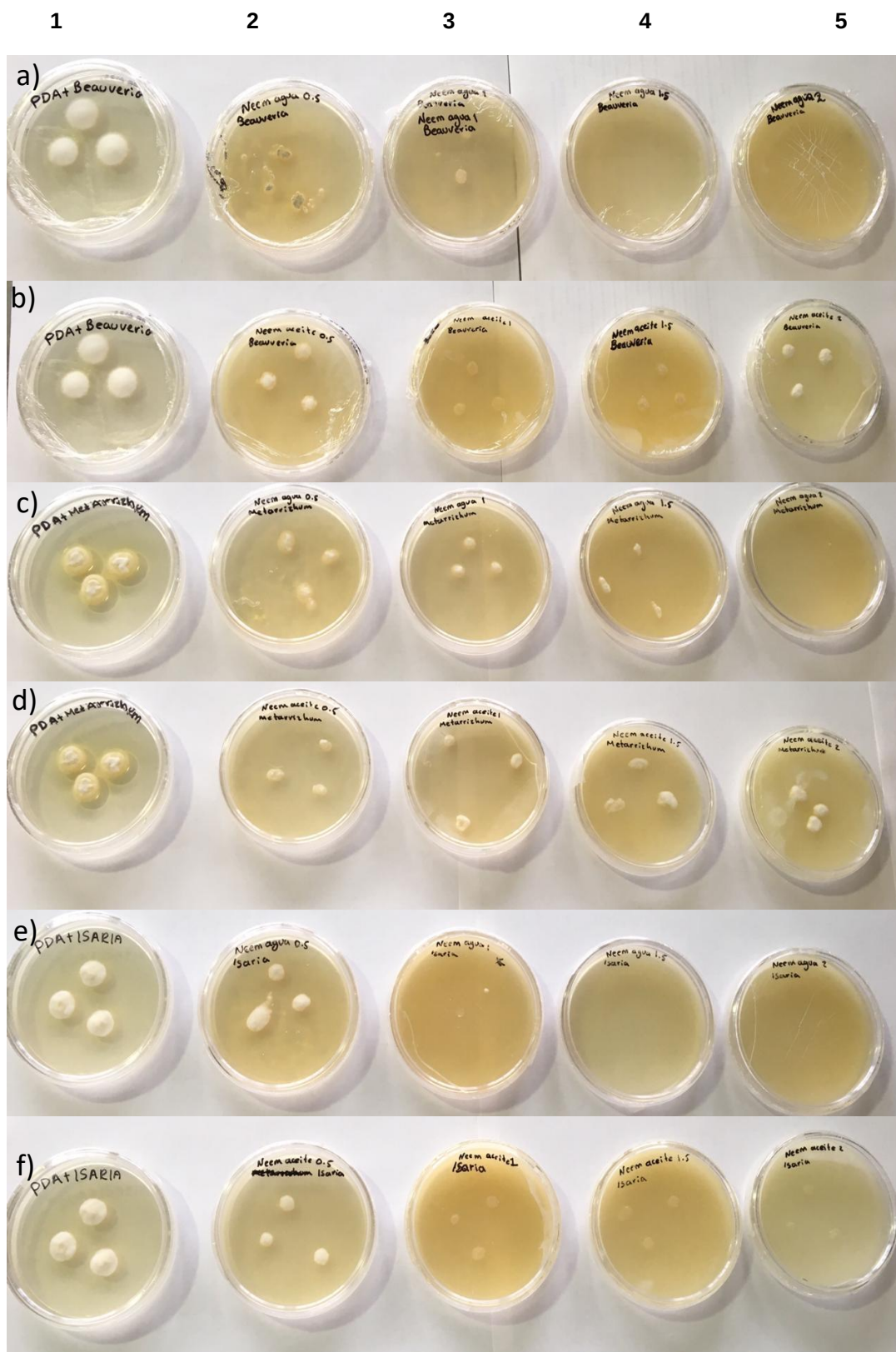


Figura 3.12. Pruebas de inhibición de los hongos por efecto del extracto de neem: a) *B. bassiana*-neem agua; b) *B. bassiana*-neem aceite; c) *M. robertsii*-neem agua; d) *M. robertsii*-neem aceite; e) *I. javanica*-neem agua; f) *I. javanica*-neem aceite.

Tabla 3.4. Crecimiento de los hongos entomopatógenos en la prueba de inhibición por neem.

Muestra	Concentración de neem (%)								Hongos Entomopatógenos		
	En agua				En aceite				<i>B. bassiana</i> (a, b)	<i>M. robertssi</i> (c, d)	<i>I. javánica</i> (e, f)
	0.5	1.0	1.5	2.0	0.5	1.0	1.5	2.0			
Testigo 1	-	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento a1,b1	-	-
Testigo 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento c1, d1	-
Testigo 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento e1, f1
1	+	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento a2	-	-
2	-	+	-	-	-	-	-	-	Crecimiento a3	-	-
3	-	-	+	-	-	-	-	-	Sin crecimiento a4	-	-
4	-	-	-	+	-	-	-	-	Sin crecimiento a5	-	-
5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento c2	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento c3	-
7	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Crecimiento c4	-
8	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Sin crecimiento c5	-
9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento e2
10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	Crecimiento e3
11	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	Sin crecimiento e4
12	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	Sin crecimiento e5
13	-	-	-	-	+	-	-	-	Crecimiento b2	-	-
14	-	-	-	-	-	+	-	-	Crecimiento b3	-	-
15	-	-	-	-	-	-	+	-	Crecimiento b4	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	+	Crecimiento b5	-	-
17	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Crecimiento d2	-
18	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Crecimiento d3	-
19	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Crecimiento d4	-
20	-	-	-	-	-	-	-	+	-	Crecimiento d5	-
21	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	Crecimiento f2
22	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	Crecimiento f3
23	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	Crecimiento f4
24	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	Crecimiento f5

3.5. Determinación del efecto de extracto de neem sobre larvas de *Conotrachelus crataegi* (picudo del tejocote)

Durante esta prueba se colocó el neem en contacto con las larvas y pupas de picudo del tejocote, las cuales se introdujeron a cajas Petri con Pet Most dejándose con

humedad constante durante 10 días mostrando daños en los insectos hasta causarles la muerte, como se muestra a continuación (Figuras 3.13 y 3.14).

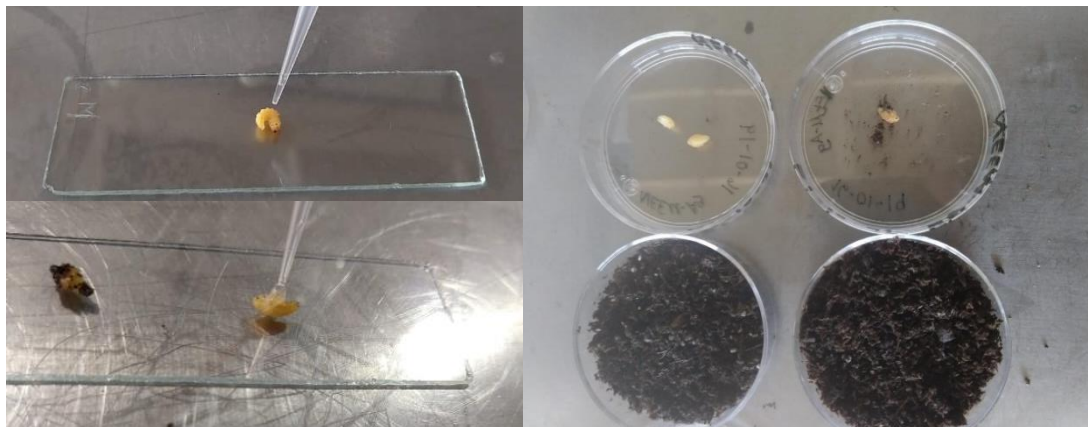


Figura 3.13. Adición por contacto del neem a larvas y pupas del picudo del tejocote.

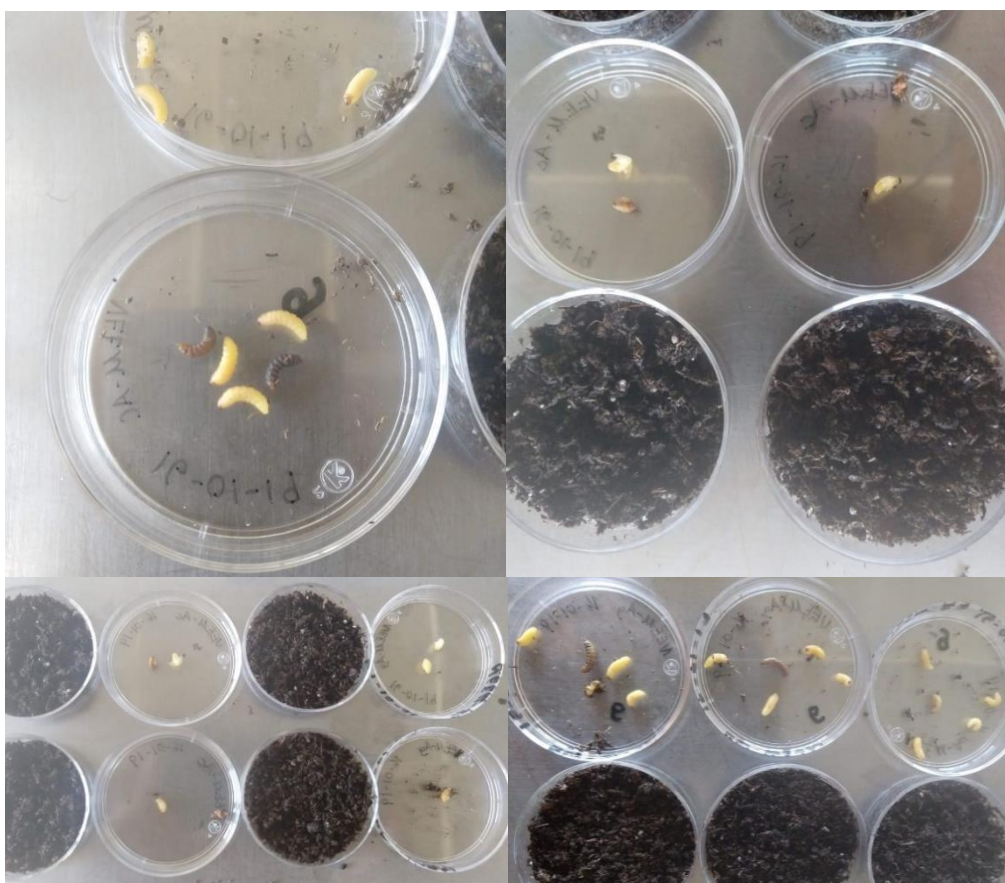


Figura 3.14. Mortandad de las larvas y pupas después de colocar los extractos de neem.

En uno de los casos de la transformación de pupa a adulto se observó que el adulto no se desarrolló de forma normal, ya que mostró oscurecimiento y movilidad deficiente (Figura 3.15), lo cual provocó que el adulto no sobreviviera después de dos días; esto concuerda con algunos autores que mencionan que la azadirachtina provoca efectos a nivel fisiológico en el insecto, ya que bloquea la síntesis y liberación de la hormona participante en la muda, provocando mudas incompletas e impidiendo que el adulto sobreviva (Pérez-López, 2012).

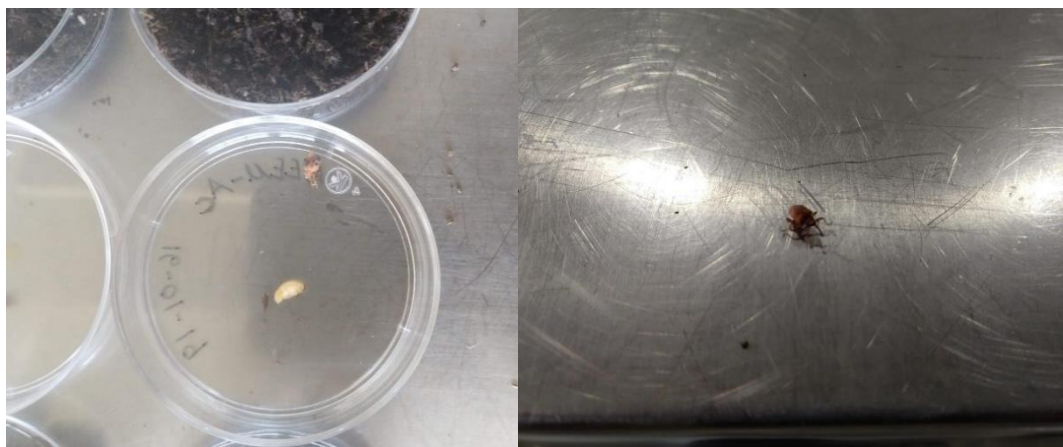


Figura 3.15. Efecto del extracto de neem, sobre pupa durante la transformación a adulto.

Los resultados preliminares muestran efecto del extracto de neem en base agua y base aceite en las larvas y en las pupas, debido a que con el contacto del neem fueron muriendo hasta alcanzar un porcentaje de mortandad del 100%. El neem base aceite mostró un tiempo más corto de mortandad en larvas y pupas (8 y 9 días, respectivamente) con respecto a las pruebas de neem en agua (9 y 10 días, respectivamente) como se muestra en la Figura 3.16.

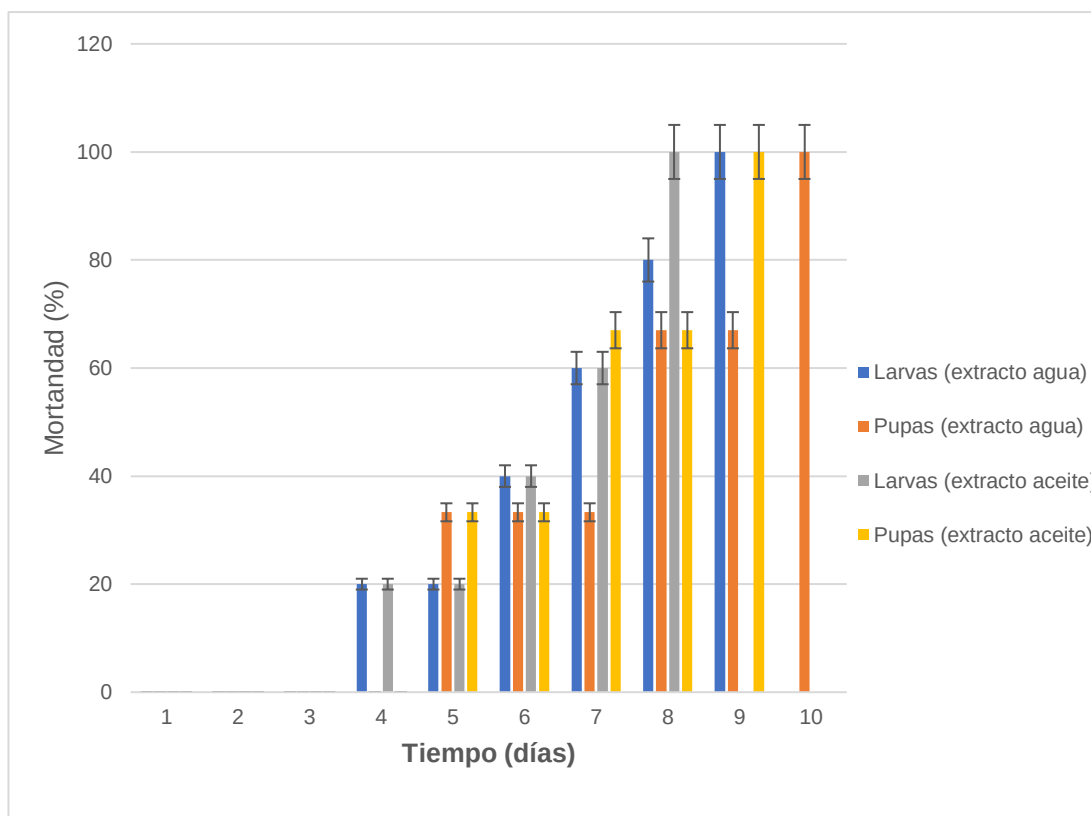


Figura 3.16. Porcentaje de mortandad de larvas y pupas de picudo del tejocote con extracto de neem base agua y base aceite, en ambos casos a una concentración de 1.5%.

Una vez realizadas las pruebas de crecimiento de los hongos e inhibición se llevó a cabo la elaboración de las perlas de quitosano-neem-esporas.

3.6. Elaboración y caracterización de perlas de quitosano-neem-esporas

La elaboración de las perlas quitosano-neem-esporas fue llevada a cabo siguiendo el método descrito para la obtención de una mezcla homogénea (ver figura 3.17) con cada uno de los componentes de acuerdo a lo presentado en la Tabla 3.5 para después realizar la determinación de la viscosidad para cada mezcla elaborada.



Figura 3.17. Preparación de mezclas para la elaboración de perlas de neem.

En las muestras se observa que la viscosidad disminuye en un promedio del 20% con respecto al testigo; este efecto se relaciona con la adición de las soluciones de esporas en Tween y al extracto de neem en agua y aceite a la mezcla de quitosano, los cuales modifican el pH provocando la alteración en la reología (viscosidad) del quitosano (Giraldo-Pedraza, 2015; Labrada-Hechavarria, Cordoví-Velázquez, Rapado-Paneque, & Rosabal-Cordoví, 2018; Prudkin & Pérez, 2016).

Tabla 3.5. Valores de viscosidad de las mezclas para la síntesis de las perlas.

Perla	μ (cP)	V (rpm)	Torque (%)	Desv. Est.
Testigo	1780	1	29.7	0.020
1	1787	1	29.8	0.035
2	1793	1	36.4	0.021
3	1494	1	24.8	0.029
4	1465	1	26.3	0.024
5	1423	1	28.3	0.019
6	1491	1	21.4	0.018
7	1405	1	26.5	0.014
8	1388	1	23.1	0.017
9	1456	1	28.2	0.019
10	1416	1	24.8	0.017
11	1314	1	22.5	0.020

Realizada la mezcla se elaboraron las perlas de quitosano mediante la utilización de tripolifosfato de sodio (TPP) como entrecruzante. Las perlas realizadas muestran homogeneidad en la esfericidad, así como en el tamaño al utilizar el TPP al 2% y el quitosano a una concentración del 4% (Figura 3.18). Además, no se observó algún rompimiento o fractura de las esferas.



Figura 3.18. Elaboración de las perlas a partir de la mezcla de quitosano.

Finalmente, se llevó a cabo el lavado de las perlas después de 24 horas de maduración, como se muestra en la Figura 3.19.



Figura 3.19. Lavado y conservación de esporas encapsuladas en perlas a base de quitosano.

Posteriormente se realizaron las mediciones de los diámetros de cada una de las perlas sintetizadas, los resultados promedio se presentan en la Tabla 3.6.

Por otra parte, el procedimiento se llevó a cabo con cada una de las cepas de hongos (*I. javánica*, *M. robertssi* y *B. bassiana*), adicionándolas en la solución de quitosano con 1.5 % de extracto de neem comercial en base agua o base aceite, según fuera la perla a sintetizar. En la Figura 3.20 se muestran las perlas obtenidas.

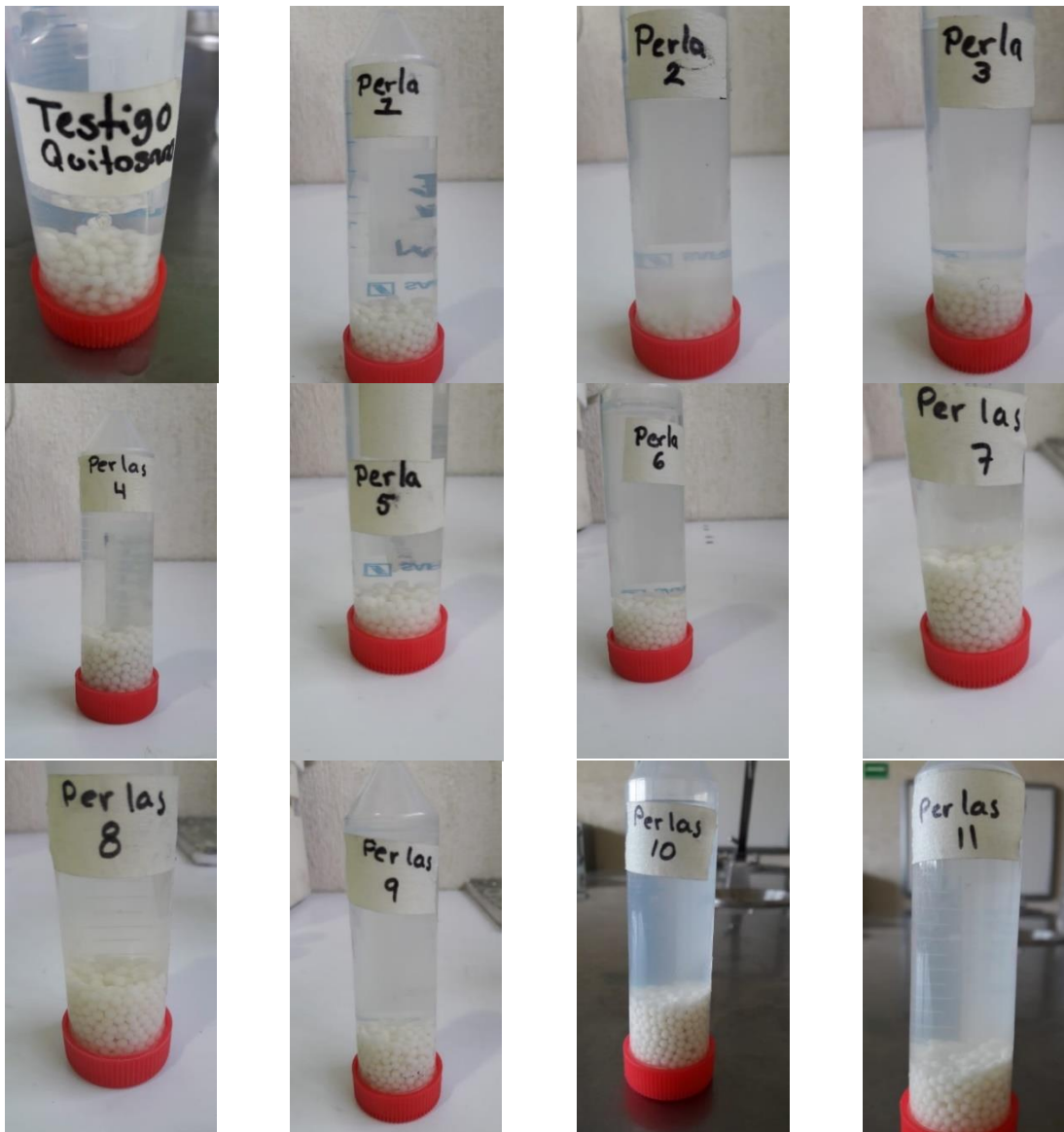


Figura 3.20. Perlas de quitosano-neem, quitosano-neem-esporas conforme al diseño experimental.

De acuerdo con los datos reportados en la Tabla 3.6, la variabilidad del diámetro de las perlas no es muy disperso, comparado con las perlas testigo, debido a que éstos se encuentran dentro del intervalo de 2.49 a 2.89 mm, con una desviación estándar promedio de los tamaños de las esferas de 0.195, siendo no variable con respecto al testigo por la dispersión de los datos, tal como se muestra en la Figura 3.21.

Tabla 3.6. Diámetros de cada una de las perlas.

Perla	Diámetro (mm)	Desv. Est.
Testigo	2.69	0.22
1	2.50	0.20
2	2.57	0.23
3	2.88	0.24
4	2.89	0.24
5	2.87	0.19
6	2.61	0.18
7	2.58	0.14
8	2.54	0.15
9	2.49	0.18
10	2.61	0.17
11	2.52	0.20

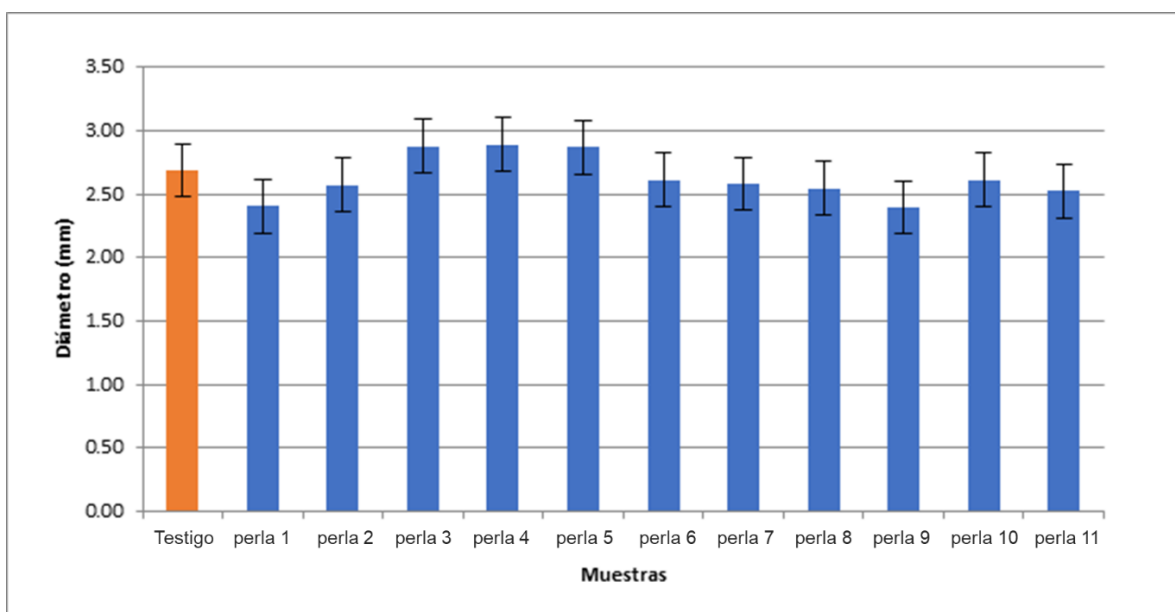


Figura 3.21. Dispersión de los tamaños de perlas elaboradas con quitosano-neem-esporas.

Por otro lado, se tiene la determinación del porcentaje de humedad de las perlas, observándose que todas presentan porcentajes superiores al 90%, siendo las perlas 2 y 4 las que tienen humedad mayor al 98%, como se puede ver en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Humedad promedio de las perlas.

Perla	% Humedad promedio	Desv. Est.
Testigo	91.91	0.24
1	92.81	0.31
2	98.10	0.19
3	91.30	0.45
4	98.76	0.38
5	90.93	0.30
6	92.37	0.39
7	92.28	0.17
8	91.94	0.27
9	90.50	0.27
10	90.44	0.25
11	90.24	0.29

Estos resultados no mostraron una desviación estándar mayor al 0.5 en todos los casos, esto no afecta la relación del contenido de humedad en las perlas, por lo que no es significativa la diferencia entre el porcentaje de humedad.

También se analizó la morfología de cada uno de los tipos de perlas mediante microscopía electrónica de barrido (Figuras 3.22, 3.23 y 3.24). Como puede observarse en la Figura 3.21 las perlas mostraron una forma esférica; sin embargo, en algunos casos se presentó una deformación mínima (perlas 2, 4, 7 y 11) o bien un aspecto ovoide (perlas 8, 9 y 10), lo anterior no guarda una relación con el contenido de las diferentes perlas. Con respecto a la morfología de la superficie externa las perlas mostraron hendiduras, en algunos casos eran aisladas (testigo y perlas 1, 2, 3, 4, 6 y 8) y en otros con gran cantidad de ellas (perlas 5, 7, 9, 10 y 11), sin embargo, esto no presenta correlación con el contenido de los materiales sintetizados y pudiera ser debido al proceso de liofilización al que tuvieron que ser sometidas las perlas para su análisis morfológico.

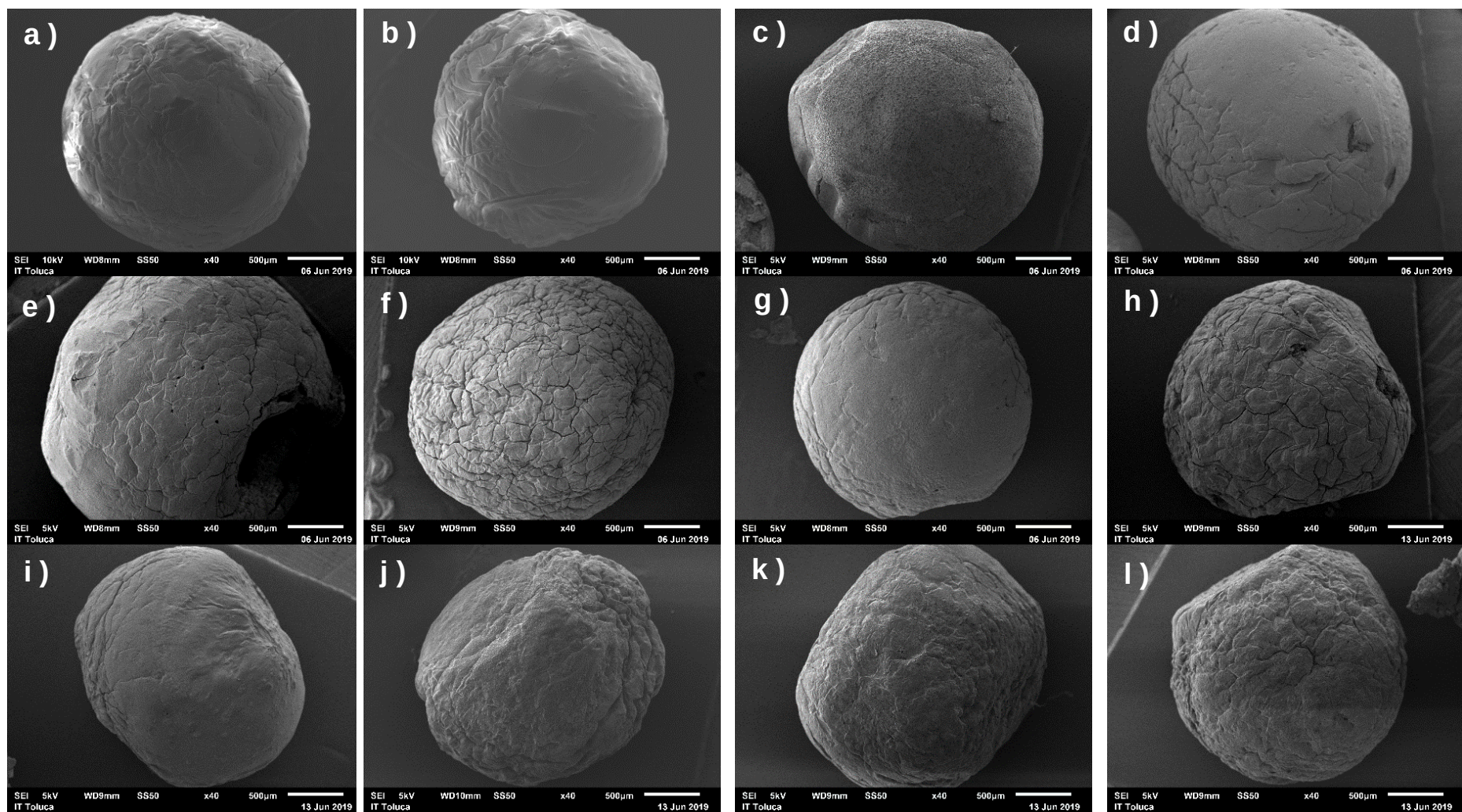


Figura 3.22. Micrografías a 40x de la superficie de las perlas quitosano-neem-esporas: a) Testigo; b) Perla 1; c) Perla 2; d) Perla 3; e) Perla 4; f) Perla 5; g) Perla 6; h) Perla 7; i) Perla 8; j) Perla 9; k) Perla 10; l) Perla 11.

Con respecto a la morfología de la superficie externa de cada una de las perlas, éstas se muestran en la Figura 3.23. Las perlas que exhiben una mayor porosidad son las 3 y 6 que contienen *B. bassiana*, sin neem y con neem en agua, respectivamente, sin embargo, la perla 9 que contiene neem en aceite no presenta una superficie semejante. Las perlas 1, 4, 5, y 7 a la 11, presentan una superficie con una rugosidad fina, que al ampliarse las micrografías dan cuenta de finos poros, semejantes a los observados en la perla testigo que sólo contiene quitosano. En las perlas 6, 7 y 10 se observan formas esféricas adheridas a la superficie que pueden ser indicativo de las esporas de *B. bassiana* (perla 6) y *M. robertssi* (perlas 7 y 10), en particular en la perla 7 se ven pequeños montículos también esféricos que parecen estar bajo la superficie.

En las imágenes correspondientes a las perlas 4, 8 y 11 se pueden apreciar pequeñas cavidades que pudieran haber sido generadas por el desprendimiento de las esporas que hubieran podido haber quedado en la superficie en el momento de la síntesis. Especial morfología se observa en la superficie de la perla 2 que contiene neem en aceite en la matriz de quitosano, las partículas adheridas pudieran ser parte del aceite que alcanzó a homogeneizarse con la matriz en el momento de la síntesis.

En la Figura 3.24 se observa la magnificación a 3500x de la superficie interna de las perlas fraccionadas, donde se puede ver que todas las perlas son porosas con características diversas, como redes o mallas semejantes a una estructura osea, donde se pueden apreciar cavernas y túbulos.

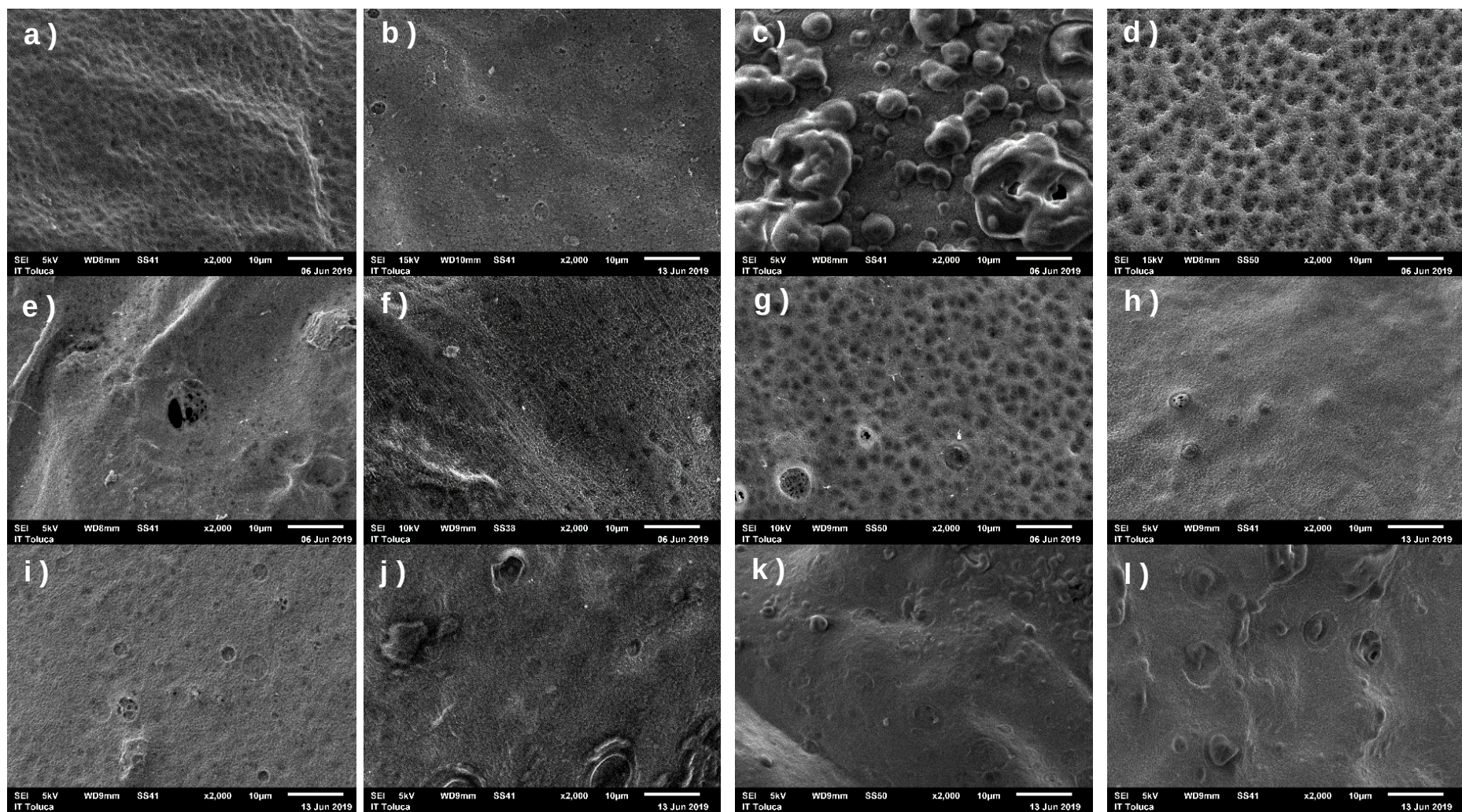


Figura 3.23. Micrografías a 2000x de la superficie de las perlas quitosano-neem-esporas: a) Testigo; b) perla 1; c) perla 2; d) perla 3; e) perla 4; f) perla 5; g) perla 6; h) perla 7; i) perla 8; j) perla 9; k) perla 10; l) perla 11.

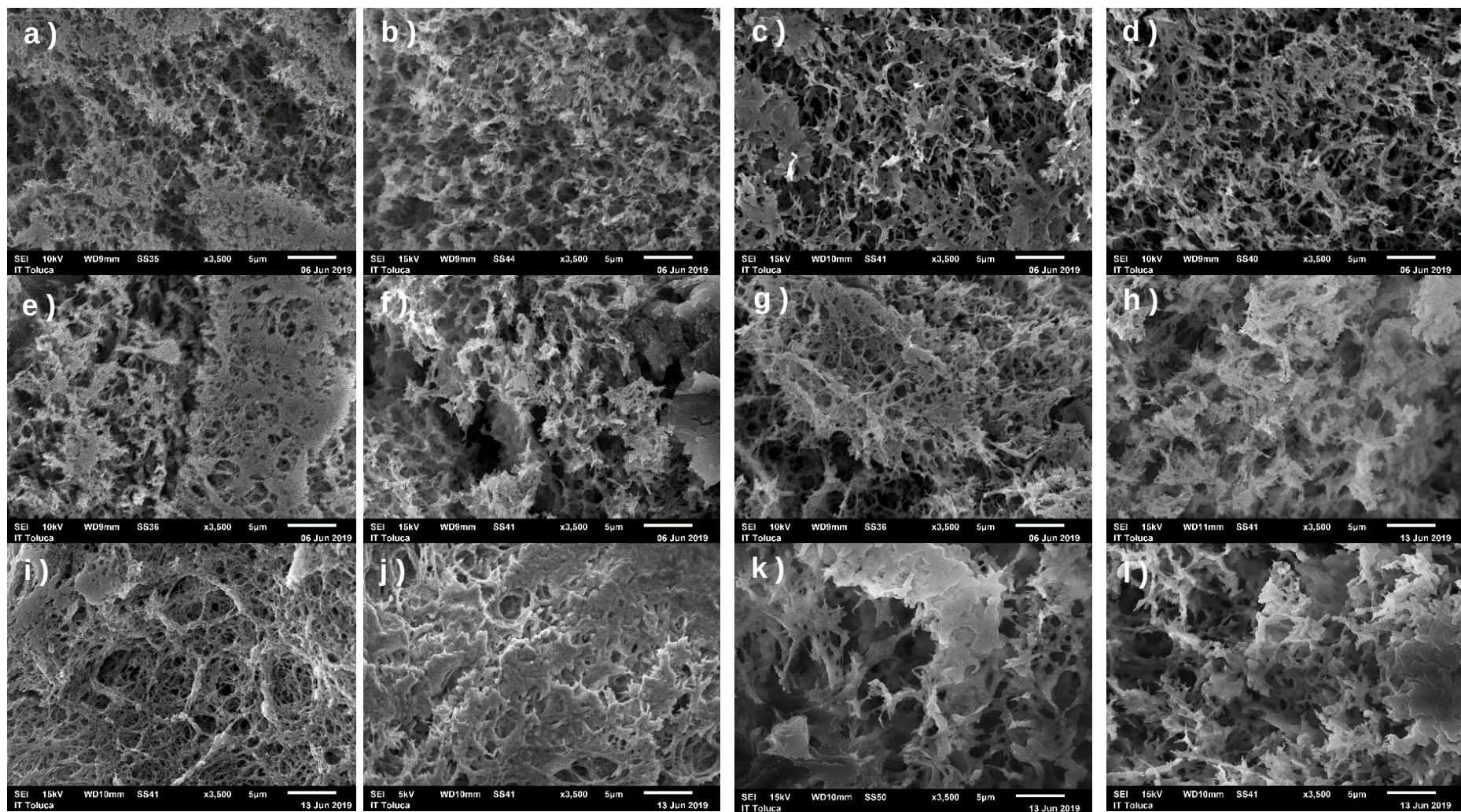


Figura 3.24. Micrografías a 3500x de las perlas fraccionadas de quitosano-neem-esporas: a) Testigo; b) perla 1; c) perla 2; d) perla 3; e) perla 4; f) perla 5; g) perla 6; h) perla 7; i) perla 8; j) perla 9; k) perla 10; l) perla 11.

Por otro lado, fueron realizadas las cinéticas de hinchamiento de las perlas y ajustadas a modelos matemáticos de primer y segundo orden como se muestra en las siguientes tablas:

Tabla 3.8. Ajustes con el modelo de primer orden de la cinética de hinchamiento de las perlas sintetizadas

Muestra	W_{∞}	k	R^2	Chi-Sqr
Testigo	0.632620	0.73651	0.97683	7.28E-04
1	0.631160	0.89146	0.99419	1.79E-04
2	0.635650	0.93930	0.99698	9.41E-05
3	0.684730	1.03038	0.99875	4.52E-05
4	0.667360	0.90848	0.99804	6.73E-05
5	0.647990	0.92563	0.99311	2.24E-04
6	0.626830	0.93736	0.99603	1.20E-04
7	0.623960	1.00813	0.99420	1.75E-04
8	0.614520	0.92019	0.99462	1.57E-04
9	0.641050	0.95537	0.99280	2.29E-04
10	0.649130	0.94973	0.99198	2.62E-04
11	0.623720	0.80736	0.99134	2.61E-04

Tabla 3.9. Ajustes con el modelo de segundo orden de la cinética de hinchamiento de las perlas sintetizadas

Muestra	W_{∞}	k	R^2	Chi-Sqr
Testigo	0.654770	2.65987	0.98913	3.42E-04
1	0.643900	4.74278	0.99835	5.07E-05
2	0.645740	5.93387	0.99925	2.35E-05
3	0.692550	7.65708	0.99985	5.47E-06
4	0.677740	5.60120	0.99975	8.51E-06
5	0.660900	4.78650	0.99750	8.13E-05
6	0.637390	5.72565	0.99880	3.65E-05
7	0.634190	6.17635	0.99732	8.07E-05
8	0.625990	5.30507	0.99821	5.22E-05
9	0.653170	5.15825	0.99685	1.00E-04
10	0.662040	4.86027	0.99656	1.12E-04
11	0.639440	3.75259	0.99739	7.85E-05

De acuerdo a las Tablas 3.8 y 3.9, el modelo de segundo orden de la cinética de hinchamiento mostró un coeficiente de determinación ligeramente mayor con respecto al modelo de primer orden, aunque no existe un cambio significativo en el ajuste de las cinéticas de hinchamiento, por lo cual fue realizada la prueba de chi-cuadrado para determinar si existe una diferencia significativa entre los valores reales de las cinéticas de hinchamiento y el ajuste con los modelos de primer y segundo orden teóricos. Los resultados de la perla mostraron un mejor ajuste de las

cinéticas de hinchamiento con el modelo de segundo orden, ya que existe un mayor error (Chi-Sqr) con el modelo de primer orden, por lo que podemos mencionar que existe una relación entre el modelo de las perlas con respecto al tiempo.

Con respecto a lo anterior, la variable W^∞ en el modelo de segundo orden mostró que la perla 3 presenta el valor de hinchamiento al equilibrio mayor, representando un mayor grado de entrecruzamiento del quitosano en comparación al testigo y demás perlas (Ostrowska-Czubenko, Gierszewska, & Pieróg, 2015); mientras que la velocidad de hinchamiento k en la perla 3 mostró el valor de 7.65708 h^{-1} , esto representa que llega a un hinchamiento máximo en un menor tiempo; este comportamiento del quitosano podría ser a un cambio estructural en la molécula, ya que algunos autores han reportado que el acoplamiento de algunos grupos funcionales en la cadena principal del biopolímero puede mejorar sus propiedades fisicoquímicas como la solubilidad y así generar algunas características sinérgicas interesantes (Carrero Gallardo, Cardoso Barbosa, Lia Fook, & Sabino, 2019).

3.7. Virulencia de perlas de quitosano-neem-esporas con *Tenebrio molitor*

De acuerdo a los resultados mostrados en las pruebas de inhibición de los hongos por efecto del extracto de neem (apartado 3.4), el efecto de neem sobre las larvas del picudo (apartado 3.5) y tomando en cuenta que las larvas de picudo son recolectadas cada año, se realizó la selección de las perlas para la prueba de virulencia, donde *B. bassiana*, *M. robertssi* mostraron menor inhibición con el neem, además el neem en aceite tuvo un efecto de mortandad más rápida sobre las larvas de picudo, por lo que decidió seleccionarlas para esta prueba, así mismo como el picudo del tejocote solo se recolecta cada año, se optó por tomar a *T. molitor* como modelo experimental o vector de prueba, debido a que es un invertebrado de fácil acceso y económico, se conoce su ciclo de vida, además es sensibles a diferentes pruebas de toxicidad, ensayos de infección, respuesta inmune a patógenos, eficacia de antibióticos entre otros. Por lo anterior, *I. javánica* no fue considerada, así también el neem en agua.

Por lo anterior, las perlas utilizadas para el siguiente ensayo fueron el Testigo, perla 2, perla 3, perla 4, perla 9 y perla 10. En la Figura 3.25, se muestra la curva de mortandad de las larvas de *T. molitor* en el ensayo.

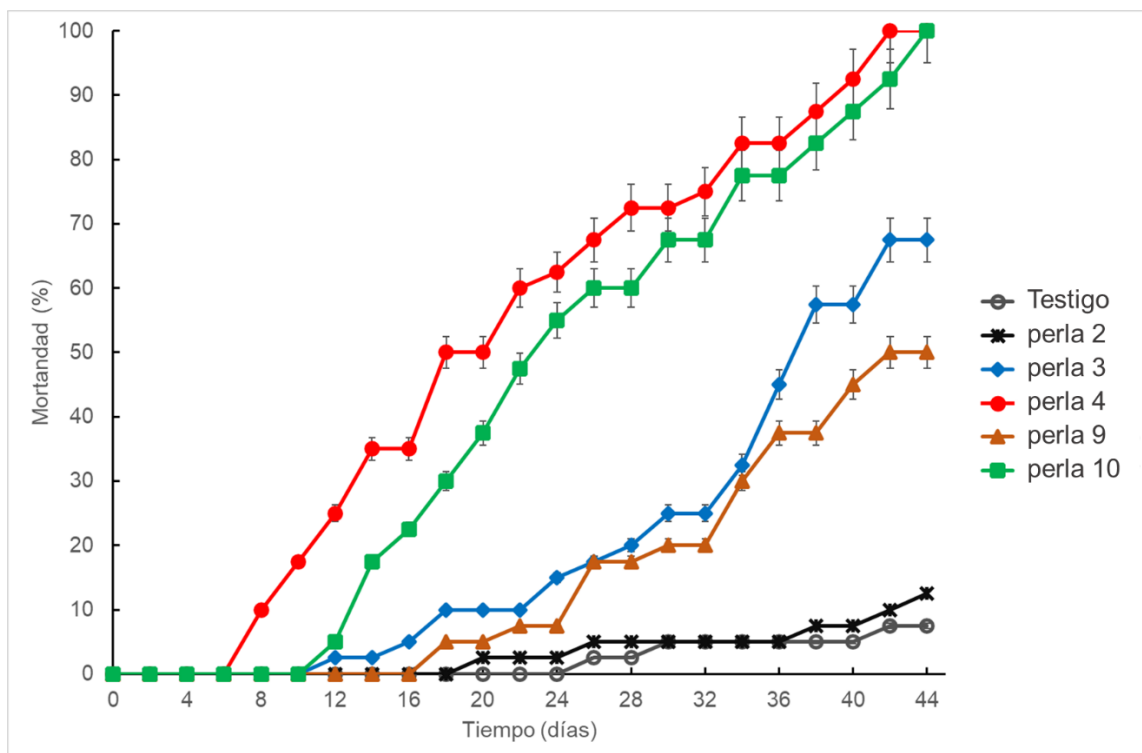


Figura 3.25. Mortandad de *T. molitor* con perlas de quitosano-neem-esporas.

Los resultados mostraron que la perla 4 infectó el 10% de las larvas en el día 8 mientras que la perla 10 para el día 12 había infectado el 4% de las larvas, sin embargo, en estos dos casos para el día 34, la infección de las larvas fue mayor al 75%, esto demuestra que las perlas de quitosano mantuvieron la actividad biológica de las esporas, generando una virulencia mayor en *T. molitor* en comparación a las perlas 4 y 10. Por otra parte, las perlas 3 y 9 mostraron una infección más lenta de las larvas, ya que para el día 34 alrededor del 30% de las larvas presentaban infección, por lo que se comprueba que *M. robertsii*, tiene una mayor capacidad de virulencia en comparación de *B. bassiana*.

Por otro lado, la infección de *B. bassiana* hacia las larvas de *T. molitor* fue gradual, ya que infectó y germinó dentro de la larva provocando el crecimiento en diferentes partes del insecto hasta la invasión total, como se observa en la Figura 3.26; este efecto se presentó en ambas perlas de *B. bassiana*, es decir en perlas 3 y 9.

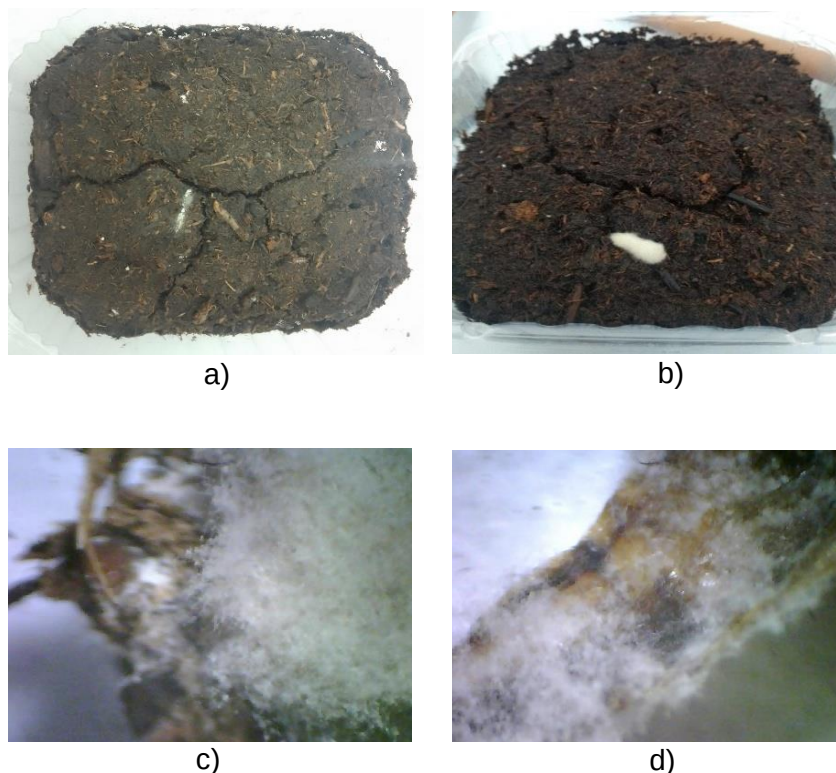


Figura 3.26. Germinación de *B. bassiana* en *T. molitor*: a) perla 3; b) perla 9; c) *T. molitor* con perla 3 a 80x; d) *T. molitor* con perla 9 a 80x.

Así mismo, *T. molitor* infectado con las perlas 4 y 10, muestra como cumple con su ciclo biológico en su fase infectiva, después de la introducción al interior del insecto se propaga hasta invadir por completo al exterior de la larva donde el hongo entomopatógeno utiliza los nutrientes del cadáver (Khachatourians & Qazi, 2008) como se muestran en la Figura 3.27.



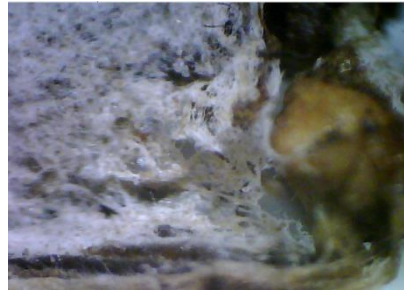
a)



b)



c)



d)

Figura 3.27. Germinación de *M. robertsii* en *T. molitor*: a) perla 4; b) perla 10; c) *T. molitor* con perla 4 a 80x; d) *T. molitor* con perla 10 a 80x.

CONCLUSIONES

En este trabajo de investigación se demostró que, durante la fermentación líquida, la cepa *Beauveria bassiana* alcanzó una menor producción de biomasa a lo largo de los 30 días de la cinética de crecimiento, en comparación con las cepas de *Metarhizium robertsii* e *Isaria javanica*. El pH de crecimiento de las tres especies se mantuvo en un intervalo de 3 a 5. Asimismo, al comparar la producción de biomasa con la de esporas o conidios, se observó que *I. javanica* y *B. bassiana* presentaron una mayor conidiación a partir de los días 12 y 14, respectivamente.

Por otro lado, la prueba de inhibición de los hongos entomopatógenos con extractos de neem mostró que el extracto acuoso inhibió al 100% el crecimiento y la propagación de los hongos a concentraciones de 1, 1.5 y 2% durante todo el tiempo que duró la prueba. En contraste, el extracto de neem en base aceite permitió el crecimiento fúngico en todas las concentraciones evaluadas.

En la prueba de inhibición del crecimiento de larvas de *Conotrachelus crataegi* (picudo del tejocote), el extracto de neem base aceite mostró un mejor efecto insecticida, ya que las larvas y pupas murieron entre los 8 y 9 días de contacto, es decir, en un tiempo más corto respecto al extracto acuoso. Además, se observaron alteraciones estructurales en las larvas y pupas durante la exposición a ambos tipos de extractos, que finalmente condujeron a su muerte.

En cuanto a la elaboración de las perlas, las soluciones precursoras mostraron que la viscosidad se incrementó al incorporar el extracto de neem acuoso (0.39%) y el extracto en aceite (0.73%), registrándose un incremento menor al 1% respecto al testigo (quitosano). Asimismo, las soluciones precursoras de las perlas adicionadas con las esporas de hongos mostraron una disminución de la viscosidad aproximadamente del 20% en comparación al testigo.

Las perlas fueron elaboradas con quitosano en solución de tripolifosfato de sodio. Se observó que el porcentaje de humedad en las perlas con los diferentes

tratamientos no presentó variaciones significativas respecto al testigo. De igual forma, los diámetros de los distintos tipos de perlas mostraron homogeneidad, sin dispersión notable en los datos obtenidos.

El estudio morfológico evidenció que todas las perlas presentaron características similares de porosidad, lo cual permitiría una liberación controlada del extracto de neem, además de mantener la viabilidad de las esporas de los hongos entomopatógenos para una posible virulencia hacia insectos plaga. Esto se confirmó mediante las pruebas con el vector *Tenebrio molitor*, en las cuales se observó una mayor virulencia del hongo *M. robertsii*: al día 34 se alcanzó más del 75% de mortalidad larval, y para el día 44 se obtuvo un 100% de infección. Por su parte, *B. bassiana* también mostró resultados favorables, aunque en un periodo más prolongado, atribuible a su crecimiento más lento.

Asimismo, la cinética de hinchamiento indicó que las perlas alcanzaron su máximo ex en un tiempo relativamente corto, de acuerdo con el ajuste obtenido mediante el modelo de segundo orden.

Finalmente, este trabajo se centró en una tecnología basada en la encapsulación de esporas y extracto de neem, la cual podría convertirse en una alternativa viable para el control biológico de plagas en cultivos agrícolas. Su aplicación permitiría reducir el uso de plaguicidas de síntesis química, contribuyendo así a la protección del medio ambiente y al impulso de un desarrollo sostenible y sustentable en las comunidades agrícolas de nuestro país.

;

RECOMENDACIONES

La presente investigación constituye una propuesta que podría beneficiar directamente a los agricultores en campo. Por ello, sería importante dar seguimiento a la aplicación de los encapsulados de quitosano–neem–esporas en diferentes plagas en su estado larvario *in situ*, con el propósito de mejorar los cultivos agrícolas mediante la disminución o eliminación de las plagas. Asimismo, se recomienda continuar con los ensayos enfocados en las larvas del picudo del tejocote, ya que esta propuesta representa una alternativa viable para el control biológico de plagas mediante el uso de hongos entomopatógenos.

FUENTES CONSULTADAS

- Acuña Jiménez, M., García Gutiérrez, C., Rosas García, N., López Meyer, M., & Saíz Hernández, J. C. (2015). Formulación de *Metarrhizium anisopliae* (Metschnikoff) sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *Heliothis virescens* (fabricius). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31(3), 219–226.
- Adamski, Z., Bufo, S. A., Chowański, S., Falabella, P., Lub, J., Marciniak, P., . . . Rosiński, G. (2019). Beetles as Model Organisms in Physiological, Biomedical and Environmental Studies - A Review. *Frontiers in Physiology*, 10, 1-22. doi:10.3389/fphys.2019.00319
- Altieri, M. A., Koohafkan, P., & Holt Gimenez, E. (2012). Agricultura verde: fundamentos agroecologicos para diseñar sistemas agrícolas biodiversos, resilientes y productivos. *Agroecología*(7), 7-18.
- Arellano-Aguilar, O., Ponce de León Hill, C., Rendón von Osten, J., González-Jauregui, M., Memije-Canepa, M., Dzul-Martínez, R., & Mercado, R. (2016). *La huella de los plaguicidas en México*. Campeche: Greenpeace México A.C.
- Arriola Santo, J. F. (Noviembre de 2013). Tesis: Evaluación de tres insecticidas a base de Neem sobre el manejo de adultos de Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*; Aleyrodidae) en pepino; aldea las tunas, Salamá . Guatemala de la asusnción, Guatemala: Universidad Rafael Landivar.
- Ávila Núñez, R., Rivas Pérez, B., Hernández Motzezak, R., & Chirinos, M. (2012). Contenido de azúcares totales, reductores y no reductores en *Agave cocui* Trelease. *Multiciencias*, 12(2), 129-135.
- Badii, M. H., Landeros, J., & Cerna, E. (2010). Population regulation of pest mites of agricultural significance. *International Journal of Good Coscience*, 270-302.
- Bio-rad. (2020). Bio-rad Protein Assay. Estados Unidos. Obtenido de <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT33.pdf>

- Calderón Vargas, J. F. (2017). Calderón Vargas, J. F. (2017). Tesis: Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. Departamento de Ingenierías. Ingeniería Química.
- Calderón Vargas, J. F. (2017). Tesis: Ajuste de un modelo cinético para el crecimiento de *Lactobacillus acidophilus* en la fermentación de un sustrato complejo. Bogotá, Colombia: Fundación Universidad de América. Facultad de Ingenierías. Departamento de Ingeniería Química.
- Camacho Kurmen, J. E., Lancheros Díaz, A. G., & Guzmán Luna, C. (2024). *Modelos matemáticos y parámetros cinéticos de crecimiento de la microalga Haematococcus pluvialis*. Santa Bárbara del Zulia, Estado Zulia, Venezuela: Fondo Editorial de la Universidad Nacional Experimental Sur del Lago Jesús María Semprúm (UNESUR).
- Carrero Gallardo, M., Cardoso Barbosa, R., Lia Fook, M. V., & Sabino, M. A. (2019). Síntesis y caracterización de un novedoso biomaterial a base de quitosano modificado con aminoácidos. *Revista Matéria*, 23(4), 1-17. doi:10.1590/S1517-707620190003.0710
- Carr-Espinoza, L. A. (2015). Utilización del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* para el control de garrapatas (*Ixodes ricinus*) en hatos ganaderos de la zona de Pueblo Viejo. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Casas, D. (04 de 10 de 2015). *La Crónica Diaria S.A. de C.V.* Recuperado el 07 de 12 de 2018, de El problema de plagas en México provoca casi el 30% de pérdidas de maíz: <http://www.cronica.com.mx/notas/2015/923641.html>
- Castiglioni, E., Djair Vendramim, J., & Batista Alves, S. (2003). Compatibilidad de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con Nimkol-L para el combate de *Heterotermes tenius*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*(69), 38-44.

- Caycedo Lozano, L., Corrales Ramírez, L. C., & Trujillo Suárez, D. M. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova*, 19(36), 49-94. doi: <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Cayré, M. E., Vignolo, G. M., & Garro, O. A. (2007). Selección de un Modelo Primario para Describir la Curva de Crecimiento de Bacterias Lácticas y *Brochothrix thermosphacta* sobre Emulsiones Cárnicas Cocidas. *Información Tecnológica*, 18(3), 23-29. doi: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642007000300004>
- Ceceña-Durán, C., González-Mendoza, D., Grimaldo-Juárez, O., Ruvalcaba Sandoval, P., Tzintzun Camacho, O., & Durán-Hernández, D. (2017). Eficacia de entomopatógenos en el control de mosca blanca en el algodónero DDR 014: *Bemisia argentifolli*, Bellows and Perring. *Agriculture and Food Sciences*, 1-68. doi:<https://doi.org/10.3926/oms.366>
- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2008). Plant extracts used as biocontrol with emphasis on Piperaceae family. A review. *Agromía Colombiana*, 26(1), 97-106.
- Cortés Ortega, J. A. (2013). Hidrogeles microestructurados de acrilamida y determinacion de su capacidad de absorber agua y etanol. *Quim. Nova*, 758-758.
- Córtés-Ortega, J. A. (2013). Hidrogeles microestructurados de acrilamida y determinación de su capacidad de absorber agua y etanol. *Quim. Nova*, 36(6), 757–761. *Quim Nova*, 36(6), 757-761.
- Cortés-Sánchez, A. D., & Mosqueda-Olivares, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 12(2), 64-90. Obtenido de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86328550002>
- Del Puerto-Rodríguez, A. M., Suárez-Tamayo, S., & Palacio-Estrada, D. E. (2014). Effects of pesticides on health and the environment. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 52(3), 372-387.

- Delgado Salazar, M. A. (2009). Tesis: Utilización de Espectroscopía de Reflectancia en el Infrarrojo Cercano (NIRS), para la predicción del contenido de almidón en 18 variedades de papa nativa (*Solanum tuberosum* – ssp. *tuberosum*). Valdivia, Chile: Univers. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile, Escuela de Ingeniería de Alimentos.
- Delgado, S., & Castillo, D. (2019). Influencia de la temperatura en el crecimiento de un consorcio microbiano y su capacidad biooxidativa sobre el hierro de la calcopirita. *Ecología Aplicada*, 85-90.
- Devine, G. J., Eza, D., Oguzuko, E., & Furlong, M. J. (2008). Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista de Peruana de Medicina Experimental y Salud publica*, 25(1), 74-100.
- Espinel-Correal, C., Torres-Torres, L. A., Villamizar-Rivero, L. F., Bustillo-Pardey, A. E., Zuluaga-Mogollón, M. V., & Costes-Prado, A. M. (2018). Entomopathogenic fungi in insect pests biological control. En A. M. Cotes , *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros* (págs. 334-367). Bogota, Colombia: AGROSAVIA.
- Estrada, J., López, M. T., Castillo, B. Z., & Puig, N. (2007). Bioinsecticida de Nim en la agricultura urbana. *Agricultura Orgánica*, 44-45.
- Fang, Q.-H., & Zhong, J.-J. (2002). Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 37(7), 769-774. doi:[https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00278-3](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00278-3)
- Fenice, M., Sermani, G. G., Federici, F., & D'Annibale, A. (2003). Submerged and solid-state production of laccase and Mn-peroxidase by *panus tigrinus* on olive oil mill wastewater-based media. *Journal of Biotechnology*, 77-85.
- Flores-Macías, A., Pucheta-Díaz, M., Ramos-López, M. A., Rodríguez-Navarro, S., Ramos-Espinosa, G., & Juárez-Ruiz, D. (2013). Estudio del hongo entomopatógeno *Isaria fumosorosea* como control microbiológico de la mosquita blanca *Bemisia tabaci*. *Interciencia*, 523-527.

- Gallou, A., Serna-Dominguez, M. G., Berlanga-padilla , A. M., Ayala-Zermeño, M. A., Melliín-Rosas, M. A., Montesinos-Matías, R., & Arredondo-Bernal, H. C. (2016). Species clarification of *Isaria* isolates used as biocontrol agents against *Diaphorina citri* (Hemiptera: Liviidae) in Mexico. *Fungal Biology*, 414-423.
- Gamboa-Delgado, J., Márquez-Reyes, J. M., & Godínez-Siordia, D. E. (2025). Producción masiva de microorganismos para la obtención de proteína sustentable con alto valor biológico. *Ciencia ergo sum*, 30(3). doi:<https://doi.org/10.30878/ces.v30n3a11>
- Gao, L., Liu, X. Z., Sun, M. H., Li, S. D., & Wang, J. L. (2009). Use of a novel two-stage cultivation method to determine the effects of environmental factors on the growth and sporulation of several biocontrol fungi. *Mycoscience*, 317-321.
- Gaona Garcia, G., Ruiz Cancino , E., & Peña Martínez, R. (2000). Los pulgones (Homoptera:Aphididae) y sus enemigos naturales en la naranj, *Citrus sinensis* L. en la zona centro de Tamaulipas, México. *Acta Zoologica Mexicana*, 1-12.
- García Cruz, J. C. (2009). *Cinetica de hinchamiento de hidrogeles de hidroxipropil celulosa y poli(acrilato)*. Cd. Madero, Tam, Mex.
- Garcia Cruz, J. C. (Junio de 2009). Tesis: Cinética de hinchamiento de hidrogeles de hidroxipropilcelulosa y poli(acrilatos). *Tesis*. Madero, Tamaulipas, México: Instituto Tecnológico Cd. Madero.
- García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Meza, G. D. (2012). Environmental problems and risk for the use pesticides in Sinaloa. *Ra Ximhai*, 8(10), 1-10.
- Gim-Pao, L., & Muhammad Syarhabil, A. (2018). Preparation and Characterization of Ca-alginate-chitosan Capsules for Controlled Release of Imidacloprid as Larvaecide Delivery System. *Proceedings of the 2018 8th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics* (págs. 80-83). Tokio: ACM.

- Giraldo-Pedraza, J. (2015). Propiedades, Obtención, Caracterización y Aplicaciones Del Quitosano.
- Gómez Ayala, S. L., & Yory Sanabria, F. L. (2018). Aprovechamiento de recursos renovables en la obtención de nuevos materiales. *Ingenierías USBMed*, 9(1), 69-74.
- González-Castillo, M., Aguilar, C. N., & Rodríguez-Herrera, R. (2012). Control Insectos-Plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: Retos y perspectivas. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, 4(8), 42-55.
- Granados-López, L. I., Torres-Granados, A. K., Zepeda-Batista, A., Islas-Rodríguez, O. A., Rodríguez Aco, R. S., & Martínez-Sánchez, M. F. (2025). Cría eficiente de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae): protocolo reproducible con dieta vegetal para aplicaciones biotecnológicas y nutricionales. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, 12, 67-73. doi:<https://doi.org/10.29057/icap.v12iEspecial.15430>
- Gutiérrez-Castorena, E. V., Gutiérrez-Castorena, M., & Ortiz-Solorio, C. (2015). Integrated nutrient management in intensive agricultural systems: a review. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(1), 201-215.
- Hernández-Cocoletza, H., Aguilar-Almazán, E., Flores-Agustin, O., Viveros-Nava, E. L., & Ramos-Casellis, E. (2009). Obtención y caracterización de quitosano a partir del exoesqueleto de camarón. *Superficies y Vacío*, 57-60.
- Hirose, E., Neves, P. M., Zequis, J. A., Martins, L. H., Peralta, C. H., & Moino Jr, A. (2001). Effect of Biofertilizers and Neem Oil on the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 419-423.
- Hussein, R. H., Ezzat, S., & Nabil, H. (2014). Hussein, R. H., Ezzat, S., & Nabil, H. (2014). Effects of some abiotic factors on micelial growth rates of *Isaria fumosorosea* and laboratory evaluation against *Plano coccus citri* (Risso). *Journal of Entomology*, 11(6), 338-344.

- Ibarra Ulloa, J. T., & Rodríguez Carrillo, J. A. (2010). El modelo logístico: Una alternativa para el estudio del crecimiento poblacional de organismos. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 11(3). Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/636/63613123024.pdf>
- Jara, D., & Urra, F. (2022). Uso de *Tenebrio molitor* Linnaeus, 1758 (Coleoptera: Tenebrionidae) como agente biológico para la limpieza de osamentas de pequeños vertebrados. *Revista Chilena de Entomología*, 48(3), 505-509.
- Jimenez Martínez, G. (2009). Métodos de control de plagas. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria.
- Jurado-Gómez, H., & Guzmán-Insuasty, M. (2015). Determinación de la cinética, prueba de crecimiento y efecto de inhibición in vitro de *Lactobacillus casei* en *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* y *Staphylococcus agalactiae* y *Escherichia coli*. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia*, 62(2), 23-39.
- Kipcak, A. S., Ismail, O., Doymaz, I., & Piskin, S. (2014). Modeling and Investigation of the Swelling Kinetics of Acrylamide-Sodium Acrylate Hydrogel. *Journal Chemistry*. doi:<https://doi.org/10.1155/2014/281063>
- Kowalski, G., Kijowska, K., Witczak, M., Kuterasiński, L., & Łukasiewicz, M. (2019). Kowalski, G., Kijowska, K., Witczak, M., Kuterasiński, Ł., & Łukasiewicz, M. (2019). Synthesis and Effect of Structure on Swelling Properties of Hydrogels Based on High Methylated Pectin and Acrylic Polymers. *Polymers*, 11(1). doi:<https://doi.org/10.3390/polym11010114>
- Krashyap, P. L., Xiang, X., & Heiden, P. (2015). Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 36-51.
- Labeaga Viteri, A. (Febrero de 2018). Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones. España: Universidad Nacional de Educación a Distancia. Facultad de Ciencias. .

- Labrada-Hechavarria, Y., Cordoví-Velázquez, J. M., Rapado-Paneque, M., & Rosabal-Cordoví, Ú. M. (2018). Caracterización física y Química de aceite esencial de *azadirachta indica* A. Juss expuesto a radiación gamma. *Revista Cubana de Química*(30), 470-482.
- Li, J., Yao, J., Li, Y., & Shao, Y. (2012). Controlled release and retarded leaching of pesticides by encapsulating in carboxymethyl chitosan /bentonite composite gel. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 795-803.
- López-Pantoja, Y., Angulo-Escalante, M., Martínez-Rodríguez, C., Soto-Beltrán, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2007). Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Mediagraphics artemisa: Bioquímica*, 117-125.
- López-Vásquez, I. J., Martínez-Puc, J. F., Ramírez-Bautista, M. A., López-Hernández, M. B., & Candelaria-Martínez, B. (2025). Potential use of *Tenebrio molitor* L. to promote sustainable livestock farming. *Agroproductividad*, 18(5), 173-180. doi:<https://doi.org/10.32854/82fjbx62>
- Marín Cervantes, M. D. (2006). *Tesis: Evaluaciòn de la actividad quitinolítica de cepas de lecanicillium en medios hidrófobos utilizando compuestos orgánicos volátiles*. México D.F., Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
- Mármol, Z., Paez, G., Rincón, M., Araujo, K., Aiello, C., Chandler, C., & Gutierrez , E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica URU*, 53-58.
- Márquez-Gutiérrez, M. E., Gato- Cárdenas, Y., & Lequerque, A. (2017). El género *Metarhizium* Sorokin y su aplicación en el control de insectos plagas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 1-13.

- Márquez-Ortega, A. E. (Mayo de 2006). *Tesis: Estudios para la producción de una lacasa termoestable por el hongo Trametes sp. EUM1*. México D.F., México, México: Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
- Mendoza-Zurita, G. (2012). *Tesis: Estudio de enzimas lignolíticas producidas por Pleurotus ostreatus y Lentinulas edodes usando diferentes inductores*. Madrid, España: Universidad Autónoma de Madrid: Facultad de Ciencias.
- Miyares, M., González, J., Torres, D., Muñoz, L., Pestaña, Y., Padrón, S., & Linares, M. (2013). Validación de la técnica de determinación de azúcares totales por el método de micro coomassie a doble longitud de onda para la muestra de producto terminado del antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis C22(2), 1. *VacciMonitor*, 22(2), 1.
- Montero-Contreras, O., Morales Valles, P. A., Pino-Pérez, O., Cermeli-Lollini, M., González-González, E., & Rosales Amado, L. C. (2017). Insecticidal activity of six plant extracts on *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Revista de Protección Vegetal*, 32(3), 1-7.
- Motta-Delgado, P. A., & Murcía-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. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/928/92819767006.pdf>
- Muñiz-Paredes, F., Miranda-Hernández, F., & Loera, O. (2017). Production of conidia by entomopathogenic fungi: from inoculants to final quality tests. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33-57. doi:10.1007/s11274-017-2229-2
- Muñoz-Seijas, N., Fernandes, H., López-Periago, J. E., Outeiriño, D., Morán-Aguilar, M. G., Domínguez, J. M., & Salgado, J. M. (2024). Characterization of all life stages of *Tenebrio molitor*: Envisioning innovative applications for this edible insect. *Future Foods*, 10, 1-11. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fufo.2024.100404>

- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J., & Vázquez-Montoya, E.-L. (2012). Bioplaguicidas: Una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3b), 17-29.
- Navarrete, B., Valarezo, O., Cañarte, E., & Solórzano, R. (2017). Efecto del Nim (*Azadiracta indica* Juss.) sobre *Bemisia tabaci gennadius* (Hemiptera: Aleyrodidae) y controladores biológicos en el cultivo de melón *Cucumis melo* L. *La Granja: revista de Ciencias de la Vida*, 33-44.
- Navarro, A. E., Manrique, Á., Iparraguirre, E., Díaz, C., Christian, J., Cuizano, N., & Llanos, B. P. (2010). Síntesis y caracterización de quitosano cuaternario nativo y reticulado en polvo para su aplicación en la absorción de iones metálicos. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 313-321.
- Nieto Orellana, C. R., & Orellana Ulloa, V. P. (mayo de 2011). Tesis: Aplicación del quitosano como promotor de floculación para disminuir la carga contaminante. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.
- Ochoa Martínez, C. (2005). *Modelos matemáticos de transferencia de masa en deshidratación osmótica*. Colombia.
- Ochoa Martínez, C. (2005). Modelos matemáticos de transferencia de masa en deshidratación osmótica. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 4(5), 330-342. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/724/72450405.pdf>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (16 de 11 de 2011). *Plagas y enfermedades de las plantas*. Obtenido de La FAO en situaciones de emergencia: de la prevención a la reconstrucción mejor: <http://www.fao.org/emergencias/tipos-de-peligros-y-de-emergencias/plagas-y-enfermedades-de-las-plantas/es/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2017). El futuro de la alimentación y la agricultura: tendencias y desafíos.
- Ortiz-Hernández, M. L., Sánchez-Salinas, E., Folch-Mallol, J. L., Olvera-Velona, A., & Dantan-González, E. (2014). *Los plaguicidas en México: Aspectos*

generales, toxicológicos y ambientales. Cuernavaca, Morelos: Universidad Autónoma del Estado de Motrelos.

- Ostrowska-Czubenko, J., Gierszewska, M., & Pieróg, M. (2015). pH-responsive hydrogel membranes based on modified chitosan: water transport and kinetics of swelling. *Journal of Polymer Research*, 22(8). doi:<https://doi.org/10.1007/s10965-015-0786-3>
- Padilla-Melo, G. N., Bernal-Urbe, M. G., Vélez-Arango, P. E., & Montoya-Restrepo, E. C. (2000). caracterización Patógenica y morfología de aislamientos de *Metarhizum anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. *Cenicafé*, 28-40.
- Padmavathi, J., Uma Devi, K., & Uma Maheswara , R. (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 & Biotechnology*(19), 469-477.
- Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J., & López-Llorca, L. V. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of Applied Microbiology*, 541-553.
- Pandey, N., & Budhathoki, U. (2007). Protein determination through Bradford's method of Nepalese Mushroom. *Scientific World*, 85-88.
- Pantoja Guerra, M., Mendoza Reyes, S., & Valero Valero, N. (2018). Diseño de un medio de cultivo para la producción de biomasa de *Microbacterium* sp. (BSC3) para la generación de materia orgánica humificada a partir de lignito. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 20(1), 31-41. doi:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v20n1.62764>
- Park, J. K., & Chang , H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology Advances*, 18(4), 303-319. doi:[https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(00\)00040-9](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(00)00040-9)

- Pérez Vázquez, A., & Landeros Sánchez, C. (2009). Agricultura y deterioro ambiental. *Elementos*(73), 19-25.
- Pérez-López, E. (2012). Plaguicidas botánicos: una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, 16(1), 51-59.
- Pérez-Vázquez, A., Leyva-Trinidad, D. A., & Gómez-Merino, F. C. (2018). Desafíos y propuestas para lograr la seguridad alimentaria hacia el año 2050. *Revista Mexica de Ciencias Agrícolas*, 9(1), 175-189.
- 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. *Microbiology*, 40(2), 111-116.
- Pijoan, M. (2004). El Neem "la farmacia de la aldea. *Ambito farmacéutico: Etnofarmacia*, 23, 128-133.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. N. (1999). *Microbiology*. New York: The McGraw-Hil Companies.
- Prudkin, C., & Pérez, O. É. (2016). Physicochemical Characterization of Encapsulating Chitosan for Insulin's delivery. *Avances en Ciencia e Ingeniería*(7), 57-66.
- Pucheta Díaz, M., Flores Macías, A., Rodríguez Navarro, S., & de la Torre, M. (2006). Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia*, 31(12), 856-860.
- Ramírez-Salinas, C., & Castro-Ramírez, A. E. (17-41). El complejo gallina ciega (Coleoptera: Melolonthidae) en el cultivo de maíz en el madronal, municipio de Amatenango del Valle, Chiapas, México. *Acta zoológica Mexicana*, 2000.
- Rezagholizade-shirvan, A., Soltani, M., Shokri, S., Radfar, R., Arab, M., & Shamloo, E. (2024). Encapsulación de compuestos bioactivos: características,

aplicaciones en sistemas alimentarios e implicaciones para la salud humana.
Food Chemistry: X(24). doi:DOI: 10.1016/j.fochx.2024.101953

Rincón Santamaría, A., Cuellar Gil, J. A., Valencia Gil, L. F., & Sánchez Toro, O. J. (2019). Cinética de crecimiento de *gluconacetobacter diazotrophicus* usando melaza de caña y sacarosa: evaluación de modelos cinéticos. *Acta Biológica Colombiana*, 24(1), 38-57. doi: <https://doi.org/10.15446/abc.v24n1.70857>

Rodríguez Hamamura, N., Valderrama Negrón , A., Alarcón Cavero, H., & López Milla, A. (2010). Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 336-354.

Rodríguez-Gámez, L. A., Gandarilla-Pacheco, F. L., Maldonado-Blanco, M. G., Quintero-Zapata, I., Morales-Ramos, L. H., Alfaro-Álvarez, H. H., & Elías-Santo, M. (Noviembre de 2017). Evaluación de sustratos naturales para la producción de conidios de *Beuveria bassiana* (Bals.) Vuill. (Hypocreales: Cordicipitaceae) en cultivo bifásico. *Interciencia*, 42(11), 739-743.

Rosas-García, N. M., & De Luna-Santillana, E. D. (2006). Diseño de matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 135-142.

Ruiz-Corral, J. U., Bravo-Mosqueda, E., Ramírez-Ojeda, G., Baéz-González, A. D., Álvarez-Cilva, M., Ramos-González, J. L., . . . Byerly Murphy, K. F. (2013). *Plagas de importancia económica en México: aspectos de su biología y ecología*. Tepatitlan de Morelos, Jalisco, México: Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias [INIFAP].

Saadoun, S., Al-Omari, R., Jaradat, Z., & Ababneh, Q. (2009). Influence of culture conditions of *Streptomyces* sp. (Strain S 242) on Chitinase production. *Polish Journal of Microbiology*, 339-345.

- Salgado-Garciglia, R., Pérez-López, H., García-Munguía, A. M., & Loeza-Lara, P. D. (2019). Extractos vegetales: Una fuente importante de compuestos naturales bioplaguicidas. *alter. Enfoques Críticos*(20), 17-27.
- Samuels, R. I., dos Santos, A. V., & Peres Silva, C. (2011). Enzymology of Entomopathogenic Fungi. En J. Francis Borgio, K. Sahayaraj, & I. Alper Susurluk, *Microbial Insecticides: Principles and aplicaciones* (págs. 71-92). New York: Nova Science Publishers.
- Sánchez Duarte, R. G., Martínez Macías, M., Correa Murrieta, M. A., Saldivar Cabrales, J., Sánchez Machado, D. I., & López Cervantes, J. (2017). Síntesis de hidrógeles de quitosano a partir de la cáscara de camarón para ensayos de absorción de cobre. *Revista Internacional de Contaminación del Aire*, 93-98.
- Sánchez-Duarte, R. G., Martínez-Macías, M., Correa-Murrieta, M. A., Saldivar-Cabrales, J., Sánchez-Machado, D. I., & López-Cervantes, J. (Junio de 2017). Síntesis de hidrogel de quitosano a partir de cáscara de camarón para ensayos de adsorción de cobre. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*(33), 93-98.
- Sánchez-Nieto, N. (2013). Material de apoyo para los estudiantes del curso Bioquímica Experimental. México D.F.: Facultad de Química: Departamento de Bioquímica.
- Sánchez-Pérez, L. d., Barranco-Florido, J. E., Rodríguez-Navarro, S., Cervantes-Mayagoitia, J. F., & Ramos-López, M. Á. (2014). Enzymes of Entomopathogenic Fungi, Advances and Insights. *Advances in Enzyme Research*, 65-76.
- Sapna Bai, N., Remadevi, O. K., Sesidharan, T. O., Balachander, M., & Dharmarajan, P. (2012). Cuticle degrading enzyme production by some isolated of the entomopathogenic fungus, *Metarrhizium anisoplae*. *Journal of Bio-Science-Bangladesh Journals-Online*(20), 25-32.

- Savo, A., & Valladares, G. R. (2007). Parasitoides de minadores de hojas y manejo de plagas. *Ciencia e Investigación Agraria*, 167-185.
- Selfa, J., & Anento, J. L. (1997). Plagas agrícolas y forestales. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 75-91.
- Sharp, R. G. (2013). A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy*, 757-793.
- Sim, K. Y., Liew, J. Y., Ding, X. Y., Choong, W. S., & Intan, S. (2017). Effect of vacuum and oven drying on the radical scavenging activity and nutritional contents of submerged fermented . *Food Science and Technology*, 131-135.
- Tamez Guerra, P., Galán Wong, L. J., Medrano Roldán, H., García Gutiérrez, C., Rodríguez Padilla, C., Gómez Flores, R. A., & Tamez Guerra, R. S. (2001). Bioinsecticidas: su empleo, producción y comercialización en México. *Ciencia UANL*, 143-152.
- Téllez-Jurado, A., Cruz-Ramírez, M. G., Mercado-López, Y., Assaf-Torres, A., & Arana-Cuenca, A. (2009). Action and response mechanisms in relation of entomopathogenic fungi and insects. *Revista Mexicana de Micología*, 73-80.
- Tonk-Rügen, M., Vilcinskis, A., & Wagner, A. E. (2022). Insect Models in Nutrition Research. *Biomolecules*, 12, 1-20. doi: <https://doi.org/10.3390/biom12111668>
- Torres, M., Córtes, H., Ortiz, C. F., Cappello, S., & De la Cruz, A. (2013). Caracterización de aislamientos nativos de *Metarhizium* y su patogenicidad hacia. *Revista colombiana de entomología*, 40-46.
- Trinidad Bello, A. (2014). Tesis: Modelos de crecimiento en Biología, su significado biológico y selección del modelo por su ajuste. Ciudad de México, Iztapalapa, México: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Trujillo Ruiz, P., Zapata Restrepo, L., Hoyos Sánchez, R., Yepes Rodríguez, F. C., Capataz Tafur, J., & Orozco Sánchez, F. (2008). Determinación de la DL50 y

- TL50 de extractos etanólicos de suspensiones celulares de *Azadirachta indica* sobre *Spodoptera frugiperda*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 61(2), 4564-4575.
- Trujillo-Roldan , M., & Valdez-Cruz, N. A. (2006). El estrés hidrodinámico: muerte y daño celular en cultivos agitados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 269-280.
- Valderrama Negrón, A., Jacinto-Hernández, C., Ponce-García, S., & Manrique-Pollera, L. (2017). Uso de diseño multifactorial en los ensayos de liberación controlada del ácido 1,3 indoláctico cargado en matriz de quitosano. *Revista de la Sociedad Química de Perú*, 354-365.
- Vázquez-Luna, A., Pérez-Flores, L., & Díaz-Sobac, R. (2007). Alimentaria biomolecules with insecticidal activity: An alternative to promote the food safety. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 306-313.
- Velásquez Rodríguez, D. (Noviembre de 2022). Tesis: Producción de larvas de *Tenebrio molitor* como complemento alimenticio en crías de peces de interés de cultivo comercial. Ciudad de México, México: Universidad autónoma Metropolitana unidad Xochimilco.
- Vemmer, M., & Patel, A. (2013). Revisión de métodos de encapsulación adecuados para agentes de control biológico microbiano. *Biological control*, 67(3), 380-389. doi:doi:10.1016/j.biocontrol.2013.09.003
- Vera Delgado, H., Vera Baque, C., Bello Moreira, Í., Tipán Alcivar, J., Mendoza García, G., & Avellan Chancay, M. (2016). Bioassays to promote plants extracts and to control tomato pest insect (*Lycopersicum esculentum* Mill. *Avances de Investigación Agropecuaría*, 20(3), 17-32.
- Villafuerte Robles, L. (2011). Los excipientes y su funcionalidad en productos farmacéuticos sólidos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 42(1), 18-36. Obtenido de <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcf/v42n1/v42n1a3.pdf>

- Villamil Montero, D. A., Naranjo, N., & Van Straghlen, M. A. (2012). Efecto insecticida del extracto de semillas de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) sobre *Collaria scenica* Stal (Hemiptera: Miridae). *EntomoBrasilis*, 5(2), 125-129.
- Villavicencio-Nieto, M., & Pérez-Escandón, B. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el estado de Hidalgo, México. *Polibotánica*(30), 193-238.
- Vinchira-Villarraga, D. M., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control Biológico: Camino a la agricultura Moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5.
- Wang, S., Lin, C., Liu, Y., Shen, Z., Jeyaseelan, J., & Qin, W. (2016). Characterization of a starch-hydrolyzing α -amylase produced by *Aspergillus niger* WLB42 mutated by ethyl methanesulfonate treatment. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1-10.
- Xu, Y., Yan, X., Zheng, H., Li, J., Wu, X., & Xu, J. (2024). The application of encapsulation technology in the food Industry: Classifications, recent Advances, and perspectives. *Food Chemistry*, 21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fochx.2024.101240>
- Zapata M, J. E., Hoyos R, M., & Quinchía B, L. A. (2005). Parámetros cinéticos de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en presencia de un campo magnético variable de baja densidad y alta frecuencia. *Vitae*, 12(1), 39-44. Obtenido de https://www.redalyc.org/pdf/1698/Resumenes/Resumen_169815869005_1.pdf
- Zhi, L., Wei-hong, W., Min, L., Tao, F., Chun, W., & Zhi, W. (2010). Preparation and controlled release of crosslinked acetamiprid-loaded carboxymethyl chitosan and sodium alginate gel beads. *Journal of Agricultural University of Hebei*.
- Zou, C., Li, L., Dong, T., Zhang, B., & Hu, Q. (2014). Joint action of the entomopathogenic fungus *Isaria fumosorosea* and four chemical insecticides

against the whitefly *Bemisia tabaci*. *Biocontrol Science and Technology* , 315-324.

ANEXO A

CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DNS PARA CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA

La cuantificación de glucosa como sustrato presente en el medio de cultivo durante la fermentación líquida, se realizó mediante la técnica de referencia colorimétrica de DNS (técnica de Miller). Esta técnica se basa en la reacción de reducción del ácido 3,5-dinitrosalicílico que presenta un color amarillo, con una molécula de glucosa u otro azúcar reductor para producir el ácido 3-amino-5-nitrosalicílico de color rojo (lo que se muestra en la Figura 1.A), éste último se detecta con la lectura de la absorbancia en una longitud de onda de 540 nm (Delgado Salazar, 2009).

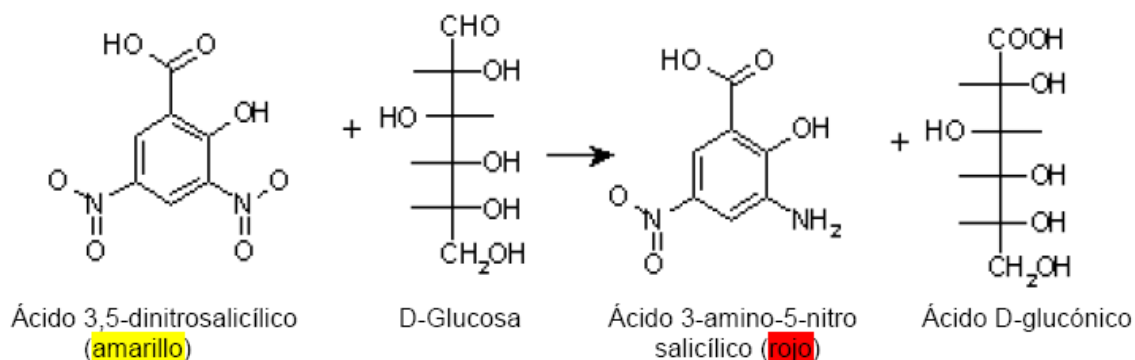


Figura 1.A Conversión de los azúcares reductores mediante la técnica de DNS.

La técnica de DNS es utilizada para determinar la concentración desconocida de azúcares como fuente de carbono en las fermentaciones mediante la interpolación de la absorbancia en la curva de calibración. El reactivo DNS se preparó adicionando 16 g de hidróxido de sodio (NaOH), 300 g de tartrato de sodio y potasio (C₄H₄O₆KNa) y 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) en agua destilada, se debe realizar un mezclado homogéneo de la solución, después aforar hasta un litro. En este método el DNS debe estar en exceso frente a los azúcares y en todas las muestras se debe adicionar la misma cantidad, de modo que mayores

concentraciones de azúcares reductores provocan una mayor coloración de la muestra. Las diferencias de coloración se determinan por espectrofotometría visible. Una vez preparado el reactivo DNS, se preparó la solución de glucosa, la cual consistió en disolver 25 mg de glucosa, aforar a 25 mL con agua destilada y homogeneizar para obtener una solución de glucosa de 1 mg/mL, con la que se prepararon soluciones de glucosa de diferentes concentraciones como se muestra a continuación en la Tabla 1.A.

Tabla 1.A Soluciones de glucosa de diferentes concentraciones.

Agua (μL)	Solución de glucosa (μL)	Concentración final (mg/mL)
1000	0	0.00
900	100	0.10
800	200	0.20
700	300	0.30
600	400	0.40
500	500	0.50
400	600	0.60
300	700	0.70
200	800	0.80
100	900	0.90
0	1000	1.00

Posteriormente se pipetearon 0.5 mL de cada una de las soluciones en tubos de ensayo por triplicado, después se adicionaron 0.5 mL de reactivo DNS, mezclándose con un Vortex y colocando a ebullición durante 5 min la muestra. Transcurrido el tiempo se pasaron los tubos de ensayo a un baño maría con agua fría para parar la reacción. Luego, se adicionaron 5 mL de agua destilada y se dejaron reposar durante 15 min. Finalmente se midieron las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro a 540 nm (Ávila Núñez, Rivas Pérez, Hernández Motzezak, & Chirinos, 2012). Los resultados obtenidos fueron los siguientes.

Tabla 2.A Absorbancias para la curva de calibración mediante el método de DNS.

Glucosa (mg/mL)	Absorbancia				Desv. Std.
	1	2	3	Promedio	
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00
0.1	0.057	0.042	0.042	0.047	0.01
0.2	0.108	0.096	0.094	0.099	0.01
0.3	0.164	0.127	0.149	0.147	0.02
0.4	0.233	0.204	0.203	0.213	0.02
0.5	0.266	0.263	0.262	0.264	0.00
0.6	0.326	0.325	0.313	0.321	0.01
0.7	0.380	0.375	0.373	0.376	0.00
0.8	0.435	0.449	0.440	0.441	0.01
0.9	0.485	0.454	0.489	0.476	0.02
1.0	0.541	0.555	0.540	0.545	0.01

Una vez obtenidos los resultados se graficaron para generar la curva de calibración, la cual se muestra en la Figura 2.A.

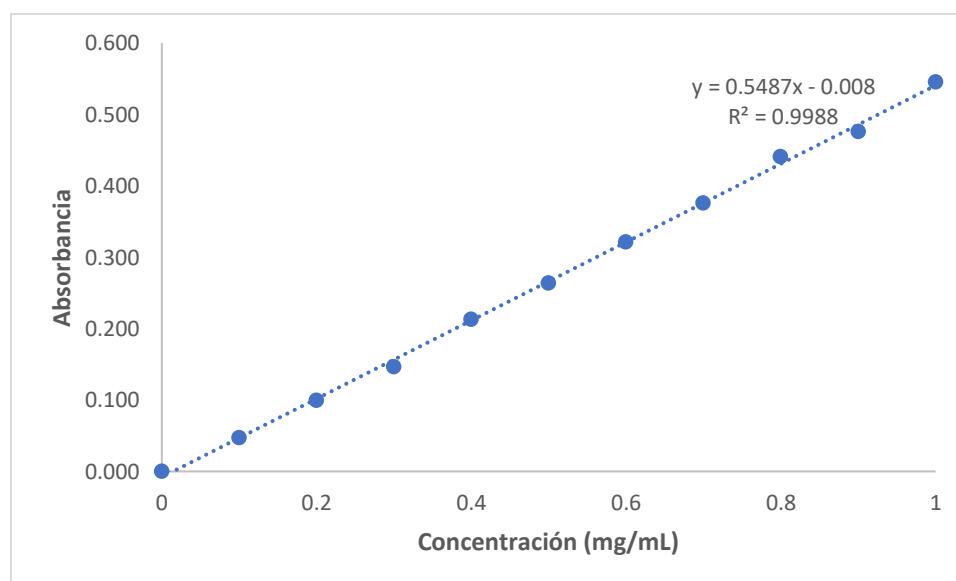


Figura 2.A. Curva de calibración de azúcares reductores por la técnica de DNS.

Después se despeja la ecuación de la línea recta obtenida, para con ella determinar las concentraciones desconocidas de las muestras mediante la absorbancia de éstas.

$$x = \frac{y+0.008}{0.5487} \quad (1A)$$

Donde:

y = absorbancia de la muestra.

x = concentración de glucosa (mg/mL)

ANEXO B

CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO BRADFORD PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El método Bradford para la determinación de proteínas, se utiliza ampliamente debido a que es simple, rápido, barato y sensible, por lo cual se debe construir una curva de calibración de diversas concentraciones de una proteína como es el caso de la seroalbúmina bovina (BSA). Este método está fundamentado en la unión específica del azul de Coomassie brillante G250 a los residuos de Arginina (Arg), Triptófano (Trp), Tirosina (Tyr), Histidina (His) y Fenilalanina (Phe) de las proteínas, produciendo con ello un complejo coloreado azul oscuro ya que se estabiliza la forma aniónica del colorante por sus interacciones iónicas e hidrofóbicas. Se tiene una mayor sensibilidad y linealidad de la curva de calibración a pequeñas concentraciones de proteínas y el complejo formado tiene una absorbancia máxima a los 595 nm (Miyares, y otros, 2013; Sánchez-Nieto, 2013).

La curva de calibración se realizó preparando el reactivo de Bradford en una proporción 1:4 con agua y conservándola durante 2 semanas. Después se preparó la solución de la BSA, para lo cual se pesaron 25 mg y se aforó con agua a 25 mL. Una vez preparada la solución de 1 mg/mL de las proteínas se llevaron a cabo diluciones como se muestra en la Tabla 1.B.

Tabla 1.B Soluciones de BSA de diferentes concentraciones.

Agua (μ L)	Solución de BSA (μ L)	Concentración final (mg/mL)
1000	0	0.000
900	100	0.100
800	200	0.200
700	300	0.300
600	400	0.400
500	500	0.500
400	600	0.600
300	700	0.700
200	800	0.800
100	900	0.900
0	1000	1.000

Posteriormente se pipeteó 0.1 mL de cada una de las diluciones por triplicado en tubos de ensayo, a los cuales se adicionaron 5 mL del reactivo Bradford diluido y se mezcló con Vortex hasta su homogenización, se incubó por 5 min a temperatura ambiente y finalmente, se leyeron las absorbancias a 595 nm, cuidando de no dejar pasar demasiado tiempo para prevenir el incremento de la absorbancia. La preparación del blanco se realizó adicionando 0.1 mL de agua destilada y 5 mL de reactivo Bradford diluido, siguiendo después los pasos antes mencionados (Bio-rad, 2020). Las absorbancias obtenidas se presentan en la Tabla 2.B.

Tabla 2.B Absorbancias para la curva de calibración mediante el método Bradford.

Seroalbúmina (mg/mL)	Absorbancia				Desv. Std.
	1	2	3	Promedio	
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00
0.1	0.128	0.125	0.149	0.134	0.01
0.2	0.261	0.228	0.256	0.248	0.01
0.3	0.351	0.378	0.378	0.369	0.01
0.4	0.467	0.462	0.475	0.468	0.00
0.5	0.559	0.574	0.568	0.567	0.01
0.6	0.641	0.694	0.651	0.662	0.02
0.7	0.721	0.751	0.797	0.756	0.03
0.8	0.882	0.84	0.838	0.853	0.02
0.9	0.943	0.91	0.92	0.924	0.01
1.0	1.083	1.091	1.011	1.062	0.03

A continuación, se graficaron las absorbancias obtenidas en la Tabla 2.B para cada una de las soluciones de BSA para generar la curva de calibración que se presenta en la Figura 1.B.

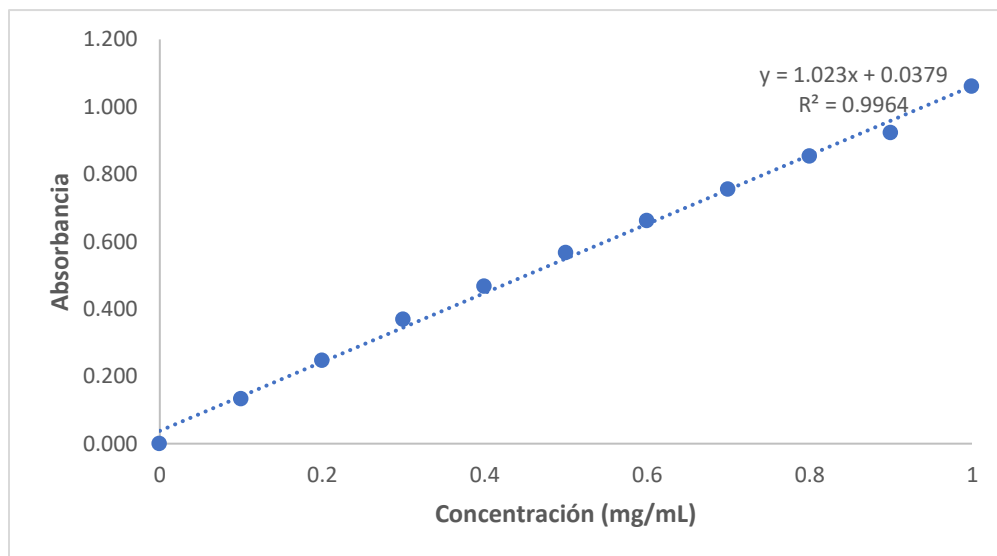


Figura 1.B Curva de calibración de proteínas por el método de Bradford.

Finalmente se despeja la ecuación de la línea recta obtenida, para con ella determinar las concentraciones desconocidas de las muestras mediante la absorbancia de éstas.

$$x = \frac{y - 0.0379}{1.023} \quad (1B)$$

Donde:

y = absorbancia de la muestra.

x = concentración de proteínas (mg/mL).

ANEXO C

CURVA DE CALIBRACIÓN DEL MÉTODO DNS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE N-ACETIL-D-GLUCOSAMINA

En el anexo A, ya se ha mencionado que la técnica de DNS es utilizada para la cuantificación de azúcares reductores presentes en el medio de cultivo durante una fermentación líquida, es por ello, que fue utilizada para determinar la actividad quitinolítica de los hongos entomopatógenos utilizados en el presente trabajo, debido a que éstos producen quitinasas capaces de degradar a la quitina o quitosano por diferentes reacciones como se muestra a continuación:

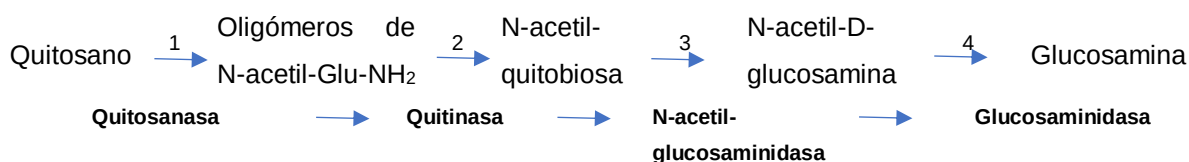


Figura 1.C Conversión del quitosano en glucosamina mediante la técnica de azúcares reductores de DNS.

Estas reacciones provocan que se formen azúcares reductores, tal es el caso de la N-acetil-D-glucosamina como sustrato, la cual reacciona con el ácido 3,5-dinitrosalícílico (color amarillo) para reducirlo y una vez realizado este proceso formar un producto de color rojo, cuya presencia se cuantifica con la lectura de la absorbancia en el rango de longitud de onda de 575 nm (Delgado Salazar, 2009). Por lo anterior, la curva de calibración es una representación gráfica en un eje de coordenadas, de la absorbancia (eje de las ordenadas, Y) contra la concentración (eje de las abscisas, X), ésta se construye realizando diversas concentraciones conocidas del sustrato (glucosa) y determinar con ello las absorbancias, con la finalidad de obtener una curva de calibración.

Por lo anterior, la técnica de DNS es utilizada para determinar la concentración desconocida de azúcares como fuente de carbono en las fermentaciones mediante la interpolación de la absorbancia en la curva de calibración.

Por otra parte, el reactivo DNS se preparó adicionando 16 g de NaOH, 300 g de tartrato de sodio y potasio y 10 de DNS en agua destilada, se debe realizar un mezclado homogéneo de la solución, después aforar hasta 1 L. Una vez preparado el reactivo, se preparó la solución de N-acetil-D-glucosamina, la cual consiste en disolver 175 mg del azúcar reductor y aforar en 25 mL de agua destilada, mezclar homogéneamente para obtener una concentración en la solución de 7 mg/mL, con la que se realizó la curva de calibración como se muestra a continuación.

Tabla 1.C Determinación de las concentraciones de N-acetil-D-glucosamina requeridas para la curva patrón de DNS.

Agua (μL)	Solución de N-acetil-D-glucosamina (μL)	Concentración final (mg/mL)	Concentración (μmol/mL)
1000	0	0.00	0.0
968	32	0.22	1.0
936	64	0.45	2.0
905	95	0.67	3.0
873	127	0.89	4.0
842	158	1.11	5.0
684	316	2.21	10.0
526	474	3.32	15.0
368	632	4.42	20.0
210	790	5.53	25.0
51	949	6.64	30.0

Preparadas las soluciones para la curva de calibración se pipeteó 1 mL de cada una de dichas soluciones en tubos de ensayo por triplicado, después se adicionó 1 mL de buffer de citratos para después adicionarle 2 mL de reactivo DNS, mezclándose con un Vortex y colocando a ebullición durante 5 min la muestra. Transcurrido el tiempo se pasaron los tubos de ensayo a un baño maría con agua fría para parar la reacción. Luego, se adicionaron 10 mL de agua destilada y se dejaron reposar durante 15 min. Finalmente, se midieron las absorbancias de las muestras en un espectrofotómetro UV-vis a 575 nm (Saadoun, Al-Omari, Jaradat, & Ababneh, 2009).

Los resultados obtenidos para la curva de calibración se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2.C Absorbancias adquiridas después del ensayo de la curva patrón de DNS.

N-acetil-D-glucosamina (mg/mL)	N-acetil-D-glucosamina (μmol/mL)	Absorbancia			
		1	2	3	Promedio
0.0	0	0.000	0.000	0.000	0.00
0.22	1	0.117	0.046	0.055	0.07
0.45	2	0.203	0.06	0.148	0.14
0.67	3	0.260	0.212	0.269	0.25
0.89	4	0.403	0.354	0.383	0.38
1.11	5	0.492	0.477	0.46	0.48
2.21	10	1.056	0.979	0.948	0.99
3.32	15	1.445	1.475	0.954	1.29
4.42	20	2.139	1.259	1.910	1.77
5.53	25	2.748	1.275	2.269	2.10
6.64	30	2.820	2.804	2.749	2.79

Una vez obtenidos los resultados se llevó a cabo la regresión lineal para la obtención de la curva de calibración, la cual se presenta en la siguiente figura.

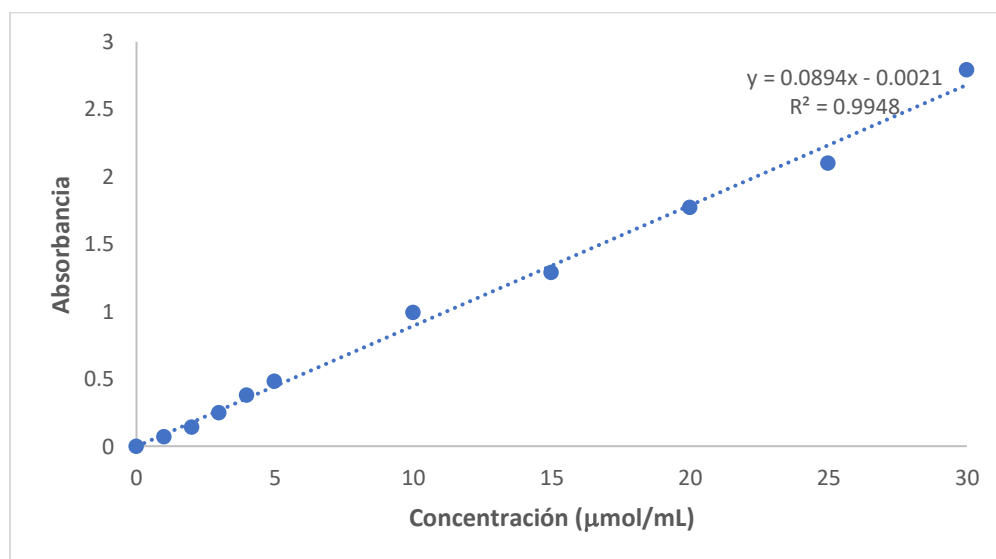


Figura 2.C Curva de calibración de azúcares reductores por la técnica de DNS.

Después se despeja ecuación que representa la línea recta para obtener las concentraciones desconocidas de las muestras en la siguiente ecuación.

$$x = \frac{y+0.0021}{0.0894} \quad (1C)$$