



Secretaría de Educación Pública

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**Evaluación de una biopelícula como soporte para crecimiento
de *Beauveria bassiana***

Tesis

Que para obtener el grado de:

Maestra en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta:

I.B.Q. María Danae Reyes Alvarado

Asesores:

Dr. José Alberto Monroy Rivera

Dra. Patricia Guillermina Mendoza García

CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES.....	3
2.1	<i>Beauveria bassiana</i>	3
2.1.1	Condiciones de crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	5
2.2	Producción de <i>Beauveria bassiana</i>	5
2.3	Películas biodegradables	7
2.3.1	Películas biodegradables de polisacáridos.....	9
2.3.2	Plastificante	11
2.4	Características mecánicas	11
2.4.1	Esfuerzo-deformación.....	12
3	JUSTIFICACIÓN.....	15
4	OBJETIVOS.....	16
4.1	General.....	16
4.2	Específicos	16
5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1	Polisacáridos y plastificante.	17
5.2	Material biológico	17
5.3	Formulación de las películas.....	17
5.3.1	Nutrientes	18
5.3.2	Solución formadora de película	18
5.4	Análisis de las películas	19
5.4.1	Características mecánicas.....	19
5.4.2	Actividad de agua	19
5.5	Evaluación de las películas como soporte	19

5.5.1	Evaluación del crecimiento	20
5.5.2	Conteo de esporas	20
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6.1	Pruebas preliminares	21
6.1.1	Formulación de películas	21
6.1.2	Películas de agar	22
6.1.3	Películas de carragenina-κ	23
6.1.4	Películas de alginato.....	24
6.1.5	Actividad de agua de pruebas preliminares.....	26
6.1.6	Resistencia y elasticidad de pruebas preliminares.....	28
6.2	Formulación de películas con quitosano	31
6.3	Actividad de agua de películas con quitosano	34
6.4	Características mecánicas de películas con quitosano.....	35
6.5	Funcionalidad de las películas como soporte de crecimiento.....	39
7	CONCLUSIONES	43
8	BIBLIOGRAFÍA	44

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 2.1 <i>Beauveria bassiana</i>	4
FIGURA 2.2 Producción industrial de <i>Beauveria bassiana</i>	6
FIGURA 2.3 Diagrama de esfuerzo-deformación.....	13
FIGURA 6.1. Codificación de experimentos.....	21
FIGURA 6.2 Película de agar	23
FIGURA 6.3 Película de carragenina-κ	24
FIGURA 6.4 Película de alginato.....	26
FIGURA 6.5 Resistencia de las películas preliminares	28
FIGURA 6.6 Elasticidad de las películas preliminares	30
FIGURA 6.7 Resistencia de las películas de carragenina-κ y alginato adicionadas con quitosano	36
FIGURA 6.8 Elasticidad de películas de carragenina-κ y alginato adicionadas con quitosano	38
FIGURA 6.9 Sistema para la incubación de las películas	40
FIGURA 6.10 Crecimiento de <i>Beauveria bassiana</i>	41

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 6.1 Actividad de agua. Películas preliminares	27
TABLA 6.2 Diseño de experimentos	31
TABLA 6.3 Activiad de agua de películas con quitosano	34

RESUMEN

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno utilizado como agente de biocontrol en plagas agrícolas. Para su obtención, se realizan fermentaciones bifásicas. En la primera etapa, de fermentación sumergida, se obtiene el micelio que después es inoculado en sustratos como arroz o arcillas, necesitándose grandes espacios para que el hongo pueda producir conidias.

Debido a lo anterior, en este trabajo se tuvo como objetivo la evaluación de una película biodegradable como soporte para el crecimiento de *Beauveria bassiana*, utilizando como matriz a la carragenina y al alginato en dos niveles de concentración, suplementadas con quitosano y con los nutrientes necesarios. El plastificante utilizado fue glicerol en dos niveles de concentración, así como Tween 20 también en dos niveles. Una vez obtenidas las películas, fueron analizadas para conocer la resistencia y elasticidad de las mismas en un texturómetro TA.XT plus. Las muestras fueron cortadas en tiras de 140x25 mm con espesor de 1 mm. La velocidad del brazo fue de 10 mm/s y una abertura inicial de 50mm.

Los resultados no mostraron diferencia significativa en la resistencia de las películas entre las diferentes concentraciones de los tres componentes estudiados, probablemente por la presencia de quitosano que forma enlaces entre los grupos amino de éste y los carboxilos de los hidrocoloides. La elasticidad hasta el quiebre se vio favorecida por la presencia de glicerol.

Por esta razón las películas que mostraron mayor resistencia de cada matriz fueron utilizadas para evaluarlas como soporte de crecimiento. En esta etapa, las películas fueron elaboradas en condiciones estériles y colocadas de forma colgante en frascos individuales después de ser inoculadas en superficie. En los frascos se vertieron 10 mL de agua estéril para mantener una humedad relativa del 100%. Las películas fueron incubadas a 25°C durante 12 días en ciclos de 24 horas de luz. Al término del tiempo de incubación sólo se observó crecimiento en las películas de carragenina.

La cuenta final de esporas de las películas de carragenina arrojó un resultado final de 2×10^9 esporas por gramo de sustrato, muy aceptable pues en los sustratos comerciales se obtienen 1×10^{10} esporas por gramo.

Por todo lo anterior se concluye que es posible elaborar una película biodegradable que funciona como soporte de crecimiento de *Beauveria bassiana*.

1 INTRODUCCIÓN

La obtención de algunos productos como enzimas y antibióticos, hace que los hongos filamentosos tomen importancia a escala industrial (Pazouki y Panda, 2000).

Actualmente, además de ser usados para producción de metabolitos secundarios, también han sido utilizados como agentes de control biológico para contrarrestar los efectos nocivos de agentes plaga. (Hajek y St. Leger, 1994; Alves, *et al.*, 2002).

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno bien conocido, descrito por primera vez en 1834 sobre la muerte de gusanos de seda y usado actualmente contra 200 especies de insectos aproximadamente (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999; Feng, *et al.*, 1994).

Existen en el mercado diversos productos con formulaciones a partir de sus esporas que se obtienen mediante fermentaciones sumergidas o bifásicas pues de esta manera el hongo alcanza un mejor desarrollo y se proporciona un soporte físico a la conidia aérea que solo puede formarse sobre una superficie (Wraight *et al.*, 2001).

Las películas comestibles hechas de diversos materiales pueden funcionar como sustrato para el crecimiento de *Beauveria bassiana* por ser matrices sólidas bien conocidas y estudiadas que proporcionan una superficie adecuada.

Estas capas delgadas y continuas de material degradable, tienen características mecánicas de elasticidad y resistencia conferidas por el material base y el plastificante utilizado (Tongdeesoontorn, *et al.*, 2011) que las hacen adecuadas para ser manipuladas.

Existen reportes donde las películas biodegradables de alginato de sodio o almidón, han sido utilizadas como soportes para inmovilización de bacterias y hongos en los cuales se ha demostrado la viabilidad de los microorganismos (Brachova, *et al.*, 2012; Wu, 2008; Accinelli y Abbas, 2011). Con base en esto, el objetivo de esta

investigación es elaborar una biopelícula degradable con matriz de polisacárido para ser evaluada como soporte para el crecimiento del hongo *Beauveria bassiana*.

Al utilizar la película como sustrato se pretende facilitar la obtención de las esporas del hongo de estudio al simplificar el procedimiento ya que industrialmente se realiza una fermentación bifásica para su crecimiento. En la primera etapa, se obtiene el micelio en un caldo nutritivo que después es inoculado en el sustrato sólido, el más utilizado es el arroz, en el cual se lleva a cabo la conidiación del hongo. Las bolsas inoculadas son almacenadas por al menos 10 días para lo cual se necesitan grandes espacios.

Con el uso de una película se podría reducir el espacio donde se lleva a cabo la fermentación ya que la superficie podría aumentarse al usar ambas caras de la película y así ayudar a mejorar el proceso de obtención del hongo además se estaría dando un nuevo uso a las películas biodegradables.

2 ANTECEDENTES

2.1 *Beauveria bassiana*

Los hongos filamentosos son microorganismos eucarióticos, aerobios y heterótrofos, utilizados en la industria por su importancia en la obtención de productos como antibióticos, enzimas o biomasa (Pazouki y Panda, 2000).

La biomasa y conidias de algunos hongos filamentosos son utilizados en control biológico, el cual está definido como "El uso de organismos vivos para reducir la densidad poblacional o el impacto de un organismo plaga específico, haciendo a esta menos perjudicial" (Eilemberg *et al.*, 2001).

Existen alrededor de 700 especies de hongos entomopatógenos distribuidos por todo el mundo y variados ambientes. Dichos hongos son patógenos de insectos y pueden sustituir a los agentes químicos de control de plagas (Hajek y St. Leger, 1994).

Beauveria bassiana (Figura 2.1) es un hongo cosmopolita que infecta a más de 200 especies de insectos (Feng, *et al.*, 1994) y ha sido evaluado a nivel laboratorio contra un gran número de plagas como el picudo del algodónero (*Antonomus grandis grandis*), mosquitas blancas (*Bemisia spp.*), el chapulín frijolero (*Brachystola magna Girard*), barrenador del tallo de maíz (*Diatraea saccharalis*), entre otros (Hernández-Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999; Wraight, *et al.*, 2000; Alves, *et al.*, 2002; Barajas-Ontiveros, *et al.* 2009).

El género *Beauveria* pertenece a un entomopatógeno imperfecto de la clase de los Deuteromycetes y es la forma de reproducción asexual de *Cordyceps bassiana* (Tanada y Kaya, 1993; Driesche y Bellows 1996). Se caracteriza morfológicamente por tener conidias globosas con forma de botella unicelular típicamente hialinos, de pared lisa, con tamaño de 1.5-5.5 μm y globosos a cilíndricos o vermiformes con raquis en forma de zig-zag (Bustillos 2001; Rodríguez y del Pozo, 2003).

Su apariencia es polvosa, blanco algodonosa o amarillento cremoso. En medio de cultivo sólido alcanza su desarrollo completo a los 21 días a 27° C (Velázquez y Berlanga-Padilla, 1999).

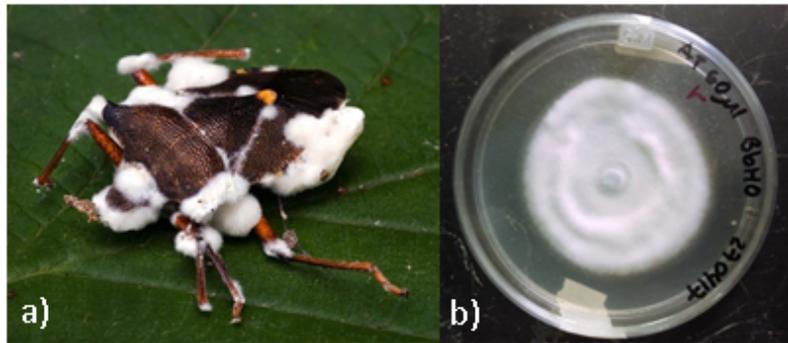


FIGURA 2.1 *Beauveria bassiana*.
a) Infectando un insecto y b) Sembrado en medio PDA

La forma de infección del hongo comienza con la adhesión de las conidias a la cutícula, partes bucales, membranas intersegmentales o espiráculos del insecto donde la humedad relativa del microambiente es alta. Después germina formando un tubo germinativo que se desarrolla para penetrar la cutícula e invadir el homocelo (Charnley, 2007).

La infección, llamada micosis y generada por la penetración en el exoesqueleto, es ayudada por los apresorios que ejercen presión sobre la cutícula y por de varios procesos enzimáticos que degradan la quitina, proteínas y lípidos del integumento del insecto. (Boucias *et al.*, 1988; Ferron *et al.*, 1991). Una vez que la micosis ha invadido el integumento, el hongo prolifera y libera blastosporas, un tipo de desarrollo levaduriforme que produce momificación del huésped hasta causar su muerte por la falta de nutrientes en la hemolinfa o por la toxicidad de algunos metabolitos producidos por el hongo. Finalmente se forma conidio aéreo en la superficie del cadáver permitiendo su diseminación (Pekrul y Gula, 1979, Feng *et al.*, 1994, Kang *et al.*, 1999).

2.1.1 Condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*

Beauveria bassiana es un hongo entomopatógeno que se encuentra naturalmente en diversos ambientes, puede crecer y adaptarse a diferentes medios. Sin embargo su desarrollo se debe en mayor medida al microambiente que se forma en la cutícula del insecto y no a las condiciones climáticas del medio (Samson, 1993) debido a lo cual puede crecer en ambientes con %HR baja (85%) pero necesita al menos 92% de humedad relativa para desarrollarse.

Crece en temperaturas que van de los 15 °C a los 35°C pero el crecimiento óptimo, así como la conidiación ocurre entre 20°C y 30°C (Berlanga-Padilla y Hernández-Velazquez, 2002).

Es un microorganismo susceptible a la luz. Las esporas se inactivan con la exposición prolongada a los rayos ultravioleta (Jackson *et al.*, 2000) de tal manera que las formulaciones que se realizan para uso agrícola, contienen materiales de protección como maltodextrinas o aceites que las encapsulan extendiendo su viabilidad (Bustillo-Pardey, 2006). Sin embargo se ha demostrado que con ciclo de 24 horas de luz la producción de esporas es mayor que con oscuridad continua y el crecimiento del micelio se favorece con la oscuridad (Tobar-Hurtado, 1999; Barajas-Ontiveros, 2009). Esto indica que la luz solar, juega un papel importante en el ciclo de vida de *Beauveria bassiana*.

2.2 Producción de *Beauveria bassiana*

La producción de conidias de *B. bassiana* se realiza en cultivo en matrices sólidas, en cultivo sumergido o en fermentaciones bifásicas (figura 2.2) donde ambas técnicas se combinan. Éste último método es generalmente usado en la producción industrial del hongo.



FIGURA 2.2 Producción industrial de *Beauveria bassiana*

En el cultivo sumergido la velocidad de agitación y el oxígeno disuelto así como el aumento de viscosidad durante la fermentación afectan la morfología de los hongos (Olsvik y Kristiansen, 1992; Pazouki y Panda, 2000) Además, mediante esta técnica se obtienen blastosporas en más baja concentración siendo un obstáculo en la producción comercial de *B. bassiana* (Feng, *et al.*, 1994). Además se emplea el suministro en exceso de fuentes complejas de nitrógeno (licor de maíz fermentado o harina de algodón) y de carbono (melaza) (Eyal, *et al.*, 1994) pudiendo aumentar así los costos.

El cultivo en sustratos sólidos, generalmente es utilizado en la producción artesanal de hongos entomopatógenos (Monzón, 2001) sobre soportes naturales o desechos agroindustriales como bagazo de caña (*Saccharum officinarum*), residuos de papa (*Solanum tuberosum*), salvado de trigo (*Triticum aestivum*) y arroz (*Oryza sativa*) (Neves y Alves, 2000; Santa *et al.*, 2005; Núñez-Gaona *et al.*, 2010) o en sustratos inertes como la vermiculita, paños o arcillas, con la ventaja que sobre éstos, pueden adicionarse los nutrientes necesarios para una esporulación máxima además de proveer una mayor superficie de contacto para una mayor producción (Jenkins *et al.*, 1998).

El cultivo en medio sólido permite la producción de conidios aéreos que son similares a los que se desarrollan naturalmente en la superficie de los insectos y son superiores a los obtenidos por fermentación sumergida (Wraight *et al.*, 2001).

La fermentación bifásica se compone de dos etapas, en la primera, se obtiene el micelio en un caldo nutritivo mediante el crecimiento del hongo hasta la fase exponencial que después es inoculado en matrices sólidas para generar conidias (Feng *et al.*, 1994, Jenkins y Goettel, 1997).

En el medio líquido se deben proveer las fuentes tanto de carbono como de nitrógeno suficientes para un crecimiento adecuado. El sustrato sólido además de ser usado como fuente de nutrientes, provee un soporte físico para la producción de conidias, aumenta la superficie de producción y hace más fácil la aireación (Lomer *et al.*, 2002).

Un medio sólido utilizado para el crecimiento de dichos microorganismos, podría ser una película biodegradable con matriz de polisacáridos.

2.3 Películas biodegradables

Una película o recubrimiento comestible es definido como una capa delgada y continua de material comestible, formada o puesta entre el alimento o con los componentes del alimento (Ghanbarzadeh, *et al.*, 2006).

De acuerdo a Bourtoom (2008) las películas comestibles se clasifican en tres grandes grupos: lípidos, proteínas y polisacáridos según los componentes con los que se elabora.

Las películas de lípidos generalmente contienen compuestos utilizados como recubrimientos de protección, que consisten en monoglicéridos acetilados, cera natural y tensoactivos. Las sustancias que han tenido mejores resultados, son la parafina y cera de abejas (Bourtoom 2008).

La función principal de un recubrimiento lipídico es bloquear el transporte de humedad debido a su baja polaridad. En contraste, la característica hidrofóbica del lípido forma películas más gruesas y más frágiles. En consecuencia, deben estar asociados con otros agentes formadores de película tales como proteínas o derivados de la celulosa (Debeaufort *et al.*, 1993).

Las proteínas como la de soya, el gluten o la kafirina de trigo y la zeína de maíz también han sido estudiadas como base para películas, pues en sus estados nativos, las proteínas generalmente existen, como proteínas fibrosas, que son insolubles en agua y sirven principalmente como materiales estructurales de los tejidos animales; o proteínas globulares, que son solubles en agua o soluciones acuosas de ácidos, bases o sales (Scope 1994; Bourtoom, 2008) que las hacen resistentes y capaces de formar películas si se trabajan conjuntamente con otros materiales como los polisacáridos (Bourtoom, 2008).

Existe en la literatura gran información acerca de las películas con matriz de polisacáridos, especialmente las de almidón, utilizadas como productos biodegradables por su bajo costo, características renovables y buenas propiedades mecánicas, o sea, resistentes y flexibles (Xu *et al.*, 2005). Sin embargo, las películas de polisacáridos son fácilmente degradadas al estar expuestas a condiciones de alta humedad (Salame, 1986).

Dentro de las películas de polisacáridos, se pueden citar como ejemplos, las elaboradas con goma gellan, la cual forma un gel elástico en la presencia de cationes y con un plastificante adecuado se puede secar para formar películas (Yang y Paulson, 2000). La carboximetilcelulosa, también ha sido utilizada en la formación de películas por presentar alta viscosidad, ser no tóxica y no alergénica (Tongdeesoontorn, *et al.*, 2011).

Las películas comestibles son quebradizas, para evitar la fragilidad en ellas, se adicionan plastificantes para hacerlas más manejables, sin embargo la adición de un plastificante las hace más elásticas y un poco menos resistentes (Suppakul, *et al.*, 2006).

Algunos plastificantes utilizados han sido ácidos grasos y polioles, aunque también se ha reportado el uso de azúcares como glucosa o maltosa. (Lai y Padua 1997; Parris y Coffin, 1997; Ghanbarzadeh *et al.* 2006). El glicerol y sorbitol, han sido ampliamente usados por su estabilidad e inocuidad (Tongdeesoontorn, *et al.*, 2011)

El mejoramiento en las características mecánicas permite una mayor flexibilidad y resistencia, haciendo que las películas presenten mayor versatilidad en el uso que se les da, lo cual se logra al elegir los materiales adecuados para su elaboración.

Actualmente, las películas son sólo utilizadas en alimentos y como empaques biodegradables, sin embargo, y de acuerdo a reportes de algunos autores, también han sido utilizadas, aunque en menor medida, en la inmovilización o a modo de encapsulamiento de esporas de hongos y algunas bacterias. Tal es el caso de *Lactobacillus plantarum* inmovilizado en película de alginato, especies de *Bacillus* degradadores de fosfato en un tipo de cápsulas de almidón y esporas de *Aspergillus flavus* en matrices esféricas de almidón (Brachova, *et al.*, 2012; Wu, 2008; Accinelli y Abbas, 2011), con base en esta información, podría pensarse que las películas biodegradables también sirven para ser usadas como soporte de crecimiento microbiano.

2.3.1 Películas biodegradables de polisacáridos

Los polisacáridos son polímeros naturales obtenidos de plantas, algas o síntesis microbiana, usados ampliamente en la industria de los alimentos por sus características reológicas especiales (Khan, *et al.*, 2007)

Las películas biodegradables de polisacáridos, son empleadas para proteger a los alimentos del deterioro (Dominguez-Courtney y Jiménez-Munguía, 2012). La formación de estas películas es mediante el rompimiento de las cadenas del polímero en cadenas más cortas, para después ser reordenadas al interior de la matriz por la formación de enlaces hidrofílicos o iónicos, generalmente, debido a la evaporación de algún solvente (Butler *et al.*, 1996)

Muchos son los polisacáridos empleados para dicho fin, el almidón es uno de los más usados porque las películas obtenidas presentan gran flexibilidad, sin embargo son quebradizas y muy solubles en agua (Wang *et al.*, 2007), sin embargo se ha observado que la relación amilosa-amilopectina, los monómeros estructurales del almidón, tiene efectos sobre las características mecánicas, así como la cantidad de polisacárido en la matriz, así, por ejemplo, el incremento de amilosa en un 4% mejora la resistencia de 7.4 a 9.6 MPa y a mayor cantidad de almidón en la solución las características mecánicas se ven favorecidas (Wang *et al.*, 2007; Talja *et al.*, 2008)

La carragenina es un polímero obtenido de las algas marinas rojas compuesto por una cadena lineal principal de galactanos parcialmente sulfatados (Thomas, 1997). Es soluble en agua y es un agente usado en la formación de películas. Se divide en tres grandes grupos, κ , ι y λ , dependiendo de la cantidad de grupos sulfatados presentes, siendo 20%, 33% Y 41% respectivamente (Karbowski *et al.*, 2006).

Se han realizado estudios para determinar la resistencia de las películas con carragenina, donde se determinó que a una concentración del 5% del polisacárido sin utilizar plastificante las películas presentaban una resistencia mayor (3.87 kg/m²) que las películas a la misma concentración con glicerol como plastificante (1.3 kg/m²). La elasticidad de las películas plastificadas fue mayor (156.8%) que las películas sin plastificar (106%) (Briones *et al.*, 2004).

En otros experimentos (Alvez *et al.*, 2006) se demostró que películas de carragenina-pectina disminuían el Modulo de Young e incrementaban la tensión a la ruptura al aumentar la concentración de la carragenina.

Otro polisacárido usado por su capacidad de formar películas en presencia de iones Ca⁺, Mg⁺ y Na⁺ es el alginato (Funami *et al.*, 2009) el cual es un polisacárido que se encuentra en las algas rojas. Está formado por bloques de ácido manurónico y ácido algínico (Onsoyen, 1997).

Se han llevado a cabo experimentos utilizando diferentes concentraciones de alginato para analizar las características mecánicas de las películas formuladas. Así, se determinó que incrementando, tan solo 0.5%, la concentración de alginato en las

solución formadora de película la resistencia aumentó de 15.28 MPa a 24.88 MPa y los resultados de la elasticidad al quiebre fueron de 4.69% a 25.60% (Wang *et al.*, 2007)

La literatura demuestra que las características mecánicas tienen relación con la concentración en la matriz de las películas.

2.3.2 Plastificante

Los plastificantes, son usados en las películas biodegradables, porque mejoran la flexibilidad y las características mecánicas en general. Debilitan las interacciones moleculares de los polímeros, formando una estructura en red más homogénea (Bósquez-Molina y Vernon-Carter, 2005).

Existen diversos ejemplos de plastificantes, se han utilizado azúcares, aceites o polioles, como el glicerol o sorbitol, los cuales han sido usados para modificar las características físicas, químicas y mecánicas (Bergo y Sobral 2007, Buortom, 2008).

El glicerol, como ya se ha mencionado, es usado como plastificante, sin embargo por tener naturaleza higroscópica aumenta la humedad en la superficie en las películas teniendo algunos efectos adversos, que pudieran ayudar a la degradación de la película o también tener efecto sobre la elasticidad, pues el agua también actúa como plastificante (Karbowski, 2006; Ziani *et al.*, 2008).

En general, los plastificantes se utilizan para mejorar las características mecánicas de las películas biodegradables.

2.4 Características mecánicas

Las películas biodegradables al ser manipuladas, son sometidas a esfuerzos; por lo tanto es necesario conocer la cantidad de éste que pueden soportar y por lo tanto, la

capacidad que tienen para ser deformadas, es decir, conocer las características mecánicas de estos materiales.

Las características o propiedades mecánicas, manifiestan la relación entre la fuerza aplicada y su respuesta, o sea, la deformación, tales como: resistencia, dureza, ductilidad, elasticidad, y dependen del tipo de enlace químico, disposición estructural de los átomos o moléculas y de las imperfecciones del material (Blanco, 2016).

Las deformaciones son producidas porque, para que un material sea capaz de transmitir fuerza, las distancias entre sus átomos deben variar. Entonces, una deformación se produce cuando los desplazamientos de punto a punto presentan variación (Romero-García, 2002)

De tal forma, que podemos dividir a los materiales en: Elásticos, como cristales iónicos y covalentes; elastoplásticos, metales estructurales y viscoelásticos, por ejemplo: plásticos y vidrios (Blanco, 2016). Estos materiales tienen diferentes capacidades de resistencia y elasticidad.

La resistencia se define como la cantidad de energía que un cuerpo absorbe antes de sufrir una deformación, o sea, que sea capaz de soportar el esfuerzo sin romperse, esta variable es indicativa de la manipulación que una película puede soportar (García, 2002) al igual que la elasticidad, con la cual un cuerpo es capaz de volver a su estado original después de sufrir una esfuerzo (Medina-Guzmán, 2009). Si ambas se relacionan se logra una tasa de deformación, llamada proporcionalidad o módulo elástico, donde, se implica la geometría del cuerpo y la velocidad con la cual se aplicó la fuerza (Heimdal *et al.*, 1998).

2.4.1 Esfuerzo-deformación

Las características mecánicas, pueden ser estimadas por un ensayo de esfuerzo-deformación, en el que, a una muestra del material, llamada probeta, se le aplica una carga incremental de tensión hasta que ocurra una falla (Díaz del Castillo, 2008).

Como resultado de tal prueba, se genera una curva, figura 2.3, en la que se puede distinguir cómo el material sufre al principio una deformación elástica, conforme la carga aumenta, se observa una región plástica hasta llegar a la ruptura (Díaz del Castillo, 2008).

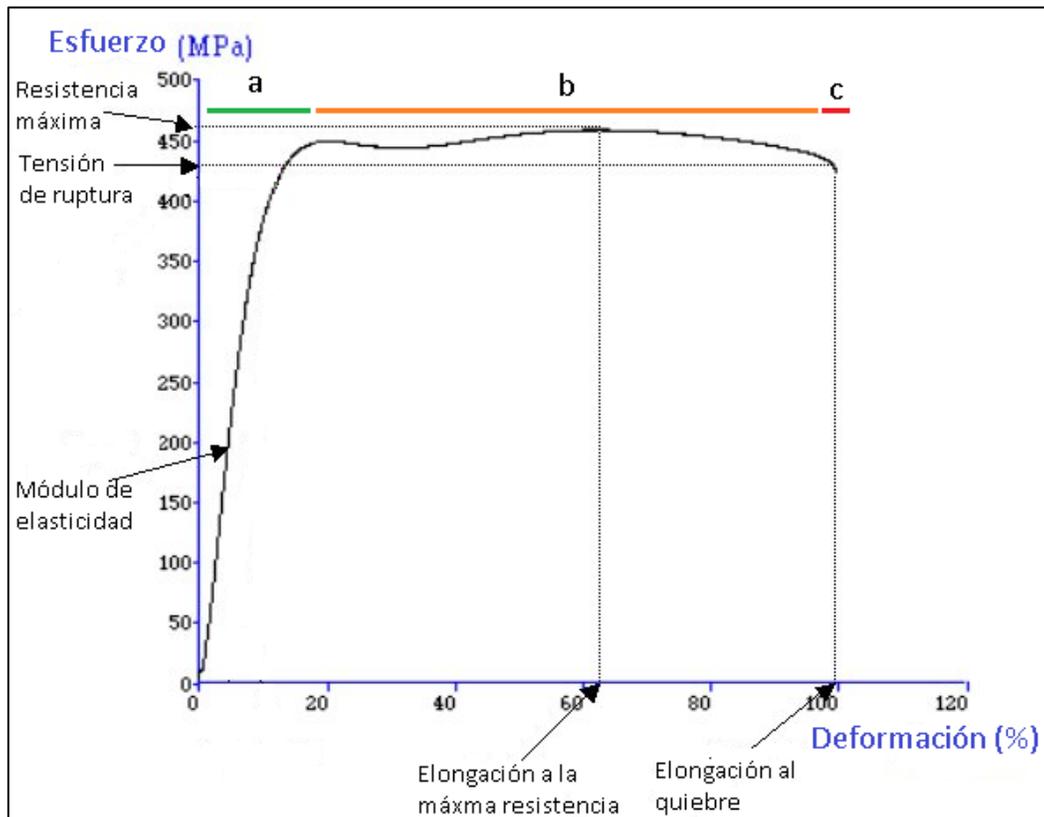


FIGURA 2.3 Diagrama de esfuerzo-deformación.
a) Región elástica, b) Región plástica y c) Ruptura

La diferencia entre la deformación plástica y la elástica es que la primera permanece, aunque deje de haber esfuerzo. La segunda, por el contrario, tiende a desaparecer cuando la carga cede y el material recupera su forma original (Díaz del Castillo, 2008)

Estos ensayos pueden realizarse con cargas de flexión, cortadura, tracción y compresión. Los de compresión y flexión, normalmente se realizan a materiales

como: el hormigón, cerámicos o refractarios, que suelen ser frágiles. Las pruebas de tracción, se llevan a cabo en materiales dúctiles, como los metales ferrosos y no ferrosos, plásticos, fibras y gomas (Blanco, 2016).

En dicho ensayo también se pueden distinguir los puntos (Exponent, UK, 2007):

Módulo elástico: es la tasa de cambio de la deformación en función de la fuerza. Es la pendiente de la línea recta del diagrama esfuerzo-deformación.

Resistencia máxima: Es el máximo esfuerzo que el material puede soportar.

Resistencia a la ruptura: Es el esfuerzo basado en la sección transversal original del material al momento de la rotura.

Elongación al quiebre: Es la elongación al quiebre dividida entre la longitud original de la muestra.

Estos parámetros, indican la resistencia y flexibilidad de las películas biodegradables dando cuenta de la manipulación que pudieran soportar.

Una película biodegradable, al ser plastificada, aumenta la elasticidad y aunque la resistencia disminuye un poco, sigue siendo apta para su manipulación. Con la formulación adecuada de la solución formadora de película y usando materiales que ya se encuentran estudiados y reportados como resistentes se pudo lograr una película manejable que funcionó como soporte para el crecimiento de *Beauveria bassiana*.

3 JUSTIFICACIÓN

Beauveria bassiana es de gran interés comercial por su amplio uso como agente de biocontrol en plagas agrícolas. Actualmente, este hongo es obtenido por fermentación bifásica, usando en la segunda etapa diferentes sustratos sólidos que permiten la conidiación del mismo. Por este motivo, se elaboró una película nutritiva y biodegradable con matriz de polisacárido, útil como soporte para el crecimiento de *Beauveria bassiana*, dando, además, un nuevo uso a estos materiales.

4 OBJETIVOS

4.1 General

Diseñar y evaluar una película biodegradable como soporte para crecimiento de *Beauveria bassiana*.

4.2 Específicos

- Formular las películas biodegradables utilizando como matriz carragenina-k, agar y alginato de sodio.
- Determinar las características mecánicas de las películas obtenidas con los diferentes polisacáridos
- Evaluar la funcionalidad de las biopelículas como soporte para el crecimiento de *Beauveria bassiana*.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Polisacáridos y plastificante.

Las películas fueron elaboradas con tres diferentes polisacáridos, uno por cada película: Alginato de sodio, carragenina-κ (Sinergum de México) y agar bacteriológico (DIBICO).

Para suplementar las películas se usó quitosano (Sigma Aldrich), el cual tenía más de 75% de deacetilación, el cual se preparó al dispersar 1 g en 100 mL de una solución de ácido acético al 1%.

Glicerol (Golden Bell) y Tween 20 (Sigma Aldrich) fueron utilizados como plastificantes.

5.2 Material biológico

Beauveria basiana H003, pertenece a la colección interna de hongos del Laboratorio de Bromatología de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos, fue mantenido en medio PDA durante todo el estudio.

5.3 Formulación de las películas

Las películas fueron elaboradas por el método de vaciado, propuestos por Tongdeesoontorn (2011), Yaung y Paulson (2000) y Brachkova (2012) con modificaciones.

La temperatura utilizada para elaborar la solución se determinó en las pruebas preliminares.

5.3.1 Nutrientes

Los nutrientes usados para el crecimiento del microorganismo fueron: proteína de maíz (2%), extracto de levadura (1%), nitrato de potasio (1%) y sulfato de magnesio (0.5%), pertenecientes a un medio selectivo y complejo. Los componentes se agregaron uno por uno a la solución formadora de película contenida en un vaso de precipitados sobre una parrilla de calentamiento con agitación a una temperatura de 80°C. Para evitar el crecimiento de bacterias, la solución se ajustó a pH 4 utilizando una solución de ácido tartárico al 10%.

5.3.2 Solución formadora de película

En 100 mL de agua destilada a una temperatura de 80°C se disolvieron dos concentraciones diferentes (2% y 3%) de cada polisacárido en una parrilla de calentamiento con agitación magnética. A los 10 minutos de iniciados el calentamiento y la agitación, se adicionaron glicerol (2% y 3%) y Tween 20 (1% y 2%) como plastificantes. Finalmente los nutrientes en las concentraciones antes mencionadas.

Se vaciaron 25 mL de solución a temperatura de 50°C en un molde de vidrio de 140x100 mm, el cual fue calentado en baño de vapor para obtener una película de 1 mm de espesor. La temperatura de gelificación del agar fue de 35°C y de carragenina-k de 40°C. El tiempo de reposo fue de 10 minutos para cada una.

Para la gelificación de las películas de alginato de sodio, la solución formadora de película se puso en contacto con 10 mL de solución de CaCl_2 al 5% durante 20 minutos a temperatura ambiente. La solución sobrante de CaCl_2 fue desechada.

Una vez obtenidas las películas, se desmoldaron y almacenaron en bolsas de polietileno a 4°C hasta ser analizadas.

5.4 Análisis de las películas

5.4.1 Características mecánicas

Se evaluaron el esfuerzo máximo de tensión y el alargamiento hasta la ruptura de acuerdo a la norma ASTM D882 con algunas modificaciones utilizando probetas rectangulares, de 140 x 25 mm con espesor de 1mm.

Se midió el espesor de cada tira con un instrumento electrónico Vernier de marca **xxxx**, en 5 diferentes puntos con la finalidad de rectificar las medidas.

Las características mecánicas fueron determinadas en un texturómetro TA.XT plus (Stable Microsystems, Surrey, UK) con una celda de 30 kg y velocidad del cabezal de 10 mm/min, con una abertura inicial entre las pinzas de agarre de 50 mm.

5.4.2 Actividad de agua

Se determinó la actividad de agua en un equipo AQUALab de cada película por triplicado.

5.5 Evaluación de las películas como soporte

En esta fase de la investigación era necesario trabajar en condiciones estériles, por este motivo, todas las soluciones y el agua para la elaboración de las películas fueron llevadas a un autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. Posteriormente se trabajó en el laboratorio en una campana de flujo laminar usando un mechero para asegurar la asepsia. De acuerdo a la literatura (Cañedo y Ames 2004) todo el material de laboratorio utilizado en este paso fue lavado con una solución clorada al 5%, posteriormente se enjuagó con agua destilada y finalmente

con solución de etanol al 70% y fue esterilizado en estufa en calor seco a temperatura de 120°C durante 12 horas.

Las películas fueron puestas en soportes que se diseñaron con el fin de suspender dichas películas en condiciones estériles y poder inocularlas en superficie con un asa por ambas caras. Los soportes utilizados fueron frascos esterilizados en calor húmedo durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se adicionó agua estéril a cada frasco (10 mL) y así tener una humedad relativa alta. Una vez inoculadas se dejaron en reposo durante 10 días a 25°C para observar el crecimiento del hongo.

5.5.1 Evaluación del crecimiento

El crecimiento de *Beauveria bassiana* fue reportado como la cantidad de esporas presentes de la superficie total de las películas. Para dicho fin, cada película fue pesada al inicio de la fermentación y al final de la misma se disolvió en 100 mL de una solución de Tween 80 al 0.05% para hacer las diluciones correspondientes y poder realizar el conteo de esporas en cámara de Neubauer. Después de hacer los cálculos se reportó el número de esporas por gramo de sustrato (película).

5.5.2 Conteo de esporas

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Pruebas preliminares

6.1.1 Formulación de películas

Las películas desarrolladas en este trabajo no tuvieron etapa de secado por el requerimiento de alta humedad para el crecimiento del microorganismo.

La codificación de las formulaciones se define en la Figura 6.1.

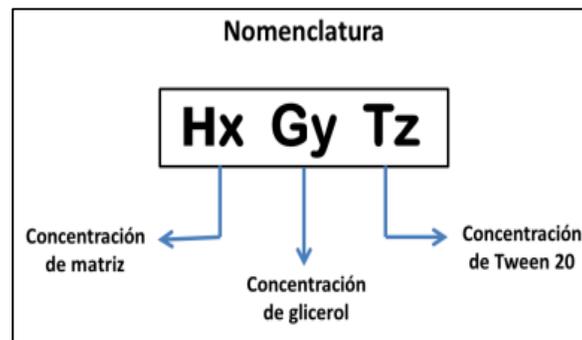


FIGURA 6.1. Codificación de experimentos

Todas las películas de las pruebas preliminares se hicieron utilizando dos niveles de hidrocoloide (H1 y H2) y dos niveles de glicerol (G1 y G2), el Tween 20 permaneció en concentración constante.

Las pruebas preliminares se realizaron para establecer los tiempos de solubilización y homogenización de todos los componentes de las películas así como la temperatura de gelificación de las mismas debido a que la adición de los nutrientes afecta dicho factor.

Se utilizaron moldes hechos de vidrio con dimensiones de 140x100x3 mm y para poder variar el espesor en las películas. Se observó que películas gruesas (>2mm) quedaban duras y quebradizas. Por debajo de 1mm de espesor, eran frágiles, por lo tanto el espesor se fijó en 1mm.

La elección del material de los moldes estuvo basada en que es un material que presenta uniformidad en la superficie además de ser lisa y no se rasga con facilidad evitando heterogeneidad en las paredes de las películas.

6.1.2 Películas de agar

Se realizaron las películas de agar de acuerdo a las concentraciones antes mencionadas. Se determinó que el tiempo de solubilización de éste era de 1 minuto a 100 °C posterior a la formación de la solución formadora de película. Esto quiere decir que una vez que se tenían todos los reactivos en solución, se dejaba a ebullición durante 1 minuto.

El agar se colocó en un vaso de precipitados con agua caliente a 80°C sobre una parrilla de calentamiento y agitación constante. Pasados 10 minutos se adicionó tanto el glicerol como el Tween 20 para finalmente agregar los nutrientes y se dejó en ebullición durante 1 minuto.

La temperatura de vaciado se fijó en 50°C puesto que la gelificación del agar se lleva a cabo a 36°C (Armisen, 1997). El molde de vidrio en el cual fue vaciada la solución obtenida, se calentó ligeramente en vapor para asegurar la uniformidad de la superficie de la película antes de gelificar, esto, además permitía eliminar cualquier burbuja que pudiera alterar la superficie.

Las películas (figura 6.2) eran lisas, transparentes y homogéneas. Se desmoldaban fácilmente pero eran frágiles, porque las concentraciones utilizadas eran bajas y no permitían la obtención de películas resistentes. Debido a que la gelificación del agar depende directamente de la formación de puentes de hidrógeno entre las hélices del

polisacárido y el agua presente (Armisen, 1997), los nutrientes y plastificantes no permitieron la formación de dichos enlaces.



FIGURA 6.2 Película de agar

6.1.3 Películas de carragenina-k

Las películas de carragenina-k se prepararon a temperatura inicial de 60°C y se adicionó lentamente el hidrocoloide para evitar la formación de grumos. Después de 20 minutos la preparación se calentó a 80°C y se agregaron los demás componentes.

Se observó que al adicionar la sal de K^+ (KNO_3) la consistencia del gel cambiaba porque en presencia del ión K^+ la carrageninana-k tiene una estructura ordenada lineal de doble hélice (Mangione *et al.*, 2005) lo cual permite geles más fuertes. Además, la concentración de sales aumenta la temperatura de gelificación, la cual depende tanto de la concentración de hidrocoloide como de las sales. Al incrementarse las concentraciones mencionadas, la temperatura de gelificación también se incrementa (Lai *et al.*, 2000). Debido a esto, la temperatura de agitación se fijó en 80°C y la de vaciado en 45°C.

Se adicionó ácido tartárico para ajustar el pH a 4 al final de tiempo establecido, pues aunque la carragenina-k es estable a ese pH si permanece mucho tiempo por arriba de 70°C en condiciones ácidas el arreglo tridimensional que se forma por la unión de las dobles hélices y el ión K^+ , podría romperse debilitando la formación del gel (Thomas, 1997).

Al término de la agitación de la solución, se vació al molde, el cual se calentó con un baño de vapor y así se evitó la gelificación por choque térmico. La película final (figura 6.3), era lisa y uniforme, manejable y fácil de desmoldar sin embargo presentó cierto grado de sinéresis debido a la presencia de iones Mg^{+2} en su estructura (Trius y Sebranek, 1996). Las películas obtenidas se almacenaron a 4°C.



FIGURA 6.3 Película de carragenina-k

6.1.4 Películas de alginato

El alginato, a diferencia de la carragenina-k y el agar, gelifica en contacto con iones divalentes y no por efecto de la temperatura, por lo tanto, la solución de estas películas se realizó a 60°C, la temperatura inicial de agitación fue de 45°C. Además,

la formación de geles de alginato en contacto con soluciones de CaCl_2 se realizan a pH entre 3.6 y 4 para hacerlos estables (Onsoyen, 1997).

El alginato se disolvió en 100 mL de agua y después de 20 minutos de iniciada la agitación se adicionaron el glicerol y el Tween 20. Posterior a esto, se adicionó la proteína de maíz que es hidrofóbica, sin embargo, por la acción del surfactante anfifílico se controló la interacción entre la zeína y el polímero (Xiao *et al.*, 2011), de esta manera la proteína pudo mezclarse. El resto de los reactivos se agregaron uno a uno hasta la disolución completa. Se ajustó el pH a 4 y se vació en el molde, se dejó reposar unos minutos antes de ponerla en contacto con la solución de CaCl_2 .

La solución formadora de película se puso en contacto con 10 mL de Cloruro de Calcio al 5%, se dejó reposar durante 15 minutos y se volteó cuidadosamente para que la otra cara de la película también estuviera en contacto con dicha solución durante el mismo tiempo.

Al final del tiempo de reposo, la solución de calcio se desechó y se observó una reducción en el área de éstas películas que fue provocada porque los iones Ca^{+2} de la solución se unieron a los grupos carboxílicos del alginato de sodio formando un arreglo espacial en las moléculas, llamado “caja de huevo”, reduciendo el espacio entre ellas (Brachkova, *et al.*, 2012). También se observó que el tiempo de reposo fue importante. El alginato tuvo que estar en contacto con el ión Ca^{+2} lo suficiente para que el centro, en la parte interna, alcanzara el grado de gelificación deseado y reducir la heterogeneidad en las películas (Velings y Mestdagh, 1995) que pudieran afectar las características mecánicas.

Las películas (figura 6.4) tuvieron pequeñas irregularidades en los bordes y en algunas partes del centro de la misma. También presentaron sinéresis debido a que los bloques flexibles del alginato, una vez que ha ocurrido la gelificación, presentan relajamiento en la red molecular resultando en una exclusión repentina de agua (Draget *et al.*, 2001), este fenómeno puede afectar la actividad de agua de las películas, pues al haber desprendimiento de agua de la red molecular formada, el

agua disponible pudiera disminuir considerablemente afectando las condiciones de crecimiento de *Beauveria bassiana*.

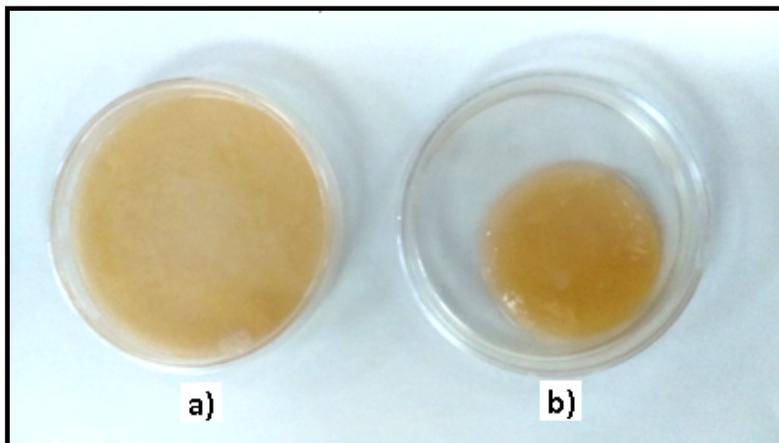


FIGURA 6.4 Película de alginato
a) Solución formadora de película b) Película fina de alginato

6.1.5 Actividad de agua de pruebas preliminares

Beauveria bassiana puede crecer en condiciones de humedad relativa baja (70%) y actividad de agua a partir de 0.85. Sin embargo presenta crecimiento y conidiación adecuados en ambientes que tienen una actividad de agua en un rango de 0.90–0.99 (Hallsworth y Magan, 1999) y %HR por arriba de 85%. Por esta razón la determinación de la actividad de agua en las películas fue muy importante. En la Tabla 6.1 se muestran los resultados de actividad de agua (a_w) de las películas de las pruebas preliminares medida en un equipo AquaLab.

Se puede observar, que las películas están en el intervalo de actividad de agua para el crecimiento de *Beauveria bassiana*, debido a que no se realizó la etapa de secado y a que la matriz de las películas contiene agentes higroscópicos (Saha y Bhattacharya, 2010).

TABLA 6.1 Actividad de agua de las películas preliminares

Película	Concentración		a_w
	[H]	[G]	
Alginato	2	2	0.959± 0.005 ^a
	1	2	0.939±0.004 ^b
	2	1	0.940±0.002 ^b
	1	1	0.917±0.001 ^b
Carragenina-k	2	2	0.906±0.004 ^{bc}
	1	2	0.918±0.002 ^{cd}
	2	1	0.917±0.001 ^{cd}
	1	1	0.936±0.001 ^{cd}
Agar	2	2	0.926±0.008 ^{de}
	1	2	0.904±0.006 ^{de}
	2	1	0.900±0.001 ^{de}
	1	1	0.905±0.007 ^e

Nota: Los resultados que no comparten letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

Las diferencias en la actividad de agua radican en el tipo de hidrocoloide empleado y no en la concentración del mismo o del glicerol, incluso, ésta variable de respuesta se pudo haber visto afectada con la cantidad de glicerol ya que es un depresor de la actividad de agua, sin embargo no fue así.

La actividad de agua de los hidrocoloides puede explicarse en la carragenina-k y en al agar porque los hélices de las moléculas se desdoblán por completo y se enlazan mediante puentes de hidrógeno a las moléculas del agua permitiendo una alta retención de la misma y por lo tanto mantener una alta a_w en el material que lo contiene (Langendorff, V., *et al.*, 2000).

En alginato, las moléculas de agua se quedan atrapadas en la red molecular de caja de huevo que se forma por la unión de los de carboxilos y el ion calcio aumentando la actividad de agua (Draget *et al.*, 2001), la cual no fue afectada por la sinéresis presente asumiendo que la cantidad de agua retenida fue suficiente y además el Tween 20 presente es una sustancia humectante que ayuda a retener agua.

6.1.6 Resistencia y elasticidad de pruebas preliminares

Para el presente trabajo, se utilizaron probetas de 140x25 mm con espesor de 1 mm y una velocidad del brazo de 10 mm/s. Los resultados de las características anteriores, pueden verse reflejados en la figura 6.5.

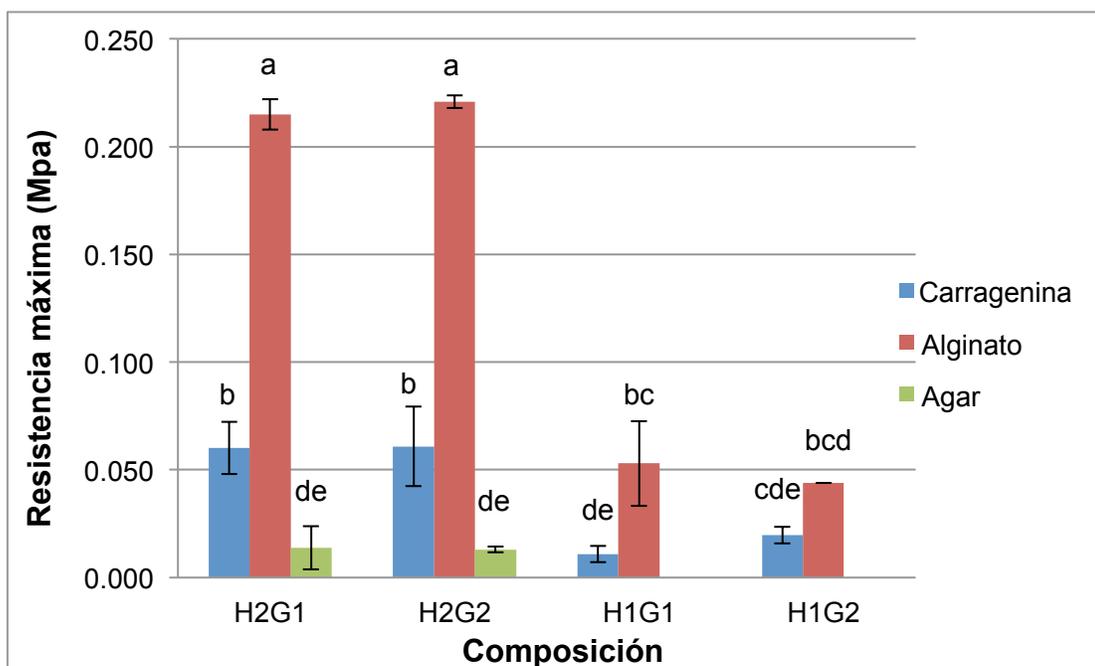


FIGURA 6.5 Resistencia de las películas preliminares

De acuerdo al análisis de Tuckey ($p < 0.05$) de comparación de medias, se observa que la mayor diferencia significativa existe entre las películas de alginato y de carragenina- κ de concentración mayor (H2G1 y H2G2) sin influencia de la concentración de glicerol marcada con la letra G. En las películas de menor concentración (H1G1 y H1G2) de los mismos hidrocoloides, las diferencias están presentes aunque en menor proporción.

Las películas de agar de concentración mayor (H2G1 y H2G2) son muy débiles comparadas con las películas de los otros dos hidrocoloides a cualquier

concentración. Las de menor concentración de agar (H1G1 y H1G2), no se formaron por la baja concentración, a pesar que el agar tiene la misma forma de gelificación que carragenina- κ , desdoblamiento de dobles hélices. Los geles de agar son más débiles debido a que las interacciones entre el polisacárido y el agua es por puentes de hidrógeno, enlaces débiles y en los geles de carragenina- κ la unión de las hélices con iones K^+ hacen más fuertes las interacciones (Armisen, 1997). En la formulación de las películas de carragenina- κ , la presencia de KNO_3 mejora la resistencia mecánica. Ningún componente de la fórmula ayudó en la formación de las películas de agar.

El aumento en la resistencia mecánica al aumentar la concentración de alginato de sodio, se debe a que al haber una mayor cantidad de polímero la interacción entre éste y el ión Ca^+ aumenta la estabilidad de la red tridimensional y por ende la fuerza del gel (Onsoyen, 1997).

A pesar de existir un plastificante en la formulación de las películas y que el agua también actúa como tal, los resultados no muestran una influencia en la resistencia mecánica debido tal vez, a que la concentración de éste (1% y 2%) fue baja, ya que trabajos realizados por otros autores señalan hasta un 5% del plastificante en la fórmula (Briones *et al.*, 2004). Sin embargo, las películas se muestran más resistentes por el nulo efecto del glicerol.

Estas películas en general, tienen valores de resistencia mecánica menores a los reportados en otros trabajos, como los de Wang *et al.* (2007), donde se alcanza hasta una fuerza tensil de 11.25 MPa al utilizar 2% de carboximetilcelulosa. Esto se debe a la humedad de las películas pues se ha demostrado que a una mayor humedad en ellas la resistencia disminuye (Tongdeesoontorn *et al.*, 2011).

Estos resultados de resistencia mecánica están relacionados con el porcentaje de elasticidad, definida como la máxima deformación que un material puede soportar hasta llegar a la ruptura. Dicho parámetro, calculado a partir de las curvas de esfuerzo-deformación, se muestra en la Figura 6.6.

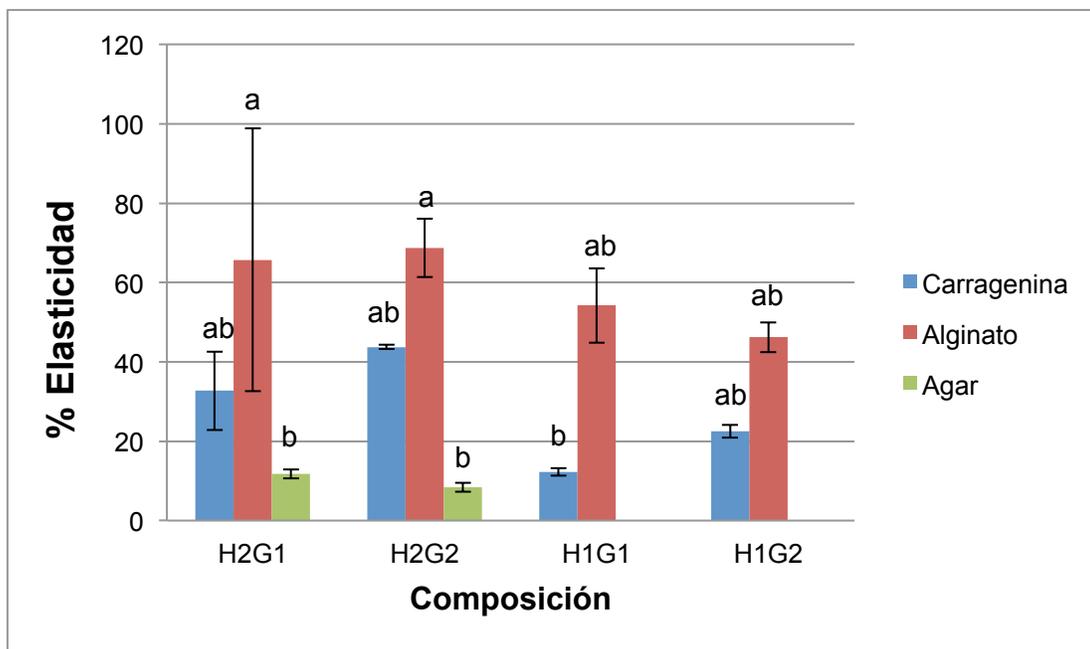


FIGURA 6.6 Elasticidad de las películas preliminares

El glicerol ha sido ampliamente usado como plastificante, pues ayuda a la elasticidad de las películas (Buortoon, T. 2008, Brachkoba, *et al.*, 2012) a diferencia de otros plastificantes, como el sorbitol que hace a las películas más duras (Al-Hassan y Norziah, 2012). En las dos concentraciones del plastificante estudiado, no hubo diferencia significativa entre ellas en ninguno de los casos. Esto se debe al agua presente que tiene características plastificantes y es difícil de controlar debido a la humedad relativa del ambiente, por lo tanto, la humedad de las películas enfatizó el efecto plastificante del glicerol (Ziani *et al.*, 2008).

Los resultados mostrados al ser comparados con los ya reportados con otros autores que utilizan polisacáridos en la matriz de las películas, son similares. Briones *et al.*, (2004), obtuvieron películas de carragenina-k con 5% de glicerol las cuales presentaron 156% de elasticidad, al aumentar la cantidad de plastificante, aumenta la elasticidad. En este trabajo, con la mayor concentración de glicerol (2%) se alcanzó un valor de elasticidad de 70%.

Por lo anterior, en los experimentos siguientes se incrementó la concentración de hidrocoloide, plastificante y de Tween 20. Además se agregó quitosano, que de acuerdo a la literatura, este polisacárido aumenta la resistencia, la cantidad de agua retenida y la conidiación de *Beauveria bassiana* (Bourtoom y Chinnan, 2008; Palma-Guerrero *et al.*, 2007).

6.2 Formulación de películas con quitosano

Una vez determinadas las concentraciones de trabajo, tanto de los polisacáridos como de los plastificantes, se incorporó quitosano el cual mejoró las características mecánicas de las películas obtenidas y ayudó al crecimiento de *Beauveria bassiana*. En la Tabla 6.2, se muestra el diseño de experimentos de esta etapa del proyecto

TABLA 6.2 Diseño de experimentos

Matriz	[%H]	[%G]	[%T]
Carragenina	3	3	2
	3	3	1
	3	2	2
	3	2	1
	2	3	2
	2	3	1
	2	2	2
	2	2	1
Alginato	3	3	2
	3	3	1
	3	2	2
	3	2	1
	2	3	2
	2	3	1
	2	2	2
	2	2	1

Las concentraciones de hidrocoloide fueron aumentadas puesto que a una mayor concentración existe una mayor resistencia de acuerdo a lo observado anteriormente en los experimentos preliminares y según reportes de otros autores (Briones *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Además el pH en estos experimentos, jugó un papel importante porque el quitosano es antimicrobiano y antifúngico por debajo de 5.5 y por arriba de 6.2 presenta precipitación (Simsek-Ege *et al.*, 2003).

La concentración de quitosano usada en todas las películas, 1 mg/mL, fue la misma debido a que a mayores concentraciones existe una separación de fases e inhibición del crecimiento del microorganismo de estudio (Palma-Gerrero *et al.*, 2007, Buortoom y Chinan 2008).

Es importante señalar que debido a los bajos resultados de resistencia y elasticidad presentados por el agar, fue descartado para el diseño de los experimentos. Sólo fueron utilizados carragenina-k y alginato de sodio en los estudios subsecuentes.

El aumento de la concentración del Tween 20 estuvo basado en que ayuda a relajar los enlaces en las interfases al ser adsorbido en la superficie de éstas y por lo tanto aumenta la humectabilidad y favorece la elasticidad de las películas (Ziani *et al.*, 2008).

Las películas de esta fase experimental fueron elaboradas en dos pasos. Primero se disolvieron el hidrocoloide y los nutrientes en 100 mL de agua destilada a temperatura de 80°C en una parrilla con agitación magnética. El tiempo de adición de los plastificantes, fue el mismo al establecido en la etapa de las pruebas preliminares, 10 minutos, con un tiempo total de agitación de 25 minutos.

En el segundo paso, se preparó la solución de quitosano junto con los plastificantes a la misma temperatura, 80°C pero por un tiempo menor de agitación (5 minutos). Cabe señalar que el quitosano se disolvió previamente en una solución de ácido acético al 1% debido a que no es soluble en agua (Balleño *et al.*, 2016). Esta solución presentó pH 4, por lo tanto fue necesario ajustarlo a pH 5.6 en la solución formadora de película mediante la adición de una solución de ácido tartárico al 10%.

Una vez realizadas las dos soluciones, la de quitosano fue incorporada a la primera solución, lentamente y con agitación constante. La solución final fue vaciada en los moldes previamente calentados para evitar que la gelificación se realizara instantáneamente por choque térmico.

Para las películas de alginato de sodio, una vez que la solución formadora de película se encontraba en el molde, fue necesario adicionar 20 mL de solución de CaCl_2 para gelificar por completo y evitar irregularidades tanto en la superficie como en la parte interna de la misma, por lo tanto el tiempo de contacto con la solución de calcio fue de 20 minutos en total. 10 minutos para cada cara de la película.

La sinéresis observada fue mayor que en las películas preliminares. Esto pudo deberse a que la red interna del arreglo molecular presentó un mayor desorden por la presencia del quitosano, debido a la compatibilidad entre los dos polisacáridos, por lo que se pudieron generar un mayor número de enlaces entre ambos dejando en segundo lugar la unión por iones Ca^+ .

Al igual que las preliminares, estas películas sufrieron una reducción de tamaño, tuvieron una superficie lisa y uniforme. Una vez desmoldadas fueron almacenadas a 4°C .

El procedimiento para la elaboración de las películas de carragenina-k fue el mismo que el de las películas de alginato pero esta vez sin la adición del CaCl_2 .

La solución resultante se vació al molde caliente y se formó la película al bajar la temperatura de la solución formadora, alrededor de los 45°C . Una vez enfriada por completo fue desmoldada fácilmente. La película final era transparente, lisa y uniforme. Esta vez sin presentar sinéres, posiblemente por la capacidad adsorbente del quitosano (Rinaudo, 2007) que retuvo el agua y evitó su exclusión instantánea.

Las películas obtenidas en este trabajo mediante mezcla de polisacáridos presentaron mejores características físicas que las películas sin adición de quitosano de las pruebas preliminares, donde no hubo mezcla de hidrocoloides. Este efecto puede observarse en reportes de otros autores con películas obtenidas de mezclas de polímeros como las de almidón y quitosano (Xu, et al., 2005), quitosano y alginato

(Carneiro da Cunha *et al.*), quitosano y celulosa (Duan *et al.*, 2012), pues las mezclas de polisacáridos favorecen la interacción entre las moléculas de los mismos logrando formar películas más resistentes

6.3 Actividad de agua de películas con quitosano

Como se comentó anteriormente, para el crecimiento de *Beauveria bassiana* es necesario cumplir con las condiciones adecuadas de actividad de agua. Los resultados se muestran en la tabla 6.3

TABLA 6.3 Actividad de agua de películas con quitosano

Matriz	Composición			a_w
	[H]	[G]	[T]	
Carragenina	2	2	1	0.998±0.001 ^a
	2	2	2	0.996±0.004 ^a
	2	3	1	0.998±0.001 ^a
	2	3	2	0.993±0.008 ^a
	3	2	1	0.999±0.000 ^a
	3	2	2	0.999±0.000 ^a
	3	3	1	0.999±0.000 ^a
	3	3	2	0.999±0.000 ^a
Alginato	2	2	1	0.998±0.001 ^a
	2	2	2	0.996±0.001 ^a
	2	3	1	0.995±0.006 ^a
	2	3	2	0.999± 0.000 ^a
	3	2	1	0.989±0.001 ^a
	3	2	2	0.998±0.001 ^a
	3	3	1	0.999±0.000 ^a
	3	3	2	0.994±0.006 ^a

Nota: Los resultados que no comparten letras son significativamente diferentes ($p < 0.05$)

La adición de quitosano tuvo un efecto positivo en la actividad de agua de las películas. De acuerdo a la tabla anterior, se observa un aumento significativo en los resultados de a_w respecto a los resultados obtenidos en las pruebas preliminares, donde el mejor fue de 0.95. Con este resultado se aseguró la disponibilidad de agua para el crecimiento del microorganismo de interés.

Como se mencionó anteriormente, el quitosano tiene la capacidad de retener gran cantidad de agua. Los resultados muestran dicha característica al no haber diferencias en ningún caso.

La a_w aumentó debido al efecto de la adición de quitosano, que además de ser adsorbente como ya se ha mencionado; por su naturaleza policatiónica, en solución, es capaz de formar una red electrolítica, que puede retener gran cantidad de agua (Rinaudo, 2007). Esto puede explicarse porque a un pH bajo (5.6) los grupos amino del quitosano se encuentran ionizados contribuyendo a una repulsión entre ellos permitiendo la expansión de la cadena y por lo tanto un aumento en la absorción del agua (Qu, 2000).

Sin embargo no se descarta que el incremento en la actividad de agua, también está relacionado con una mayor concentración de Tween 20, debido a que cuenta con una cadena hidrofílica que pudo captar más agua, contribuyendo al aumento en la actividad del agua (Zaini, 2008).

También se debe mencionar que el glicerol es un material de naturaleza hidrofílica haciendo a las películas higroscópicas con lo cual se aumenta la humedad de las películas (Bergo *et al.*, 2008, Osés *et al.*, 2009), contribuyendo a la retención de agua.

6.4 Características mecánicas de películas con quitosano

En la figura 6.7, se observan los resultados de los análisis de resistencia hechos a las películas adicionadas con quitosano.

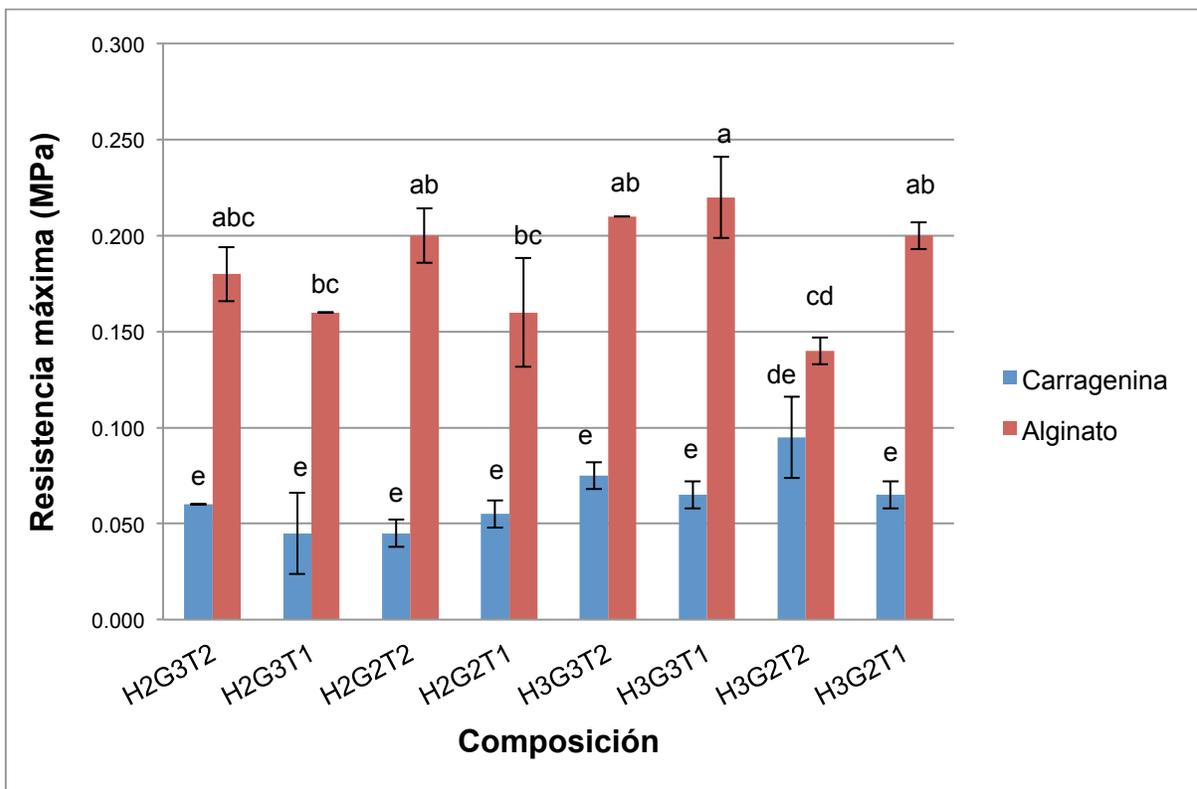


FIGURA 6.7 Resistencia de las películas de carragenina-κ y alginato adicionadas con quitosano

Nuevamente, se observa que los resultados son diferentes entre los hidrocoloides y no por efecto de las concentraciones de los plastificantes. Sin embargo, la carragenina-κ tuvo un aumento significativo en la resistencia debido a la unión entre el grupo amino del quitosano y el éster sulfato de la carragenina-κ, formando un fuerte complejo polielectrolítico (Piyakulawat *et al.*, 2006), permitiendo enlaces más estables en la estructura interna que se reflejan en el aumento de la resistencia mecánica de las películas.

Un complejo polielectrolítico se forma en disolución acuosa esto quiere decir que en presencia de agua se han unido gran cantidad de electrolitos de cargas opuestas, como la que se encuentran tanto en la carragenina-κ como en el alginato de sodio y el quitosano (Sakiyama *et al.*, 1993), resultando en un gel más resistente.

Carragenina-κ y alginato de sodio, son compuestos anionicos que poseen cargas positivas que al estar en presencia de quitosano, un polisacárido policatiónico, forman enlaces iónicos entre ellos dando como resultado polielectrolitos.

En las películas de alginato suplementadas con quitosano, la resistencia máxima, tuvo resultados muy parecidos a los de las películas preliminares del mismo hidrocoloide sin quitosano, posiblemente por el efecto combinado del Tween 20 y del glicerol que actúan como plastificantes y disminuyen la resistencia al relajar los enlaces entre las cadenas de polisacárido (Suppakul, *et al.*, 2006).

Además, en todas las películas el aumento en la actividad de agua hace evidente que existe una mayor cantidad de ella retenida en la matriz de las películas, como ya se ha dicho, el agua actúa como plastificante y junto con el glicerol y el Tween 20 este efecto se acentúa porque ambos son materiales hidrofílicos, por lo tanto la resistencia puede verse afectada por este hecho.

Sin embargo, si hubo un aumento en la resistencia, debido a que los grupos carboxilo del alginato forman un enlace fuerte con los grupos amino del quitosano haciendo estructuralmente más estables a las películas (Li, *et al.*, 2005).

Otro punto importante a considerar en el aumento de la resistencia, es el grado de deacetilación del quitosano relacionado al peso molecular, el utilizado en estos experimentos podría considerarse bajo, 75%; ya que hay quitosano con deacetilación del 96%; relacionado al peso molecular el que presenta menor grado de deacetilación tiene mayor peso molecular, por ende la resistencia y elasticidad también aumentan por la cantidad de enlaces monoméricos de la cadena principal del quitosano (Ziani *et al.*, 2008).

Lo expuesto anteriormente, puede corroborarse en la elasticidad, que tuvo un aumento en las películas de estos experimentos respecto a las preliminares. Se pueden observar en la figura 6.8 los resultados.

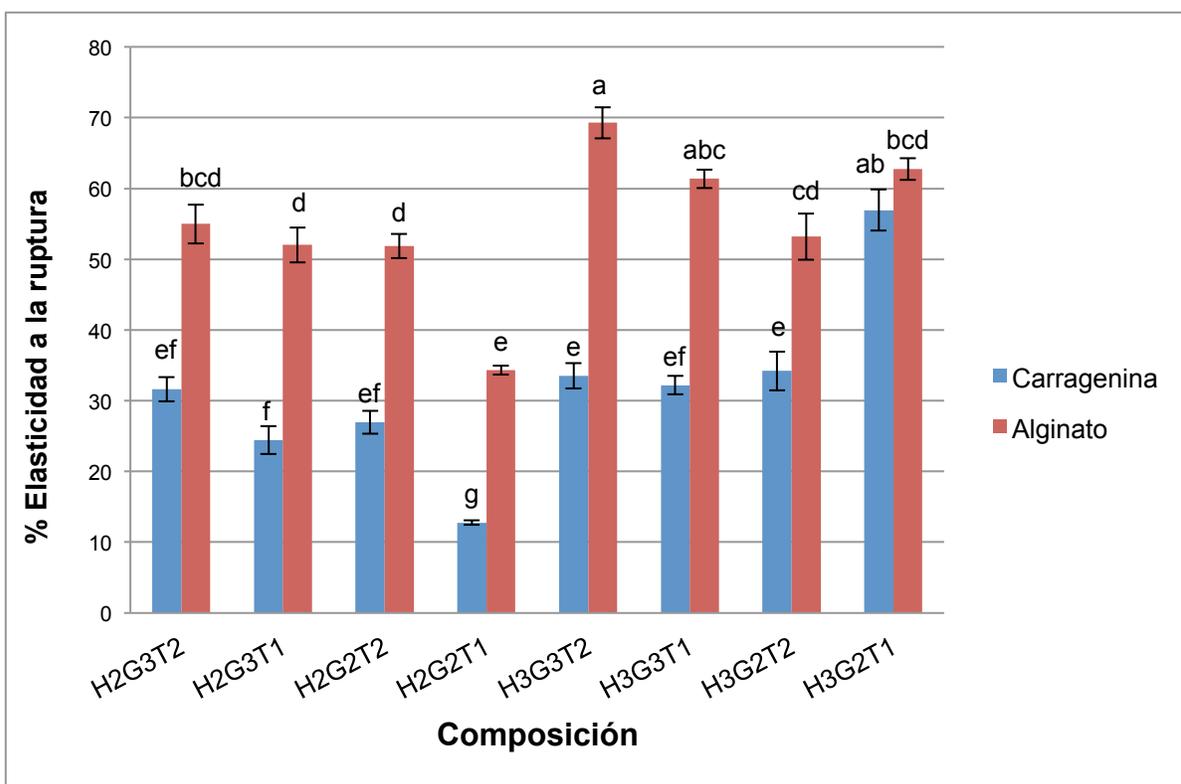


FIGURA 6.8 Elasticidad de películas de carragenina-κ y alginato adicionadas con quitosano

El aumento en la elasticidad, también se pudo deber al aumento en la concentración del plastificante, que es usado para incrementar la movilidad molecular mediante el decremento de la interacción de las cadenas poliméricas (Rodríguez *et al.*, 2006) y por lo tanto mejorar la flexibilidad de las películas. En este caso, el glicerol actuó como plastificante

Otra razón que causó dicho incremento, fue la combinación de Tween 20 y de glicerol. En esta serie de experimentos se utilizó una concentración mayor de ambos, por lo tanto hubo una mayor humectabilidad y cantidad de agua presente en la matriz, acentuando la capacidad plastificante en ambos componentes (Ziani, 2008).

Al haber una mayor concentración de Tween 20 la elasticidad aumenta considerablemente pues existe un sinergismo entre el surfactante y el plastificante, puesto que el primero es una molécula pequeña que puede interactuar entre las

cadena de los polisacáridos, al igual que el glicerol (Rodríguez *et al.*, 2006) lo que permite un mayor relajamiento .entre las cadena del polímero que se denota en el aumento de la elasticidad.

La diferencia estadística, nuevamente está marcada por el tipo de hidrocoloide. Se puede observar que la elasticidad de las películas de carragenina-k, no presentan diferencia significativa entre ellas, puede ser indicativo que ésta, se relaciona más a la cantidad de agua presente y no a la cantidad de plastificante. Solo la película codificada como H3G2T1 de carragenina-k tuvo un resultado de 57% de elasticidad, parecido a las películas de alginato. En dicha película, que contiene la menor concentración de glicerol y Tween 20, se observa un resultado contrario a lo expuesto, donde una menor cantidad de plastificante tuvo un efecto positivo sobre la elasticidad, posiblemente porque la carragenina pura es más hidrofílica (Alves *et al.*, 2006), y al haber menor cantidad de otros componentes se aumenta la cantidad de agua en la matriz haciendo evidente su poder plastificante.

Las características mecánicas observadas en las películas, resultaron adecuadas para la manipulación y para ser evaluadas como soporte, ya que durante esta evaluación, se mantuvieron 12 días de forma colgante en un ambiente de humedad relativa alta. Sin embargo, no todas las películas fueron evaluadas para el crecimiento, sólo se seleccionaron cinco, las tres más resistentes de alginato, por ser más resistentes y las dos mejores de carragenina-k ya que éstas no presentan sinéresis ni reducción de tamaño.

6.5 Funcionalidad de las películas como soporte de crecimiento.

Una vez analizadas las características mecánicas de las películas y seleccionadas las mejores se procedió a realizarlas bajo condiciones estériles. Para lograrlo, los componentes de las mismas, nutrientes y plastificantes, se prepararon en soluciones stock. Éstas junto con el agua, fueron esterilizadas en autoclave durante 15 minutos

a 15 libras de presión. El material de vidrio y los moldes fueron lavados y posteriormente mantenidos en estufa a 120°C durante 12 horas.

Para mantenerlas colgadas todo el tiempo de la incubación, fueron usados frascos de vidrio a los que se les colocó una varilla de vidrio en la parte superior, cerca de la boca del frasco y se les sujetó con una pinza de agarre.

Una vez que las películas estuvieron listas, una cantidad conocida de ellas, 5 g, fue ocupada para ser inoculada. Con una asa microbiológica fueron recogidas las conidias de *Beauveria bassiana* de un cultivo en tubo inclinado para luego estriar ambas caras de las películas e inocularla durante 12 días a una temperatura de 25°C con humedad relativa (%HR) del 100% y ciclo de 24 horas de luz. Para alcanzar la saturación de humedad en el frasco se adicionaron 10 mL de agua estéril al fondo del mismo. En la figura 6.9 se muestran los sistemas de incubación para las películas.

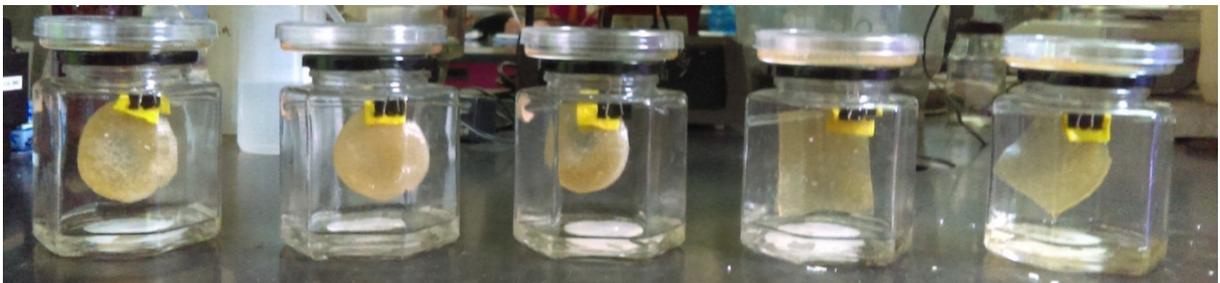


FIGURA 6.9 Sistema para la incubación de las películas
De izquierda a derecha: A3G2T2, A3G3T2, A3G3T1, C3G3T2 y C3G2T2.

Las películas inoculadas, en la figura anterior, se muestran en el día 1 de la incubación. Puede observarse que ninguna de ellas presenta algún signo de rasgadura o desprendimiento comprobando que pudieron soportar la manipulación.

Las condiciones de incubación ya mencionadas, fueron determinadas debido a que la luz continua, la temperatura en un rango de 24-28 °C y la humedad relativa alta

(90-100%), favorecen el crecimiento del hongo en estudio.(Berlanga y Hernández, 2002; Godoy *et al.*, 2007; Barjas, *et al.*, 2009;).

Después de 12 días de incubación sólo las películas de carragenina-k (C3G3T2 Y C3G2T2) mostraron un alto crecimiento en ambas caras. Esto quiere decir que la película actúa como sustrato adecuado por tener la cantidad de nutrientes disponibles así como el agua necesaria para que *Beauveria bassiana* pueda desarrollarse.

Las películas de alginato no mostraron crecimiento alguno. Estos resultados se deben a la disponibilidad de nutrientes, puesto que en las películas de alginato con quitosano se forman complejos polielectrolíticos capaces de encapsular proteínas (Simsek, *et al.*, 2003) que limitaron la fuente de nitrógeno para *Beauveria bassiana*, en este caso, la proteína de maíz. Además y debido a la sinéresis, las conidias inoculadas en la superficie pudieron desprenderse por el escurrimiento del agua.

En la figura 6.10, puede observarse el crecimiento del hongo en las películas después de 12 días de incubación.

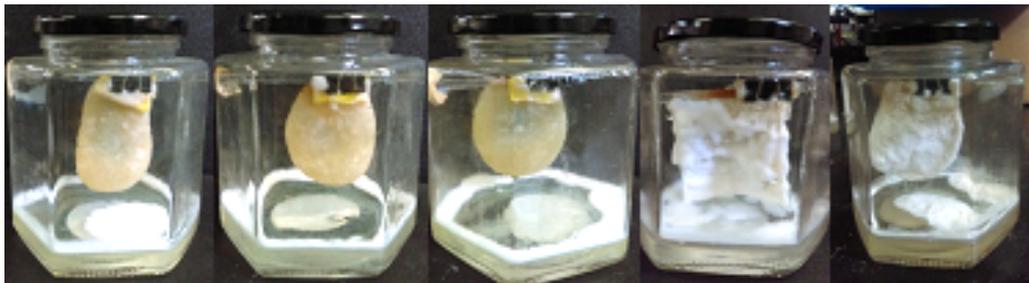


FIGURA 6.10 Crecimiento de *Beauveria bassiana*

Una vez finalizado el tiempo de incubación, en las películas que mostraron crecimiento, se realizó el conteo de esporas en cámara Neubauer, mediante diluciones seriadas. Para ello, la totalidad de la película se sumergió en 100 mL de una solución estéril de Tween 80 al 0.05% y se agitó en un vortex durante 5 minutos

hasta el desprendimiento total de las conidias de la superficie. Una vez recuperadas las esporas en el agua, se tomó 1 mL de la solución de esporas y se adicionó a un tubo con 9 mL de agua destilada, no fueron necesarias más diluciones. Posteriormente, 10 μ L de la solución diluida de esporas fueron puestos en la cámara de Neubauer para el conteo final de las conidias.

Los resultados fueron 2×10^9 esporas/g de sustrato para la película C3G2T2 y 1×10^{10} esporas/g de sustrato para la película C3G3T2. La diferencia en la cantidad de esporas pudiera estar en la humedad de la superficie, puesto que una mayor cantidad de glicerol existe una mayor cantidad de agua. El plastificante, que tiene naturaleza hidrofílica, también actuó como humectante y este factor ayudó al desarrollo de *Beauveria bassiana*

La producción de dicho hongo se realiza en fermentación sólida utilizando como sustrato arroz principalmente, donde se alcanza una cantidad de 3×10^{10} esporas/g de sustrato. La producción es muy parecida a la obtenida en este trabajo.

Existen trabajos ya reportados con el uso de biopolímeros en el uso de crecimiento de hongos filamentosos. Accinelli *et al.*, (2012) usaron gránulos de almidón de maíz inoculados con *Aspergillus flavus* no toxigénico para controlar la producción de aflatoxinas en el cultivo de maíz. Muestran resultados positivos en el crecimiento del hongo en la superficie y por lo tanto el desplazamiento de cepas nativas del género *Aspergillus* productores de aflatoxinas.

Otro trabajo que muestra polisacáridos en el crecimiento de microorganismos en películas, es el realizado por Brachkova *et al.*, (2012) en el cual se inmovilizaron *Lactobacillus plantarum* y desmostaron que después de 6 meses de almacenados seguían viables para ser utilizado como material de curación en heridas.

Tanto en la literatura como en este trabajo se demuestra que el uso de polisacáridos hace posible el crecimiento y además la viabilidad para propagarse o mantenerse activos a pesar del almacenamiento.

Todavía hacen falta más estudios para lograr un mejor desarrollo de los microorganismos y mejores características mecánicas de las películas obtenidas.

7 CONCLUSIONES

- Los poliscáridos mostraron compatibilidad entre ellos mediante la formación de complejos polielectrolíticos y por lo tanto las películas pudieron formarse.
- El alginato unido al quitosano mostró mayor resistencia y elasticidad que la carragenina-k unida al quitosano.
- La adición de quitosano y el aumento en las concentraciones de Tween 20 y glicerol a las formulaciones mejoraron las características mecánicas y la actividad de agua en las películas.
- La elasticidad de las películas fue favorecida por el efecto plastificante del agua.
- El crecimiento de *Beauveria bassiana* sólo en las películas de carragenina-k fue posible por la disponibilidad de nutrientes y la humedad en su superficie.

8 BIBLIOGRAFÍA

Accinelli, C. y Abbas, H. K. 2011. New perspectives for the application of bioplastic materials in the biocontrol of *Aspergillus flavus* in corn. *Toxin Reviews*, **30**(2-3): 71-78.

Alves, S. B., L. S. Rossi, R. B. Lopes, M. A. Tamai, and R. M. Pereira. 2002. *Beauveria bassiana* yeast phase on agar medium and its pathogenicity against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Invertebrates Pathology*. **81**(2): 70-77.

Alves, V., Costa, N., Hilliou, L., Larotonda, F., Gonçalves, M., Sereno, A., y Coelho, I. (2006). Design of biodegradable composite films for food packaging. *Desalination*, **199**(1-3), 331-333.

Ames de Icochea, T. y Cañedo V. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. pp. International Potato Center.

Armisen, R. (1997). Agar. In Thickening and gelling agents for food (pp. 1-21). Springer US.

Balleño, A., Ríos, N., Aranda-García, F. J., Morales, J. A., Mendizábal, E., & Katime, I. (2016). Hidrogeles de alginato–quitosano y alginato–sulfato de quitosano para la remoción de iones cobre. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, **17**(5):255-265.

Barajas-Ontiveros, C. G., Morales-Romano, M.D., Del Pozo-Nuñez, E. M., Rodríguez-Aguilar, M. de L., y Núñez-López J. J., 2009. Condiciones para el desarrollo de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de chapulín frijolero. *Tecnociencia Chihuahua*. **3**(1):33-38.

Berlanga Padilla, A. M., y Hernández Velázquez, V. H. (2002). Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la virulencia de *Metarhizium anisopliae*, M. a. var. *acidum* y *Beauveria bassiana* en *Schistocerca piceifrons piceifrons*. **63**:51-55

Bergo, P., y Sobral, P. J. A. (2007). Effects of plasticizer on physical properties of pigskin gelatin films. *Food Hydrocolloids*, **21**(8), 1285-1289.

Bergo, P., Sobral, P. J. A., y Priston, J. M. (2010). Effect of glycerol on physical properties of cassava starch films. *Journal of Food Processing and Preservation*, **34**(s2):401-410.

Blanco-Alvarez, F. (2016). Lección 2. Propiedades Mecánicas. Escuela Superior de Minería. Universidad de Oviedo.

Boucias, D. G., Pendland, J. C., y Latge, J. P. (1988). Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic deuteromycetes to host insect cuticle. *Applied and environmental microbiology*, **54**(7), 1795-1805.

Bósquez-Molina, E., y Vernon-Carter, E. J. (2005). [www. redalyc. org](http://www.redalyc.org). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, **4**(2), 157-162.

Boucias, D. G. y Pendland, J. C. (1991). Attachment of mycopathogens to cuticle. pp. 101-127. En: *The fungal spore and disease initiation in plants and animals*, 1st. ed. (Ed. Garry T. Cole y Harvey C. Hoch). Springer US, New York.

Bourtoom, T., 2008. Review article. Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal* **15**(3): 237-248

Bourtoom, T., y Chinnan, M. S. (2008). Preparation and properties of rice starch–chitosan blend biodegradable film. *LWT-Food Science and Technology*, **41**(9), 1633-1641.

Brachkova, M. I., Duarte, A., y Pinto, J. F., 2012. Alginate films containing viable *Lactobacillus plantarum*: preparation and in vitro evaluation. *AAPS PharmSciTech*, **13**(2): 357-363.

Briones, A. V., Ambal, W. O., Estrella, R. R., Pangilinan, R., De Vera, C. J., Pacis, R. L. y Villanueva, M. A. (2004). Tensile and tear strength of carrageenan film from Philippine *Eucheuma* species. *Marine Biotechnology*, **6**(2), 148-151.

Bustillo-Pardey, A. E. (2006). A review of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), in Colombia. *Revista Colombiana de Entomología*, **32**(2):101-116.

BUSTILLO P, A. E. (2001). Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. *Seminario sobre Uso de Entomopatógenos en Colombia. Bogotá (Colombia), Octubre 12, 2001.*

Butler, B. L., Vergano, P. J., Testin, R. F., Bunn, J. M., y Wiles, J. L. (1996). Mechanical and barrier properties of edible chitosan films as affected by composition and storage. *Journal of food science*, **61**(5), 953-956.

Charnley, A. K. (2007). Entomopathogenic fungi and their role in pest control. pp:185-201. En: *Environmental and microbial relationships. The Mycota IV*, 2nd Edition. (Eds. C.P. Kubicek e I.S. Druzhinina). Springer. Verlag Berlín Heidelberg

Chen, R. H., Lin, J. H., & Yang, M. H. (1994). Relationships between the chain flexibilities of chitosan molecules and the physical properties of their casted films. *Carbohydrate Polymers*, **24**(1), 41-46.

Debeaufort, F., Martin-Polo, M. and Voilley, A. 1993. Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *Journal of Food Science*, **58**(2): 426-434.

Draget, K. I., Gåserød, O., Aune, I., Andersen, P. O., Storbakken, B., Stokke, B. T., & Smidsrød, O. (2001). Effects of molecular weight and elastic segment flexibility on syneresis in Ca-alginate gels. *Food Hydrocolloids*, **15**(4), 485-490.

Driesche, R. G., y Bellows, T. S. J. (1996). *Biological Control*. pp: 539. 1st Edition. Chapman & Hall. New York

Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C., 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*. **46**(4):387- 400.

Eyal, J., Walter, J. F., Osborne, L. y Landa, Z. 1994. U.S. Patent No. 5,360,607.

Feng, M. G., Poprawski, T. J. y Khachatourians, G. G. 1994. Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* for insect control: current status. *Biocontrol Science and Technology*, **4**(1):3-34.

Ferron, P., Fargues, J., y Riba, G. (1991). Fungi as microbial insecticides against pests. pp: 665-706 En: *Handbook of applied mycology*, 2nd Edition. (Eds. D. K. Ajillos y L. K. G. Mukerji) Marcel and Dekker, Inc. Nueva York.

Funami, T., Fang, Y., Noda, S., Ishihara, S., Nakauma, M., Draget, K. I. y Phillips, G. O. (2009). Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca 2+ binding. *Food Hydrocolloids*, **23**(7), 1746-1755.

García, M. R. (2002). Resistencia de materiales (Vol. 12). Publicacions de la Universitat Jaume I.

Ghanbarzadeh, B., Oromiehie, A. R., Musavi, M., D-Jomeh, Z. E., Rad, E. R., y Milani, J. 2006. Effect of plasticizing sugars on rheological and thermal properties of zein resins and mechanical properties of zein films. *Food research international*, **39**(8):882-890.

Godoy, J., Valera, R., Guédez, C., Cañizalez, L., & Castillo, C. (2007). Determinación de temperatura y humedad óptima para la germinación y esporulación de cinco aislamientos de *Beauveria bassiana*. *Revista de la Facultad de Agronomía*, **24**(3):415-425.

Hajek, A.E. y St. Leger, R.J., 1994. Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*. **39**(1):293-322.

Hallsrwrth, J E and Magan, N. (1999). Water and temperature relations of growth of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana*, *Metharhizium anisopliae* and *Paecylomces farinosus*. *Journal of Invertebrate Pathology*. **74**(3):261-266.

Hernández-Velázquez, V. M. y Berlanga-Padilla, A. M., 1999. Uso de *Beauveria bassiana* como insecticida microbial. Ficha técnica CB-03. SAGARPA.

Kang, S. C., Park, S. y Lee, D. G. (1999). Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. *Journal of invertebrate pathology*, **73**(3):276-281.

Khan, T., Park, J. K., y Kwon, J. H. (2007). Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. *Korean Journal of Chemical Engineering*, **24**(5), 816-826.

Jenkins, N. E., y Goettel, M. S. (1997). Methods for mass-production of microbial control agents of grasshoppers and locusts. *Memoirs of the Entomological Society of Canada*, **129**(S171), 37-48.

Lai, V. M. F., Wong, P. L., y Lii, C. Y. (2000). Effects of Cation Properties on Sol-gel Transition and Gel Properties of κ -carrageenan. *Journal of food science*, **65**(8), 1332-1337.

Li, Z., Ramay, H. R., Hauch, K. D., Xiao, D., & Zhang, M. (2005). Chitosan–alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, **26**(18), 3919-3928.

Mangione, M. R., Giacomazza, D., Bulone, D., Martorana, V., Cavallaro, G., y San Biagio, P. L. (2005). K⁺ and Na⁺ effects on the gelation properties of κ -carrageenan. *Biophysical Chemistry*, **113**(2), 129-135.

Medina-Guzman, H. 2009. Física 2. Repositorio Pontificia Universidad Católica de Perú. pp 1-15

Monzón, A. (2001). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo integral de plagas*. **63**(1):95-103

Neves, P. J. y Alves, S. B. 2000. Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **43**(4):373-378.

Nuñez-Gaona, O., Saucedo-Castañeda, G., Alatorre-Rosas, R. y Loera, O. 2010. Effect of moisture content and inoculum on the growth and conidia production by *Beauveria bassiana* on wheat bran. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **53**(4):771-777.

Olsvik, E. S. y Kristiansen, B. 1992. On-line rheological measurements and control in fungal fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, **40**(3):375-387.

Onsoyen, E. (1997). Alginates. In Thickening and gelling agents for food (pp. 22-44). Springer US.

Osés, J., Niza, S., Ziani, K., y Maté, J. I. (2009). Potato starch edible films to control oxidative rancidity of polyunsaturated lipids: effects of film composition, thickness and water activity. *International Journal of food science & technology*, **44**(7):1360-1366.

Palma-Guerrero, J., Jansson, H. B., Salinas, J., y Lopez-Llorca, L. V. (2008). Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. *Journal of applied Microbiology*, **104**(2):541-553.

Parris, N. y Coffin, D. R., 1997. Composition factors affecting the water vapor permeability and tensile properties of hydrophilic zein films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**(5):1596-1599.

Pazouki M. y Panda T., 2000. Understanding the morphology of fungi. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **22**(2):127-147.

Pekrul, S., y Gula, E. A. (1979). Mode of infection of the corn earworm (*Heliothis zea*) by *Beauveria bassiana* as revealed by scanning electron microscopy. *Journal of Invertebrate Pathology*, **34**(3):238-247.

Piyakulawat, P., Praphairaksit, N., Chantarasiri, N., & Muangsin, N. (2007). Preparation and evaluation of chitosan/carrageenan beads for controlled release of sodium diclofenac. *Aaps PharmSciTech*, **8**(4).120-130.

Qu, X., Wirsén, A., & Albertsson, A. C. (2000). Novel pH-sensitive chitosan hydrogels: swelling behavior and states of water. *Polymer*, **41**(12):4589-4598.

Rodríguez Dos Santos, A., y del Pozo Núñez, E. (2003). Aislamiento de hongos entomopatógenos en Uruguay y su virulencia sobre *Trialeurodes vaporariorum* West. *Agrociencia*, **7**(2):71-78.

Rinaudo, M. (2007). Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in polymer science*, **31**(7):603-632.

Saha, D. and Bhattacharya, S. (2010). Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of Food Science and Technology*. **47**(6):587-597.

Salame, (1986). Barrier polymers. En: *Wiley encyclopedia of packaging technology*. p.48-54 1st. ed. (Ed. Bakker, M., y Eckroth, D.), John Wiley and Sons, New York.

Samson, R. A., Evans, H. C., y Latgé, J. P. (2013). Fungal pathogenesis. En: *Atlas of entomopathogenic fungi*. pp:128-139. 1st Edition. Springer-Verlag. Heidelberg, Berlín

Santa, H. S. D., Santa, O. R. D., Brand, D., Vandenberghe, L. P. D. S. y Soccol, C. R. 2005. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **48**:51-60.

Simsek-Ege, F. A., Bond, G. M., y Stringer, J. (2003). Polyelectrolyte complex formation between alginate and chitosan as a function of pH. *Journal of Applied Polymer Science*, **88**(2), 346-351.

Scope, R. K. 1994. Separation by precipitation, p. 71-101 En: Protein purification; Principles and practice, (Ed. Scope, R.K.). Springer-Verlag, New York.

Suppakul, P., Chalernsook, B., Ratisuthawat, B., Prapasitthi, S. y Munchukangwan, K. 2006, October. Plasticizer and Relative Humidity Effects on Mechanical Properties of Cassava Flour Films. In *The 15th IAPRI World Conference on Packaging; 3-5 October 2006 Tokyo, Japan*.

Talja, R. A., Peura, M., Serimaa, R., y Jouppila, K. (2008). Effect of amylose content on physical and mechanical properties of potato-starch-based edible films. *Biomacromolecules*, **9**(2), 658-663.

Tanada, Y. y Kaya, H. 1993. *Insect pathology*. Academic Press, New York. p.664

Thomas, W. R. (1997). Carrageenans. In *Thickening and gelling agents for food* (pp. 45-59). Springer US.

Tongdeesoontorn, W., Mauer, L. J., Wongruong, S., Sriburi, P. y Rachtanapun, P. 2011. Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central Journal*, **5**(6): 1-8.

Tobar-Hurtado, S. P., Vélez-Arango, P. E., y Montoya-Restrepo, E. C. (1999). Selección en laboratorio de aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* por resistencia a la luz ultravioleta. *Cenicafé*, **50**(4):327-337.

Trius, A. y Sebranek, J. G. (1996). Carrageenans and their use in meat products. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, **36**(1-2), 69-85.

Velings NM, Mestdagh MM. 1995. Physico-chemical properties of alginate gel beads. *Polymer Gels and Networks*. **3**:311–330.

Wang, L. Z., Liu, L., Holmes, J., Kerry, J. F., & Kerry, J. P. (2007). Assessment of film-forming potential and properties of protein and polysaccharide-based biopolymer films. *International journal of food science & technology*, **42**(9), 1128-1138.

Wright, S. P., Carruthers, R. I., Jaronski, S. T., Bradley, C. A., Garza, C. J. y Galaini-Wright, S., 2000. Evaluation of the Entomopathogenic Fungi *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* for Microbial Control of the Silverleaf Whitefly, *Bemisia argentifolii*. *Biological Control* **17**(3): 203–217.

Wright, S. P., Jackson, M. A. y De Kock, S. L. 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biological agents. pp. 253-287. En: *Fungal Biological Agents-Progress, Problems and Potential*. 1st. ed. (Eds. Butt T, Jackson C y Magan N), CAB International, Wallingford, UK.

Wu, C. S. 2008. Characterizing Biodegradation of PLA and PLA-g-AA/Starch Films Using a Phosphate-Solubilizing Bacillus Species. *Macromolecular bioscience*, **8**(6): 560-567.

Xiao, D., Gömmel, C., Davidson, P. M., & Zhong, Q. (2011). Intrinsic Tween 20 improves release and antilisterial properties of co-encapsulated nisin and thymol. *Journal of agricultural and food chemistry*, **59**(17), 9572-9580.

Xu, Y. X., Kim, K. M., Hanna, M. A. y Nag, D. 2005. Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, **21**(2):185-192.

Yang, L. y Paulson, A. T. 2000. Effects of lipids on mechanical and moisture barrier properties of edible gellan film. *Food Research International*, **33**(7), 571-578.

Ziani, K., Oses, J., Coma, V., y Maté, J. I. (2008). Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. *LWT-Food Science and Technology*, **41**(10): 2159-2165.