

**MICROENCAPSULACIÓN DE UN BIOINSUMO OBTENIDO A PARTIR DEL
BENEFICIO DE FIQUE (*Furcraea andina*) PARA EL MANEJO DEL HONGO
*Botrytis cinerea***

**KEWIN ANDRES BARRAGAN MONTOYA
OSCAR DUVAN VILLAMIZAR VERGARA**

TESIS EN MODALIDAD DE INVESTIGACIÓN

**DIRECTORA:
ALIS YOVANA PATAQUIVA MATEUS, IQ., MSc., PhD.
CO-DIRECTORA:
LUZ STELLA FUENTES, I.A., MSc., PhD (c)**

**UNIVERSIDAD JORGE TADEO LOZANO
Departamento de Ingeniería
Programa de Ingeniería Química
Bogotá, D.C-Colombia
2018**

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. METODOLOGIA.....	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	9
5. CONCLUSIONES.....	17
6. RECOMENDACIONES.....	17
7. AGRADECIMIENTOS	18
8. REFERENCIAS	18
9. ANEXOS.....	22

1. RESUMEN

Se preparó un bioinsumo microencapsulado, obtenido mediante tratamientos al beneficio del fique (*Furcraea Andina*) y se evaluaron las propiedades antimicrobianas en el Centro de Biosistemas de la Universidad Jorge Tadeo Lozano. Evaluando el control sobre el hongo *Botrytis cinerea*, especie fitopatógena capaz de atacar a más de 200 tipos de plantas y, un gran problema en la agricultura; se comparó la efectividad del bioinsumo microencapsulado, en diferentes proporciones (alginato:extracto) y con diferentes soluciones de extracto (acuoso & etanólico). Las mediciones de control de crecimiento se hicieron durante diez días, mediante pruebas *in vitro*, teniendo en cuenta la cantidad en peso de las microcápsulas (de extracto acuoso y de extracto etanólico) en el medio (PDA). Se realizó una caracterización física, química y biológica para las microcápsulas, donde se obtuvo un diámetro promedio de entre 1,320 mm - 2,040 mm, esto dependiente del diámetro de aguja empleado en el microencapsulador. La estructura de las microcápsulas acuosas posee diferente morfología en relación con las microcápsulas etanólicas, esto se identifica mediante microscopia electrónica de barrido (SEM); químicamente se evidencia mediante espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FT-IR), diferencia en el pico a la longitud comprendida de 1400 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} para las microcápsulas acuosas y las microcápsulas etanólicas, lo cual refleja la insolubilidad de la celulosa con el agua, dando así la mayor diferencia entre las microcápsulas acuosas respecto a las microcápsulas etanólicas. Dichos procedimientos se realizaron con el fin de establecer la viabilidad del desarrollo de microcápsulas de extracto (acuoso y/o etanólico) para el control del hongo *Botrytis*, teniendo mediante las pruebas *in vitro*, se dio una alteración en su crecimiento normal usando las microcápsulas de extracto acuoso, mientras que, para las microcápsulas realizadas con el extracto etanólico, se presentan para el tratamiento T1 el mejor porcentaje de inhibición, con un valor de 12.5%.

Palabras clave: Fique, Microencapsulación, Extracto acuoso, *Extracto etanólico*, *Botrytis cinerea*.

ABSTRACT

A microencapsulated bioinsumption was prepared, obtained by means of treatments to benefit the fique (*Furcraea Andina*) and the antimicrobial properties were evaluated in the Biosystems Center of the Jorge Tadeo Lozano University. Evaluating the control over the fungus *Botrytis cinerea*, phytopathogenic species capable of attacking more than 200 types of plants and great problem in agriculture; the effectiveness of microencapsulated bioinsumption was compared, in different proportions (alginate:extract) and with different extract solutions (aqueous & ethanolic). The growth control measurements were made for ten days, by *in vitro* tests, taking into account the amount by weight of the microcapsules (aqueous extract and ethanolic extract) in the medium (PDA). A physical, chemical and biological characterization was performed for the microcapsules, where an average diameter of between 1.320 mm - 2.040 mm was obtained, this depending on the diameter of the needle used in the microencapsulator. The structure of the aqueous microcapsules has different morphology in relation to the ethanolic microcapsules, this is identified by scanning electron microscopy (SEM), chemically evidenced by infrared spectroscopy by Fourier transform (FT-IR), difference in the peak at the length comprised of 1400 cm^{-1} to 1000 cm^{-1} for aqueous microcapsules and ethanolic microcapsules, which reflects the insolubility of cellulose with water, thus giving the greatest difference between aqueous microcapsules with respect to ethanolic microcapsules. Said procedures were carried out with the purpose of establishing the viability of the development of microcapsules of extract (aqueous and / or ethanolic) for the control of the fungus *Botrytis*, having through the *in vitro* tests, there was an alteration in its normal growth using the microcapsules of extract aqueous, whereas, for the microcapsules made with the ethanol extract, the best percentage of inhibition is presented for the T1 treatment, with a value of 12.5%.

Keywords: Fique, Microencapsulation, Aqueous extract, Ethanolic extract, *Botrytis*.

2. INTRODUCCION

El fique, materia prima utilizada por los agricultores para la obtención de cabuya, representa solo un 4% del material desfibrado y lavado, mientras que el restante se desecha, siendo un 70% efluente líquido (Rojas & Luque, 2012). Dicho líquido es de alto impacto ambiental dada su toxicidad para los peces y demás organismos acuáticos, debido a su contenido de compuesto como azúcares, alcoholes, saponinas, y alcaloides entre otros (Martínez & Caicedo, 2002).

La principal producción de fique en Colombia se da en la región andina, con trece departamentos, siendo los más representativos Boyacá, Santander, Nariño, Cauca y Antioquia, y 72 municipios, que representan más de 23,000 hectáreas de cultivo (Peinado et al., 2006). De hecho, el departamento del Cauca posee la mayor superficie cultivada la cual estima un total de 10.349 toneladas métricas en fique (Chaverra, Walteros, & Santamaría, 2010). Además, la producción de fique se lleva a cabo en un contexto económico de campesinado beneficiando a más de 70.000 familias en el país (Castellanos et al., 2009).

El jugo de fique (desecho obtenido por el desfibrado en el beneficio de *Furcraea andina*), representa un impacto negativo debido al poder contaminante otorgado por sus propiedades fisicoquímicas, las cuales lo hacen un producto de interés para el control de plagas y enfermedades desde el punto de vista de la química verde, diseñando así procesos de producción más limpia (Martínez & Caicedo, 2002).

En la práctica agrícola, se deben enfrentar diferentes plagas y enfermedades, una muy común e importante para la industria agrícola es la “podredumbre gris”, la cual es causada por el hongo *Botrytis cinerea* (Alvarez, 1982). Esta especie es capaz de infectar a más de 200 especies distintas de vegetales (Benito & Arranz, 2000). Debido a su incidencia y las repercusiones económicas que este tiene, se han realizado estudios sobre la biología de este, y sobre los posibles métodos de control (Benito & Arranz, 2000) para esto, se usan los plaguicidas, sustancias destinadas a prevención, destrucción o control de animales, plantas y microorganismos dañinos (Alfonso, 2002).

El uso indiscriminado de fertilizantes y plaguicidas ha causado la degradación de los recursos naturales, lo cual ha llevado al hombre a generar nuevas alternativas de producción de alimentos, que tienen como prioridad el cuidado del medio ambiente (Jiménez, 2007). Hoy en día, se tiene como tendencia el uso de la capacidad biocida de muchas de las plantas que se cultivan, debido al potencial en composición de diferentes grupos químicos tales como: saponinas, flavonoides, poliacetilenos, quinonas y terpenos (Kaufman et al., 1999; Putman, 1988).

El jugo de fique, como efluente contaminante producido del beneficio del fique, es un residuo que se considera como un insumo de alto potencial biocida, debido a su composición, teniendo en mayor porcentaje agua con un valor de 85%, seguido de una parte orgánica (sacarosa, proteínas, N₂, P, Ca, K, saponinas, saponinas) con un 8%, celulosa en un 6% y minerales con un valor de 1% (Gómez & Vanegas, 2001).

Estudios previos en el Laboratorio de Nanotecnología de la Universidad Jorge Tadeo Lozano, realizados con el residuo líquido del proceso de desfibrado de la planta de fique, se obtuvieron tres diferentes tipos de bioinsumo estabilizado: BLE (Bioinsumo Líquido Estabilizado), BFE (Bioinsumo Liofilizado Estabilizado) y BSS (Bioinsumo a base de Saponinas y Saponinas). Teniendo como base los resultados del estudio de actividad biocida sobre diferentes plagas, se concluyó que el BFE posee las mejores características para el control de éstas (Bastidas, 2014).

La microencapsulación es una técnica que se ha convertido en una alternativa importante en el desarrollo de sistemas novedosos de liberación (Rojas-Aguirre, Aguado-Castrejón, & González-Méndez, 2016). Por otro lado, técnicas como secado por atomización (Mondragón, Julia, Barba, & Jarque, 2013) y evaporación de solventes (Uribe et al., 2004), se consideran las más estudiadas a la hora de encapsular biomoléculas; mientras que la técnica de doble emulsión-evaporación de solvente es la más usada a nivel investigativo y para la obtención de productos que se encuentran en el mercado (Saez, Hernández, & Peniche, 2007).

Se tiene que el uso de microcápsulas permite la liberación controlada del principio activo contenido en esta (Guevara & Jiménez, 2008), gracias a los diferentes tipos de encapsulantes que se pueden utilizar, dentro de los vehículos encapsulantes en la técnica de microencapsulación, se destacan: alginato de sodio (Lupo, González, & Maestro, 2012), dextrana (Hernández et al., 2016), goma arábiga (Ramírez, 2013) y el quitosano (Flores, 2013), para generar microcápsulas por medio de gelificación. La gelificación tiene como propósito la liberación del ion calcio desde un complejo insoluble en una solución de alginato de sodio, mediante un proceso de acidificación de un sistema aceite-ácido soluble, teniendo al alginato como participante en la fase acuosa. Esta técnica permite obtener partículas de un tamaño de 50 μm aproximadamente (Liu, Rauth, & Wu, 2007). Tal como se muestra en la Figura 1, se parte de una solución del alginato de sodio mezclada con la muestra de interés, que al formar la gota y caer en la solución de CaCl_2 se realiza un intercambio iónico (iones Na^+ e iones Cl^-) mejorando las propiedades mecánicas de las microcápsulas obtenidas. Se debe ser cuidadoso con el tiempo de contacto entre las microcápsulas y la solución de CaCl_2 para evitar la difusión del principio activo por gradiente de concentración durante tiempos prolongados (Villena, Hernández, Lara, & Martínez, 2009).

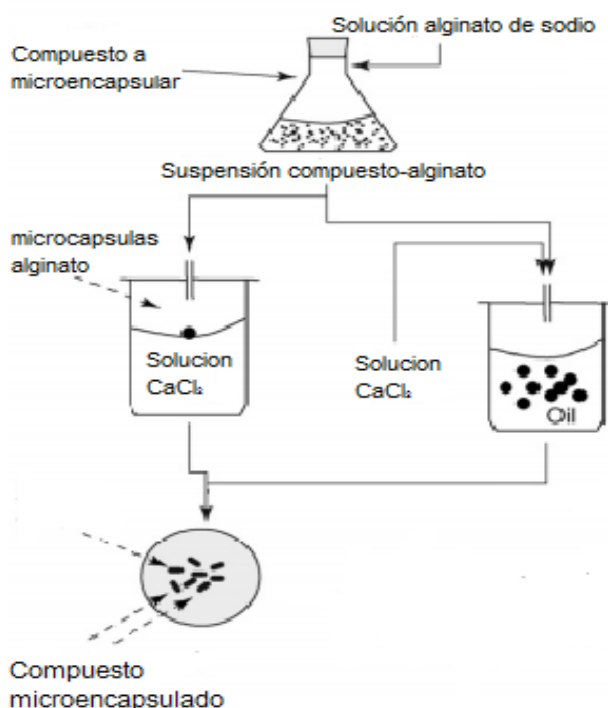


Figura 1. Ruta para el proceso de encapsulación con alginato de sodio. Modificada de (Champagne & Fustier, 2007).

Finalmente, los hongos *Botrytis cinerea* son parásitos polífago capaces de vivir tanto como saprofitos (alimentándose de materia en descomposición), así como parásitos o semi- parásitos alternando su modo de vida de uno en otro en diferentes periodos de

tiempo. Este tipo de parásitos son conocidos por producir toxinas, así como enzimas degradadoras de la pared vegetal. Muchas especies pertenecientes a este género causan serias pérdidas a numerosos cultivos comerciales alrededor del mundo tales como flores, frutas y vegetales (Aleu & Collado, 2001).

Teniendo en cuenta las propiedades del bioinsumo de fique y las propiedades que confiere el proceso de microencapsulación, la presente investigación tiene como objetivo el estudio de la viabilidad de la producción de un bioinsumo microencapsulado partiendo de BFE, para ejercer el control sobre el hongo *Botrytis cinerea*.

3. METODOLOGIA

Preparación del bioinsumo:

El jugo de fique fue obtenido del departamento de Boyacá, este fue transportado a temperatura de 25°C y aislado de la luz. A seguir, se tomó una muestra de 2 L de jugo que fue dispuesta en tubos falcón de 50 mL (con volumen de trabajo de 45 mL). Posteriormente, se llevó a centrifugación (Centrifuga Hettich D-78532) a 4400 rpm durante 5 min. El precipitado se separó y se dispuso en bandejas metálicas, previo a ser liofilizado (Liofilizador Drycol LTDA), este proceso se llevó a cabo en a temperatura de -34°C y presión de 260 mmHg, hasta la obtención de un polvo de color verde (Bastidas, 2014).

Preparación extractos:

- a. **Extracto acuoso:** Se prepararon 5 g secos del bioinsumo de fique en 100 mL de agua hervida durante 30 min a agitación constante (400 rpm). A seguir, la solución fue filtrada en embudo Buchner y papel filtro; por último, se realizó la concentración del extracto mediante un rotavaporador (Brookfield TC-150MX-115) a 75°C, 72 mbar y 70 rpm (Mahmoud et al., 2016).
- b. **Extracto etanólico:** Se disolvieron en 100 mL de etanol al 96%, 10 g del bioinsumo de fique, haciendo uso de agitación constante (400 rpm), a 25°C durante 30 min. Este se dejó en reposo durante 24 h, luego se filtró con embudo Buchner y papel filtro. Finalmente, se concentró con un rotavaporador (Brookfield TC-150MX-115) a temperatura de 52°C, presión de 175 mbar y 60 rpm (Mahmoud et al., 2016).

Microencapsulación de los extractos

- a. **Agente encapsulador:** Se preparó una mezcla de 1.5 g de alginato de sodio (Cimpa®) en 50 mL de agua destilada a 60°C, mediante una adición lenta, evitando así la formación de aglomerados de materia, y garantizando que la mezcla fuera homogénea (Mateus, Barrias, Ribeiro, Ferraz, & Monteiro, 2008).
- b. **Intercambio iónico:** Se preparó una solución de cloruro de calcio (Ferryquim) de concentración 0.1 M, para generar el intercambio iónico entre las microesferas de alginato de sodio y el CaCl₂ y crear así, resistencia mecánica en del material (Mateus et al., 2008).

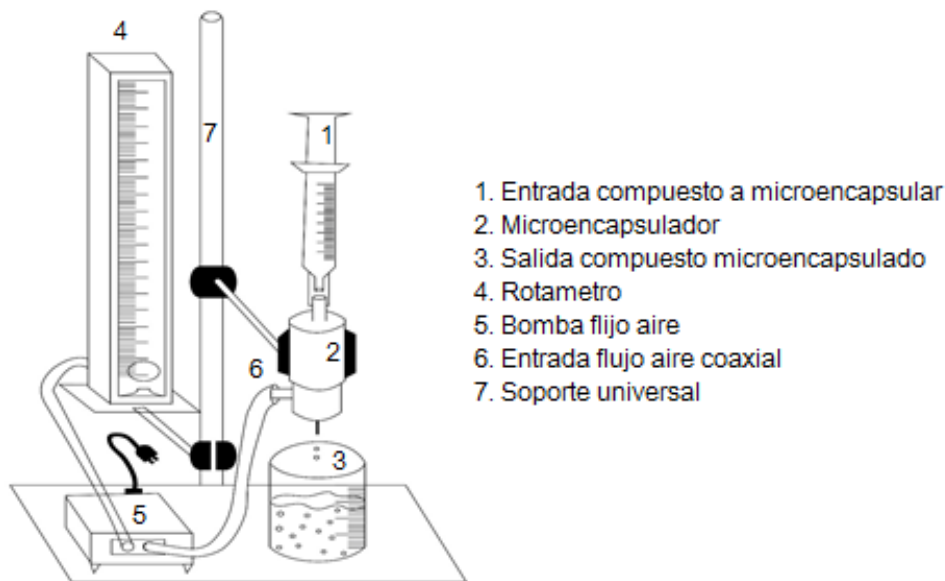


Figura 2. Esquema de producción de microcápsulas

- c. Microencapsulación del extracto acuoso:** Mediante el uso del esquema ilustrado en la Figura 2, se realizó el proceso de microencapsulado. Para este proceso se realizaron proporciones 1:1 y 1.5:1 en proporción de volumen ($v/v =$ volumen alginato de sodio: volumen extracto de fique acuoso). A 60°C se realizó la mezcla entre el alginato y el extracto acuoso y luego se realizó la microencapsulación, haciendo uso de un micro encapsulador (Encapsulation Unit – VARJ1)
- d. Microencapsulación del extracto etanólico:** Mediante el uso del esquema ilustrado en la Figura 2, se realizó el proceso de microencapsulado. Para este proceso se realizaron proporciones 1:1 y 1.5:1 en proporción de volumen (alginato de sodio: extracto de fique acuoso); a 60°C se realizó la mezcla entre el alginato y el extracto etanólico. Se procedió de igual manera que en el aparte anterior.

Para el encapsulamiento se hizo uso de dos agujas suministradas por el equipo VARJ-1 con numeral distintivo para cada una, con el cual se relaciona un valor de diámetro interno similar al obtenido en las réplicas del encapsulamiento, las cuales se tabulan a continuación (Tabla 1)

Tabla 1. Referencia y diámetro de agujas usadas

Referencia	Diámetro (mm)	Abreviatura
0,00393	1.320	A1
0,00494	2.040	A2

Diseño experimental y análisis estadístico

- a. Determinación diámetro promedio:** Mediante el microscopio óptico y el software ImageJ[®] se analizaron las fotografías a las microcápsulas, con lo cual se logró determinar su diámetro promedio y área ($n=20$).

- b. Diseño experimental para resistencia mecánica:** Las muestras microencapsuladas se analizaron mediante un modelo factorial completo con $k=2$ para estimar la significancia de los factores (diámetro, proporción) a estudiar en la respuesta ante esfuerzos mecánicos. Se cuantificó dicha resistencia a las microcápsulas ($n=25$) haciendo uso de un penetrómetro (Chatillon DFM-100), para posteriormente, mediante un diagrama de Pareto establecer las formulaciones adecuadas a ser evaluadas en las pruebas biológicas (Bartés, Tort-Martorell, Grima, & Pozueta, 1998)

Caracterización física de las microcápsulas

a. Microscopía óptica de luz

Mediante un microscopio óptico LEICA DM500, con un lente LEICA ($\infty/0.17$ PLAN 100x/1.25) se determinó el diámetro de las micro cápsulas obtenidas ($n=20$) se tomaron imágenes de las capsulas obtenidas con una escala obtenida por el equipo, lo cual permitió realizar la calibración del software ImageJ[®] con el cual se estableció un diámetro promedio.

b. Resistencia mecánica y método estadístico

Con la finalidad de determinar las mejores condiciones mecánicas para las microcápsulas producidas, se evaluó cuál sería su respuesta teniendo como variables: diámetro de esfera y proporción extracto:alginate, para establecer así las características físicas adecuadas para las pruebas realizadas a continuación, dicha evaluación se elaboró por el algoritmo de yates mencionado para el diseño experimental.

c. Microscopía electrónica de barrido

Haciendo uso de la microscopia electrónica de barrido (SEM, de sus siglas en inglés), se determinó las características morfológicas de las microcápsulas de fique, usando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6490LV) el diámetro de las cápsulas se observó utilizando el software ImageJ[®] 1.47 V (NIH, EE. UU.). Se usó un recubrimiento de oro (100 Å, recubrimiento uniforme) en el metalizador Desk IV.

Caracterización química de las microcápsulas

Se realizó un análisis de composición química (grupos funcionales) de BLE y, de la superficie y el núcleo de las microcápsulas (Park, Shin, & Lee, 2001) haciendo uso de una espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR, de su siglas en inglés, modelo Prestige-21, Shimadzu, Japón), con un ATR universal que posee cristal de ZnSE y diamante, este equipo nos dará mediciones de longitud de onda entre 600 cm^{-1} y 3600 cm^{-1} .

Evaluación del desempeño como bioinsumo (extracto y microcápsulas)

Este estudio se realizó en el laboratorio de Microbiología del Centro de Biosistemas de la Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano, ubicado en Chía (Cundinamarca). El hongo a estudiar (*Botrytis cinerea*) se obtuvo del laboratorio de inmunología del Centro de Biosistemas, a condiciones establecidas por este ($T=20^{\circ}\text{C}$). Se desarrollaron los medios de cultivos de *potato dextrose agar* (PDA - Oxoid) por triplicado teniendo como referencia de estudio las diferentes formulaciones de estudios realizados con el BFE (Escallon, 2017), con las cuales se obtuvieron mejor control inhibitor en el crecimiento

del hongo *Botrytis cinerea*. Con relación a los pesos determinados en el estudio de inhibición de BFE, se dispuso una relación masa:cantidad de microcápsulas con respecto al medio (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración (g/L) de microcápsulas agregadas al medio de cultivo.

Tratamiento	Cápsulas acuosas (g/L)	Cápsulas etanólicas (g/L)
To	NA	NA
T1	0.02	0.02
T2	0.03	0.03
T3	0.05	0.05
T4	0.06	0.06
T5	0.12	0.12

To se refiere al testigo, mientras que T1-T5 son los tratamientos con presencia de microcápsulas de extracto (acuoso o etanólico). Finalmente, se llevaron a incubadora (20°C) y se estableció su crecimiento al pasar diez días. La efectividad del procedimiento se evalúa bajo la ecuación 1 (Moo-Koh et al., 2014):

$$E = \frac{T_{test} - T_{trat}}{T_{test}} * 100 \quad (1)$$

Donde:

E = efectividad (%)

Ttest = crecimiento micelial del testigo (cm)

Ttrat= crecimiento micelial del tratamiento (cm)

100 = constante

4. RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización física

Se muestra en la figura 3 el liofilizado obtenido a partir del beneficio del fique y, en la figura 4, las microcápsulas que se elaboraron a partir de este, las cuales fueron llevadas a los diferentes procesos de caracterización para la determinación las propiedades de estas.



Figura 3. Liofilizado de fique estabilizado

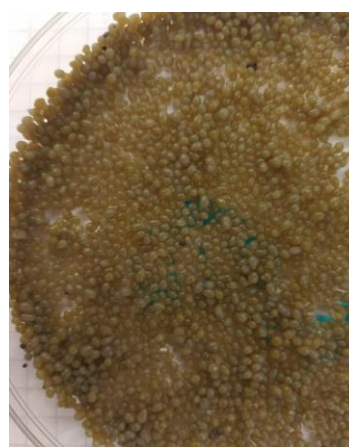


Figura 4. Microcápsulas de extracto de fique

a. Estereoscopio de luz

Se hizo uso del estereoscopio, con el fin de estimar el diámetro promedio de las micro cápsulas usando diferentes agujas y formulaciones para así establecer o distinguir a grandes rasgos distribución del procedimiento, diámetro promedio y desviación de la misma medición.



Figura 5. Morfología típica de las microcápsulas de fique

Como se evidencia en la Figura 5, la morfología macroscópica de las microcápsulas es ovalada, influenciado por factores tales como el flujo del aire coaxial en la metodología empleada durante la encapsulación, entre otros.

A partir de la preparación de las microcápsulas con las agujas A1 y A2, y con ayuda del software ImageJ[®] se obtienen estimaciones de diámetro y desviación en las medidas y se lograron desarrollar los diagramas de distribución de diámetro de partícula que se muestran a continuación.

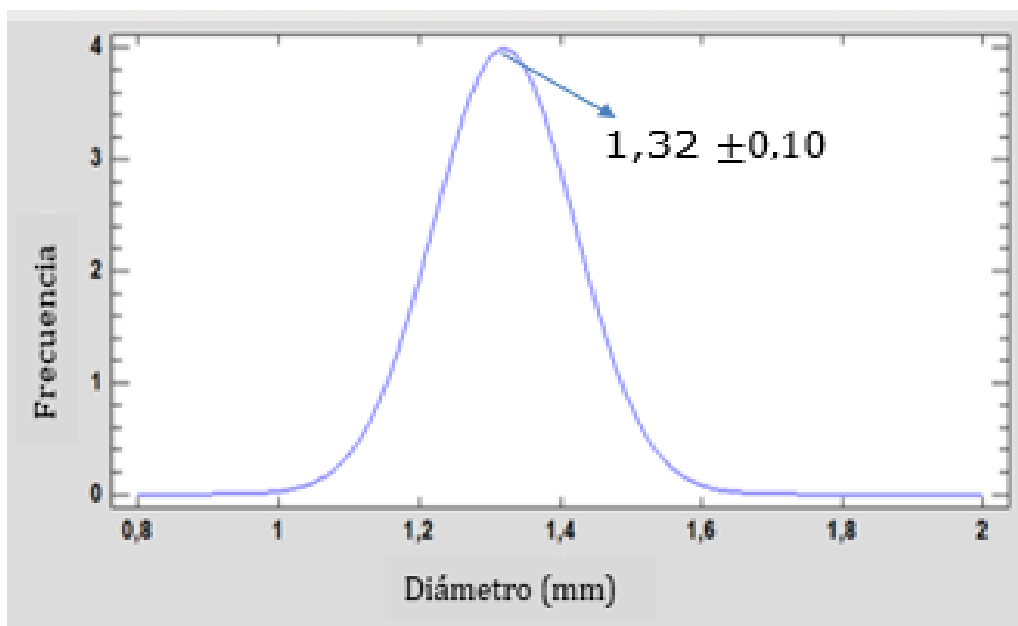


Figura 6. Distribución de diámetro de las microcápsulas empleando la aguja A1

La combinación de técnicas usadas en la encapsulación, extrusión y gelación interna, permitió durante la presente investigación, mantener ciertos parámetros controlados para tratar de obtener la mayor uniformidad en las réplicas, teniendo una uniformidad en los valores arrojados para el diámetro de partícula de las microcápsulas elaboradas haciendo uso de la aguja A1 (Figura 6), valores que oscilan entre 1,2 mm y 1,5 mm.

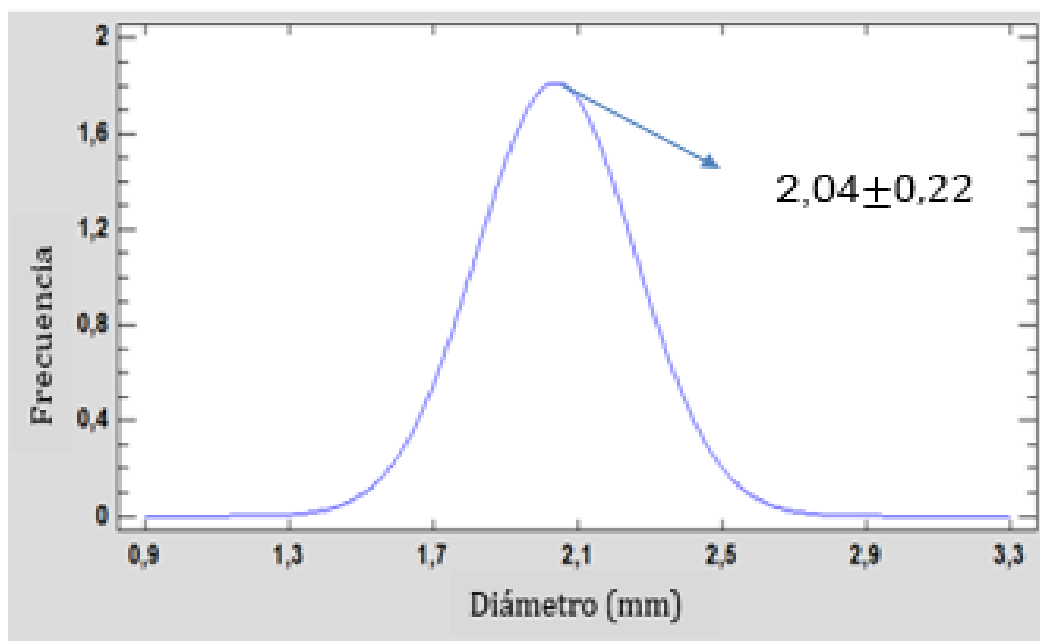


Figura 7. Distribución de diámetro de las microcápsulas empleando la aguja A2

A partir de la figura 7 se tiene que para la aguja A2, se determinó un diámetro para las microcápsulas de extracto acuoso y de extracto etanólico, entre 1.7 mm y 2.04 mm. Respecto a las figuras 6 y 7, decimos se cumple con el significado de microcápsulas, ya que tenemos un diámetro de estas oscilante entre los 200 μm y 2000 μm (Guevara & Jimenez, 2008). Las figuras anteriores representan la campana de gauss, para las dos agujas (A1 Y A2) utilizadas y, nos permite ver que dichas figuras presentan una distribución similar en los datos, y que dicha distribución se puede reducir disminuyendo el número de variables independientes en la metodología aplicada en el desarrollo de las microcápsulas.

b. Resistencia mecánica y método estadístico

Determinadas las características físicas de las microcápsulas, se efectuó un análisis estadístico con el fin de establecer la significancia de los factores evaluados en la resistencia mecánica de microcápsulas a ser evaluadas posteriormente, en pruebas biológicas *in vitro*. Para las formulaciones de soluciones etanol (DEE) y acuosa (DEA). Se representan a continuación en diagramas de Pareto.

DIAGRAMA DE PARETO PARA EFECTOS ESTANDARIZADOS

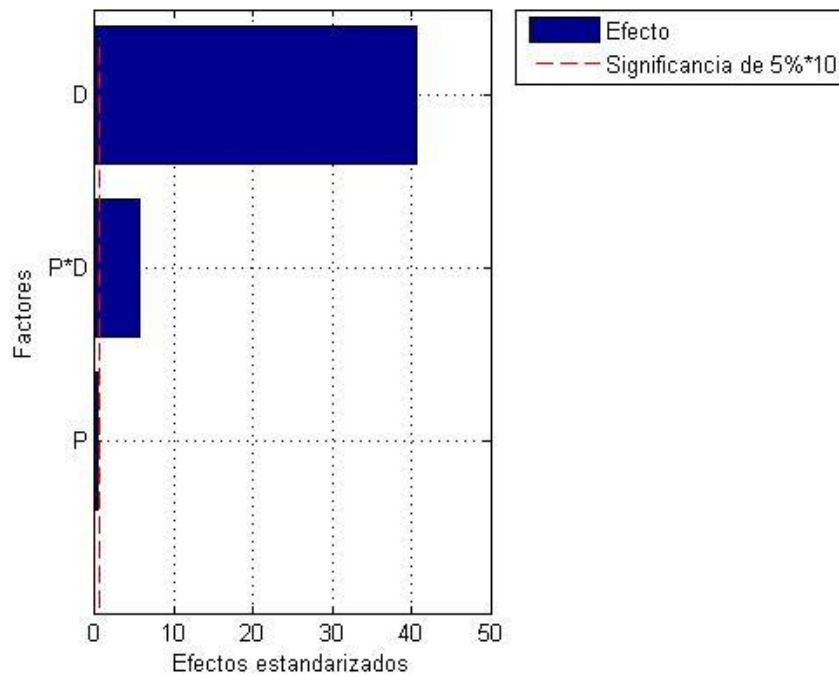


Figura 8. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados de DEA

DIAGRAMA DE PARETO PARA EFECTOS ESTANDARIZADOS

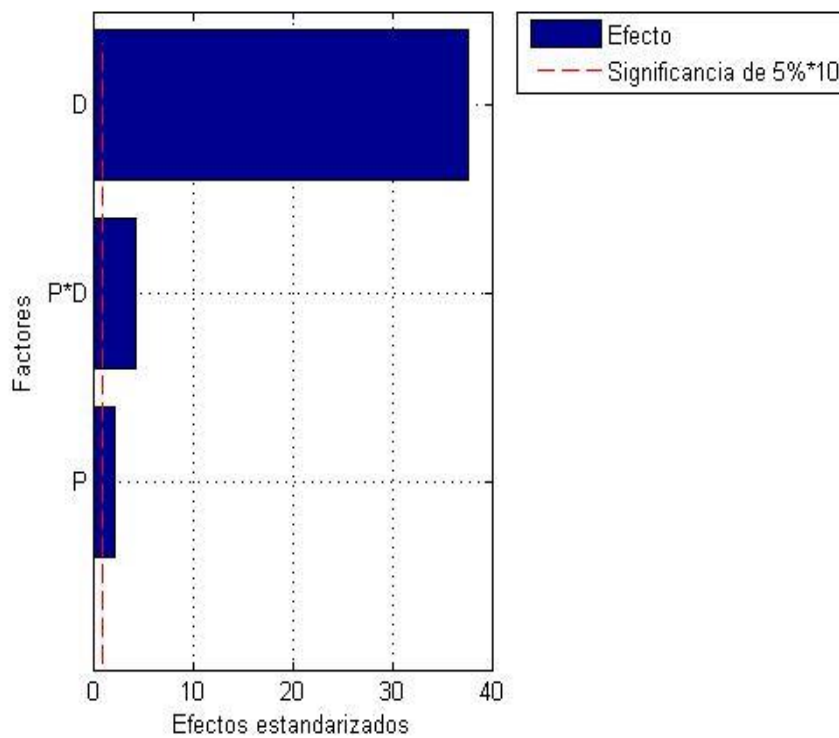


Figura 9. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados de DEE

Con base a las Figuras 8 y 9, se estableció la significancia de los dos factores evaluados en el diseño experimental, donde se observa que todos son significativos, incluyendo la interacción entre los mismos, con mayor relevancia el diámetro de la esfera en cuanto a la respuesta mecánica de las misma.

La resistencia mecánica obtenida por las cápsulas es debido a la matriz generada con la adicción de alginato a la muestra de fique que posteriormente, es llevada a la cama de sodio, dicho proceso otorga la resistencia mecánica a las cápsulas, en cuanto mayor es el tiempo de contacto cápsula-sodio podría representar difusión del principio activo deseado encapsulado. Debido a la estandarización de concentración y tiempo de contacto microcápsula- CaCl_2 no presentamos grandes variaciones en las resistencias obtenidas con las dos formulaciones; sin embargo, se evidenció mayor resistencia en las DEE ($1.46 \pm 0.17\text{N}$) con respecto a DEA ($1.27 \pm 0.15\text{N}$).

Teniendo en cuenta que se busca desarrollar pruebas *in vitro* con las cápsulas, se desarrollaron dichas pruebas biológicas con las microcápsulas de mayor resistencia mecánica obtenidas con la justificación de evitar fáciles afectaciones a la integridad de las mismas.

c. Microscopía electrónica de barrido

De acuerdo con el resultado arrojado por la microscopia electrónica de barrido (Figura 10) se pudo observar la morfología de las microcápsulas para la mezcla de alginato de sodio y extracto (tanto acuoso como etanólico). Haciendo uso de la micrografía de las microcápsulas acuosas y etanólicas (Figura 10b y Figura 10d) se estableció que estas poseen una porosidad con estructura tipo red, lo cual puede favorecer su capacidad de adsorción de ser utilizada en este tipo de proceso (Salisu et al., 2016).

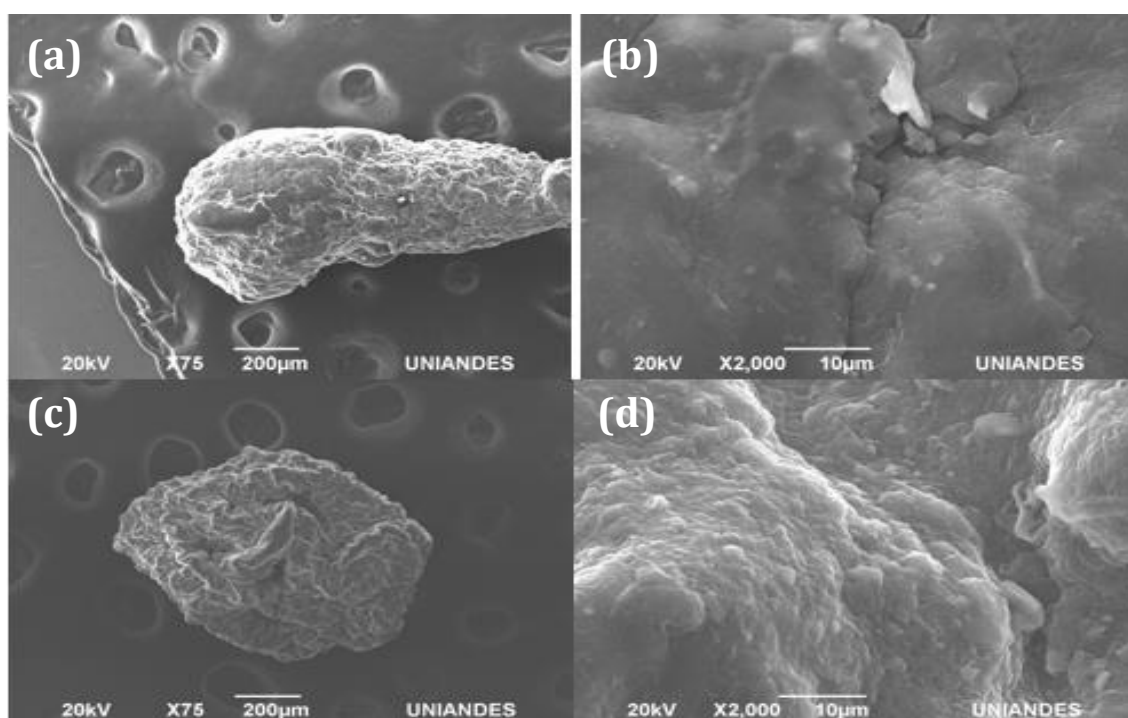


Figura 10. Microscopia electrónica de barrido de (a) y (b) Microcápsulas y superficie microcápsulas de alginato de sodio–extracto de fique etanólico; (c) y (d) Microcápsulas y superficie microcápsulas de alginato de sodio–extracto de fique acuoso.

Respecto a la forma de las microcápsulas, se determinó que estas presentan una forma ovalada con superficie áspera e irregular (Figura 10a y 10c), esto puede ser debido a factores tales como concentraciones de alginato-extracto, tiempo de intercambio iónico, caudal de caída de gota, etc., al tener un control más estricto sobre estos factores se puede generar en las micropartículas superficies más lisas y suavemente porosas (Ahmed, El-rasoul, Auda, & Ibrahim, 2013).

Caracterización química

Se realizó la prueba de FTIR para tres muestras con el fin de determinar las diferencias en los grupos funcionales contenidos en los mismos.

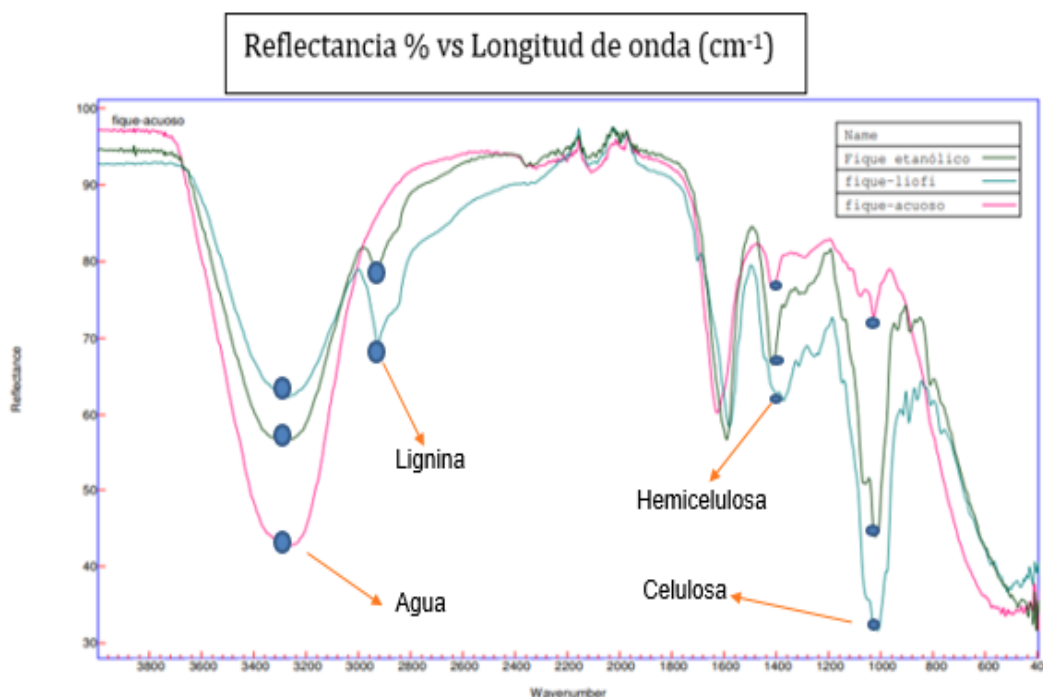


Figura 11. Espectrometría infrarroja por transformadas de Fourier para muestra liofilizada, etanólica y acuosa.

Haciendo un análisis detallado de los grupos funcionales observados en la figura 11, permite evidenciar diferencias esperadas, principalmente en la longitud de onda característica para el contenido de agua, donde se magnifica la presencia de la misma en las microcápsulas realizadas con la formulación acuosa, seguido por las microcápsulas realizadas con la formulación etanólica y finalmente la referencia del fígado liofilizado. Además de esto, en el pico de las longitudes comprendidas entre 2800 cm^{-1} y 3000 cm^{-1} se evidencia un arrastre de grupos como C-H y C-H₂ característicos de la celulosa y hemicelulosa (Gómez, Sarmiento, Leonardo, & Diana, 2013) en la formulación elaborada con etanol, dicho pico no fue evidenciado en la formulación acuosa debido a la estructura de la misma con puentes de hidrogeno característicos que le otorgan la resistencia y la insolubilidad con este medio (Voet & Voet, 2006).

En cuanto a similitudes se observan reflectancias para los mismos grupos funcionales, similares en longitudes comprendidas entre 2800 a 1600 cm^{-1} . Caso contrario a las comprendidas de 1400 a 1000 cm^{-1} donde las tres formulaciones tienen presencia de picos característicos, pero a diferentes reflectancias, debido a los estiramientos de hidroxilos y de los grupos éter comprendidos en la celulosa que contiene menor afinidad con el agua, debido a la estructura fibrosa de la celulosa, que le permite realizar puentes de hidrogeno, lo cual hace que la celulosa sea impenetrable e insoluble en agua.

El análisis detallado de cada uno de los picos presentados en la prueba de FT-IR para las microcápsulas acuosas, para las microcápsulas etanólicas y para el bioinsumo de fígado liofilizado, se presenta en el anexo 3.

Evaluación del desempeño como bioinsumo (extracto y microcápsulas)

De acuerdo con las pruebas realizadas para el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea*. Se tiene:

a. Para extracto acuoso

Teniendo en cuenta la ecuación 1, se tiene que la efectividad de inhibición del crecimiento del hongo *Botrytis cinerea* por parte de las microcápsulas de extracto acuoso, es nula, ya que este se propaga sobre toda la superficie del medio de cultivo. Físicamente se evidencia un cambio en el crecimiento normal del hongo, tal como se muestra en la figura 12.

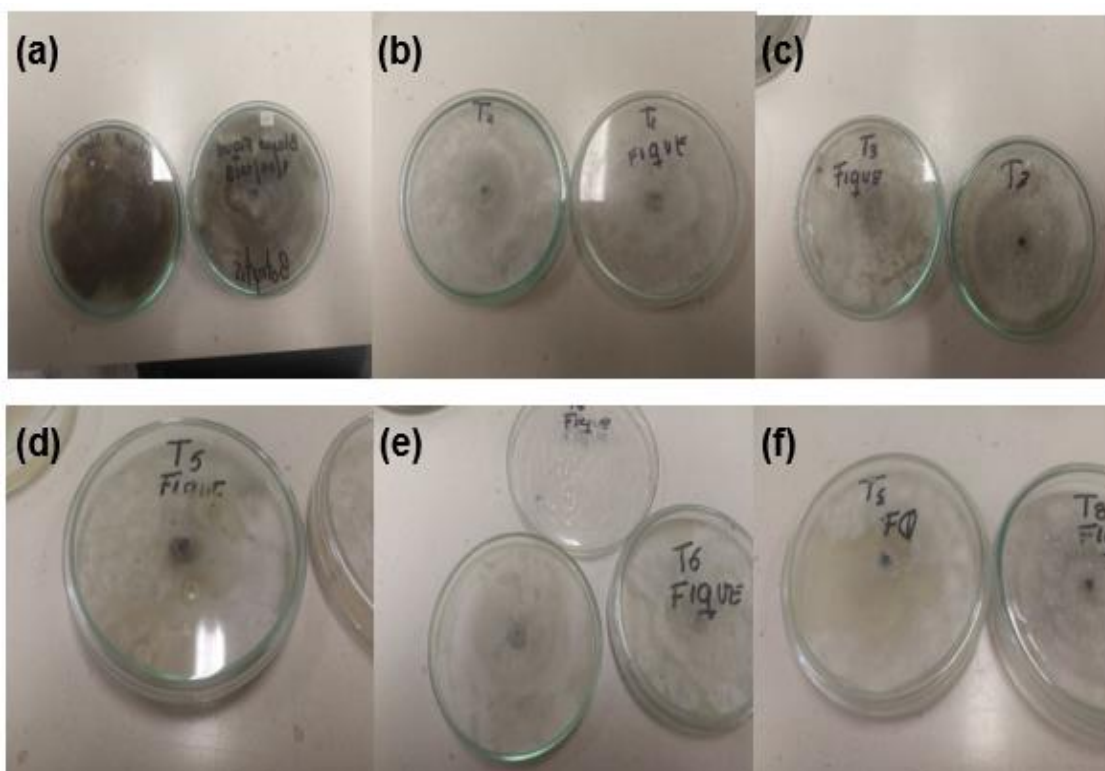


Figura 12. Crecimiento *in vitro* para *Botrytis cinerea*. haciendo uso de microcápsulas de extracto acuoso como agente de control de crecimiento. (a) T₀; (b) Tratamiento T1; (c) Tratamiento T2; (d) Tratamiento T3; (e) Tratamiento T4; (f) Tratamiento T5

Se obtuvo para cada tratamiento un crecimiento total del hongo sobre la superficie del medio. Al realizar la comparación del crecimiento micelial del hongo bajo las condiciones del tratamiento respecto al testigo (Figura 8b, 8c, 8d, 8e, 8f respecto a 8a), se generó un cambio de condiciones en el medio tales como, cambio en la humedad, producción de posibles componentes gaseosos (Mesejo, 2015), lo cual permite determinar que se inhibe el crecimiento esclerocial del hongo (Arias & Jerez, 2008), condiciones que le permiten al hongo la producción de conidias (Latorre, 1998) y por lo tanto inhibe la reproducción asexual de este. Teniendo así que este se encuentra en una reproducción de forma sexual, lo cual nos permite decir que tenemos bajo estas condiciones el crecimiento del hongo *Botrytis fuckeliana* (Latorre, 1998).

Este resultado se presentó para todos los tratamientos realizados con las diferentes proporciones de microcápsulas de alginato de sodio-extracto de fique acuoso y se detalla en el Anexo 1.

b. Para extracto etanólico

Haciendo uso de la ecuación 1, se determinó la efectividad de cada uno de los tratamientos realizados al crecimiento del hongo *Botrytis cinerea*. teniendo los datos tabulados a continuación:

Tabla 3. Porcentaje de inhibición para cada dosis de microcápsulas de extracto etanólico suministrada

TRATAMIENTOS	Diámetro de crecimiento micelial (mm)	Porcentaje (%) de inhibición de crecimiento
Blanco	88	0
T1	77	12.5
T2	80	8
T3	78	11.36
T4	83	5.68
T5	81	7.95

En la figura 13, se muestra un crecimiento normal del hongo hasta entrar en contacto con las microcápsulas de extracto etanólico, posterior a esto se evidencia físicamente como se altera el crecimiento del hongo.

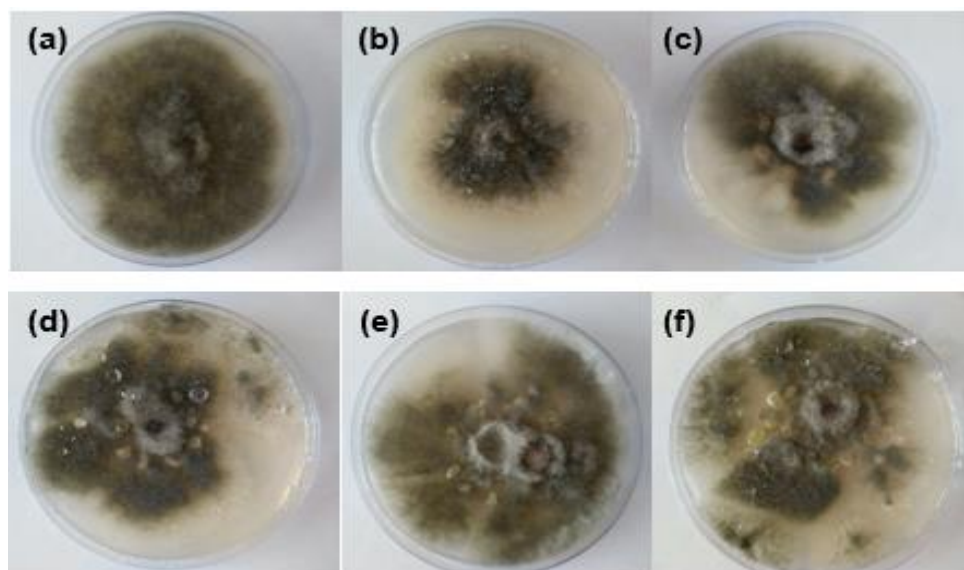


Figura 13. Crecimiento *in vitro* para *Botrytis cinerea*. haciendo uso de microcápsulas de extracto etanólico como agente de control de crecimiento. (a) T₀; (b) Tratamiento T1; (c) Tratamiento T2; (d) Tratamiento T3; (e) Tratamiento T4; (f) Tratamiento T5

Con base en la figura 13, además del uso de la ecuación 1, se puede determinar que para el tratamiento T1 se genera una inhibición del 12.5% en el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea*, sobre el medio de cultivo (PDA), teniendo físicamente para el hongo en primer momento un crecimiento normal, al entrar en contacto con las microcápsulas de extracto etanólico se genera en primer estancia un estrés en el hongo, evidenciado físicamente en el cambio de color durante el crecimiento de este, lo cual se determina

como una inhibición en la reproducción asexual de éste (Arias & Jerez, 2008), y seguido a esto se da que deje de crecer en la totalidad del medio de cultivo. Teniendo estos resultados e información bibliográfica de estudios *in vitro* realizados del extracto de fique para la determinación de una actividad biocida (Bacca, 2012), sobre las estructuras miceliales y conidiales de hongos fitopatógenos, se demostró que las concentraciones empleadas en el control de crecimiento de *Botrytis cinerea*. (ver anexo 2) de microcápsulas de extracto etanólico respecto al medio de cultivo (PDA), presentan una acción biocida para el desarrollo de este hongo fitopatógeno.

5. CONCLUSIONES

Se obtuvo la producción de un bioinsumo microencapsulado de extracto acuoso y otro a base de extracto etanólico, a partir del jugo del beneficio del desfibrado del fique, el cual se usó para ejercer control sobre el hongo *Botrytis cinerea*, teniendo para el bioinsumo microencapsulado acuoso que el crecimiento del hongo se da de manera estresada, mientras que para el bioinsumo microencapsulado etanólico se da en un 13% de inhibición en la mejor formulación.

En cuanto a la caracterización de las microcápsulas, se demuestra que los factores tenidos en cuenta en el diseño experimental (diámetro de partícula y proporción Alginato:Extracto) son determinantes en la medición de la resistencia mecánica de estas. Esto a su vez nos permitió considerar la viabilidad de las capsulas para hacer pruebas *in vitro* debido a que no sufren malformaciones físicas fácilmente.

Respecto a los resultados obtenidos, podemos decir que la microencapsulación es una buena alternativa para realizar una liberación controlada del principio activo de sustancias para ser suministradas en diferentes medios, dicha microencapsulación se logró efectuar con un polímero altamente usado con finalidades investigativas y se logra estandarizar la metodología para lo mismo.

El fique liofilizado efectúa una acción biocida en el hongo *Botrytis cinerea*, demostrado en estudios anteriores, con la microencapsulación se genera un resultado similar en el hongo, lo cual nos permitiría llevar a la producción de microcápsulas mejorando la calidad en el proceso de realización de estas.

6. RECOMENDACIONES

Para estandarizar o unificar el diámetro de las microcápsulas, es aconsejable tener presentes variables que consideramos que tiene un efecto en el desarrollo de las mismas como: caudal suministrado y flujo de aire coaxial.

Dada la viabilidad y comprobación de un efecto biocida de las capsulas, se recomienda realizar estudios para conocer la velocidad de liberación del bioinsumo, como perfil de difusión del principio activo, el cual en literatura de pruebas similares se le atribuye o se hace una hipótesis de que la presencia de sapogeninas otorga dicho control.

Para verificar la inhibición que generan las microcápsulas se recomienda hacer el estudio de control de *Botrytis cinerea* mediante pruebas *in vivo*, esto permitirá hacer el análisis del comportamiento de las capsulas al momento de hacer la inhibición a condiciones cambiantes (temperatura, humedad, entre otros).

7. AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a Dios, por concedernos la salud y la sabiduría necesaria para abarcar el tema propuesto en este trabajo, por la paciencia otorgada en los momentos arduos de trabajo y por permitirnos culminar con éxito este proyecto.

A nuestra directora de tesis Alis Pataquiva (IQ., MSc., PhD.), por la dedicación y apoyo brindado a este trabajo, por el respeto a nuestras ideas y sugerencias, y por facilitar poner en práctica las mismas. Gracias por la confianza desde que llegamos al semillero de Bionanotecnología.

Por sus sugerencias e ideas a nuestra codirectora Luz Stella Fuentes, (I.A., MSc., PhD (c)), las cuales nos llevaron a soluciones de dudas en los momentos claves de este trabajo. Gracias por recibirnos en las instalaciones de la universidad dedicadas a estudios biológicos, este espacio nos permitió avanzar a pasos agigantados durante el proceso investigativo de nuestro proyecto.

A nuestras familias y amigos, que nos dieron apoyo moral y humano, los cuales sirvieron para llegar hasta el final exitoso de este trabajo y a todos aquellos que tuvieron alguna intervención en nuestra tesis, todo fue parte vital para culminar con éxito este proceso.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, M. M., El-rasoul, S. A., Auda, S. H., & Ibrahim, M. A. (2013). Emulsification / internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium – sodium alginate microparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(1), 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.004>
- Alfonso, M. (2002). Los plaguicidas botánicos y su importancia en la agricultura orgánica. *Agricultura Orgánica* 2, 26–30.
- Alvarez, M. (1982). Botrytis cinerea: un antiguo problema de la vid. *IPA La Platina* N^o, 12.
- Arias, K., & Jerez, A. (2008). Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá.
- Bacca, D. (2012). ESTUDIO FITOQUÍMICO DEL JUGO DE FIQUE DE LAS ESPECIES NEGRA COMÚN (*Furcraea gigantea*) Y UÑA DE ÁGUILA (*Furcraea macrophylla*) DE LOS MUNICIPIOS DE EL TAMBO Y GUAITARILLA (NARIÑO), 24–26.
- Bartés, A. P., Tort-Martorell, X., Grima, P., & Pozueta, L. (1998). *Métodos estadísticos Control y mejora de la calidad*. Edicions UPC. Retrieved from https://books.google.com.mx/books?id=gtvXJ_yogIYC&pg=PA262&lpg=PA262&dq=%22Método+de+ponderación+de+criterios%22&source=bl&ots=SsXXti1MX-&sig=ta9mdOh-Uv-1qFzVXtfgPsujqrQ&hl=es&sa=X&ved=0CCIQ6AEwAWoVChMIws2g-YbiyAIVA2ImCh1ZGQkg#v=onepage&q=%22M%25C
- Bastidas, K. (2014). Evaluación de la actividad biocida de un extracto de fique (*Furcraea andina*) sobre plagas y enfermedades (*Tetranychus urticae*, *Trialeurodes vaporariorum* y *Sclerotium cepivorum*) limitantes en cultivos de importancia agroindustrial en Colombia. Retrieved from <https://mail-attachment.googleusercontent.com/attachment/u/0/?ui=2&ik=724ceb4d9b&view=>

att&th=15b20a849d15adaa&attid=0.1&disp=inline&realattid=f_j0ws9d8u0&safe=1
&zw&sadbat=ANGjdJ-
EezPlzOJm5p7pgvGYEfxlDOhYw6akpQZ2fyw7MAEStl0X0toCe7frvPf-
OhRNHHKDX_c2CgEDXIA

Benito, E. P., & Arranz, M. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Plant Molecular Biology*, 43–46.

Castellanos, E., Aranaz, A., Gould, K.A., Linedale, R., Stevenson, K., Álvarez, J., Dominguez, L., de Juan, L., Hinds, J. and Bull, T.J. (2009) Discovery of stable and variable differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* Types I, II and III genomes by pan-genomemicroarray analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 75, 676-686

Champagne, C., & Fustier, P. (n.d.). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. 23rd March 2007.

Chaverra, E. D. J. V., Walteros, C. H. A., & Santamaría, D. M. (2010). *Anuario estadístico del sector agropecuario y pesquero 2010. Ministerio de agricultura y desarrollo rural*.

Escallon, F. (2017). EVALUACIÓN in vitro DEL PRODUCTO FIQUE LIOFILIZADO SOBRE *Botrytis* sp ., DE FORMA PREVENTIVA, (57).

Flores-Belmont, I. ., & Jiménez-Munguía, M. . (2013). Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 48–56.

Gómez, S. F. A., Sarmiento, G., Leonardo, F., & Diana, C. (2013). Caracterización de microorganismos celulolíticos y amilolíticos de residuos sólidos orgánicos dispuestos en la planta Ecosangil del municipio de San Gil , Santander. *Revista Matices Tecnológicos*, 5(5), 29–36. https://doi.org/ISSN_2027-4408. Caracterización

Guevara, N., & Jimenez, T. (2008). Encapsulación: técnicas y aplicaciones en la industria alimentaria. *Temas Selectos Ingeniería de Alimentos*.

Hernández, C. de J., Iliina, A., Ventura, J., Belmares, R., Contreras, J. C., Álvarez, G., & Martínez, J. L. (2016). La microencapsulación de bioactivos para su aplicación en la industria. *Instituto Cubano de Investigaciones de Los Derivados de La Caña de Azúcar*, 50(1), 12–19.

Jiménez. (2007). Aportes al manejo integrado de plagas en cultivos ecológicos de hortalizas con énfasis en cultivos de lechuga, 1.

Kaufman, B. P.; Cseke, L. J.; Warber, S.; Duke, J.A.; Brielmann, H. L. 1999. Natural products from plants. Boca Raton, Florida: CRC Press. 343 p.

LATORRE, L. Evaluación de tratamientos térmicos para la inactivación de las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa en el jugo de fique

Liu, Q., Rauth, A. M., & Wu, X. Y. (2007). Immobilization and bioactivity of glucose oxidase in hydrogel microspheres formulated by an emulsification-internal gelation-

- adsorption-polyelectrolyte coating method. *International Journal of Pharmaceutics*, 339(1–2), 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.02.027>
- Lupo, B., González, C., & Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130–151.
- Maache, M., Bezazi, A., Amroune, S., Scarpa, F., & Dufresne, A. (2017). Characterization of a novel natural cellulosic fiber from *Juncus effusus* L. *Carbohydrate Polymers*, 171, 163–172. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.096>
- Mahmoud, K. F., Ibrahim, M. A., Mervat, E. D., Shaaban, H. A., Kamil, M. M., & Hegazy, N. A. (2016). Nano-encapsulation efficiency of lemon and orange peels extracts on cake shelf life. *American Journal of Food Technology*, 11(3), 63–75. <https://doi.org/10.3923/ajft.2016.63.75>
- Martín Villena, M. J., Morales Hernández, M. E., Gallardo Lara, V., & Ruiz Martínez, M. A. (2009). Técnicas de microencapsulación: Una propuesta para microencapsular probióticos. *Ars Pharmaceutica*, 50(1), 43–50.
- Mateus, A. Y. P., Barrias, C. C., Ribeiro, C., Ferraz, M. P., & Monteiro, F. J. (2008). Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 86(2), 483–493. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31634>
- Mesejo, G. (2015). Efecto de las heridas sobre la resistencia de frutos de pimiento a *Botrytis cinerea* Efecto das feridas sobre a resistencia de froitos de pemento a *Botrytis cinerea* Effect of wounding on pepper fruit resistance to *Botrytis cinerea*.
- Mondragón, R., Julia, J. E., Barba, A., & Jarque, J. C. (2013). El proceso de secado por atomización: Formación de gránulos y cinética de secado de gotas. *Boletín de La Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 52(4), 159–168. <https://doi.org/10.3989/cyv.212013>
- Moo-Koh, F. A., Alejo, J. C., Reyes-Ramírez, A., Tun-Suárez, J. M., Sandoval-Luna, R., & Ramírez-Pool, J. A. (2014). Actividad in vitro del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia*, 48(8), 833–845.
- Ochoa, C. (2016). CARACTERIZACIÓN DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS (SACCHARUM OFFICINARUM) PARA DETERMINAR SU POTENCIAL EN LA PRODUCCIÓN DE BIOCOMBUSTIBLES, 1–60.
- Park, S.-J., Shin, Y.-S., & Lee, J.-R. (2001). Preparation and Characterization of Microcapsules Containing Lemon Oil. *Journal of Colloid and Interface Science*, 241(2), 502–508. <https://doi.org/10.1006/jcis.2001.7727>
- Peinado, J. E., Ospina, L. F., Rodríguez, L., Miller, J., Carvajal, C., & Negrete, R. (2006). *Guía ambiental del subsector figuero*. *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 21). Retrieved from http://201.234.78.28:8080/jspui/handle/123456789/1146%5Cnhttp://192.168.98.116:8080/xmlui/bitstream/123456789/1146/1/2007222154336_GuiaAmbientalFiguera2006.pdf
- Putman, A. 1988. Allelochemicals from plants as herbicides *Weed Techn* 2 (4): 510-518.

- Ramirez Londoño, M. J. (2013). Evaluacion de variables de un proceso de micro-encapsulacion para la estabilizacion de polifenoles, 96.
- Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K., & González-Méndez, I. (2016). La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educacion Quimica*, 27(4), 286–291. <https://doi.org/10.1016/j.eq.2016.07.002>
- Rojas, M., & Luque, E. (2012). Biofungicida a partir del jugo de fique (*Furcraea* spp.) y evaluación de su efectividad sobre la gota (*Phytophthora infestans*) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). *Revista Educación En Ingeniería*, 7(13), 13–22.
- Saez, V., Hernández, J. R., & Peniche, C. (2007). Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas. *Biotecnología Aplicada*, 24(2), 98–107.
- Salisu, A., Sanagi, M. M., Naim, A. A., Juhanni, K., Karim, A., Aini, W., ... Abdulganiyu, U. (2016). Alginate graft polyacrylonitrile beads for the removal of lead from aqueous solutions. *Polymer Bulletin*, (August 2015). <https://doi.org/10.1007/s00289-015-1504-3>
- Uribe, J., Priotto, E., Sezin, M., Lutri, P., & Spadiliero, M. (2004). INFLUENCIA DE LA TÉCNICA DE EVAPORACIÓN DEL SOLVENTE SOBRE LA ADAPTACIÓN A DENTINA Y EL ESPESOR DE CAPA DE DISTINTOS ADHESIVOS, 1, 37–46.
- Voet, D., & Voet, J. G. (2006). *Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana.

ANEXOS

ANEXO 1 – EVALUACION *in vitro* DEL PRODUCTO EXTRACTO ACUOSO MICROENCAPSULADO DE FIQUE LIOFILIZADO SOBRE *Botrytis cinerea*, DE FORMA CURATIVA

Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano
Centro de Bio-Sistemas
Laboratorio de Control de Calidad de Bioinsumos y Extractos Vegetales de Uso Agrícola
INFORME DE ENSAYO

1. Descripción de la prueba

UBICACIÓN: Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental
TEMPERATURA: $20 \pm 1^\circ\text{C}$
HUMEDAD RELATIVA: $70 \pm 10\%$
FECHA DE APLICACIÓN: 24 de abril de 2018
BLANCO BIOLÓGICO: *Botrytis cinerea*
TIPO DE APLICACIÓN: Curativo
EFECTO EVALUADO: Porcentaje (%) de control
TRATAMIENTOS EVALUADOS:

Tabla A1-1. Dosis suministrada a cada tratamiento

TRATAMIENTO	DOSIS (g/L)
To	NA
T1	0.02
T2	0.03
T3	0.05
T4	0.06
T5	0.12

UNIDAD EXPERIMENTAL: Medio de cultivo
ANÁLISIS DE DATOS: Eficacia (actividad biológica): Corresponde solo para las muestras del producto evaluado.

2. OBJETIVO

Determinar la eficacia del producto extracto acuoso microencapsulado de fique liofilizado aplicado sobre el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Proveniente del centro de Bio-Sistemas, en condiciones de laboratorio, midiendo el porcentaje de inhibición de crecimiento.

3. METODOLOGÍA

Evaluación de actividad biológica fungicida: Método interno del Laboratorio (P030).

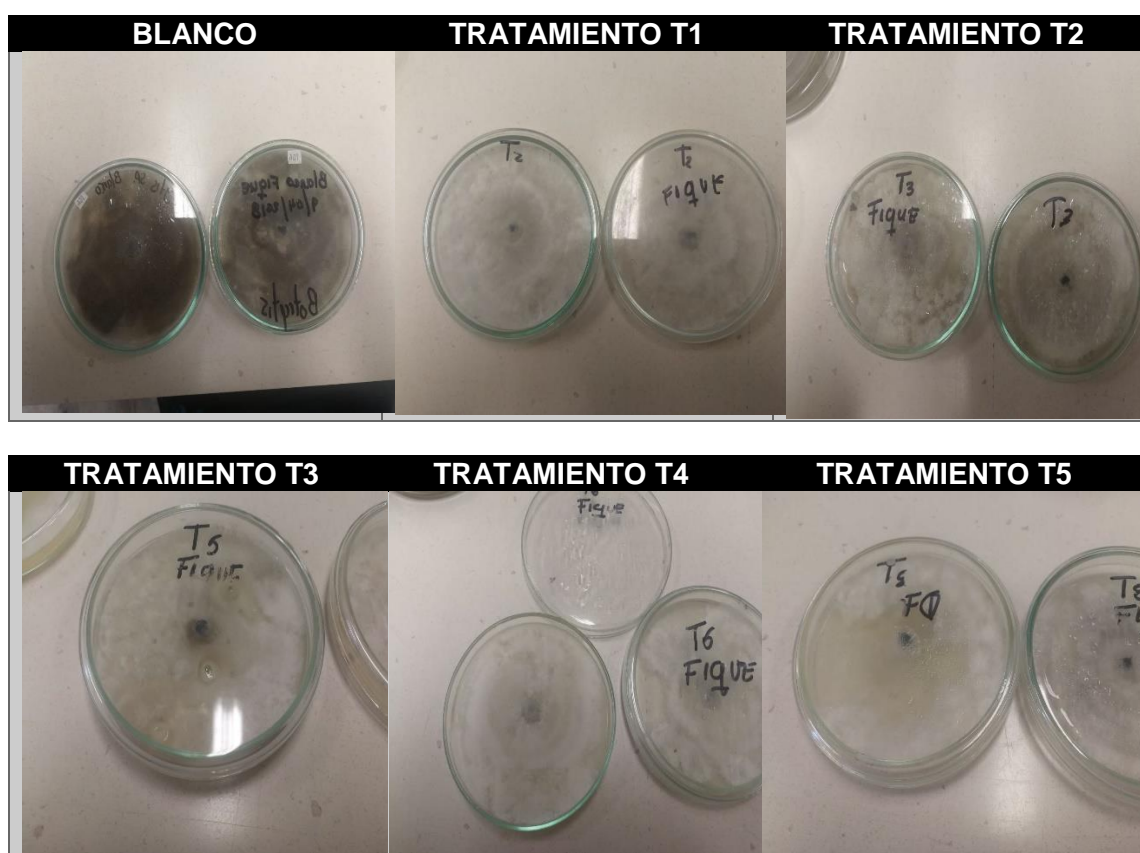
4. RESULTADOS

Los resultados están dados por porcentaje (%) de inhibición, es decir, la inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno por la presencia del producto en el medio de cultivo. Los resultados de forma preventiva se presentan en la tabla 1

Tabla A1-2. Porcentaje de inhibición para cada dosis suministrada

TRATAMIENTOS	Diámetro de crecimiento micelial (mm)	Porcentaje (%) de inhibición de crecimiento
Blanco	88	0
T1	88	0
T2	88	0
T3	88	0
T4	88	0
T5	88	0

A continuación, se muestra el aspecto físico que presenta el crecimiento del hongo, este permite determinar que el hongo crece estresado puesto que el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno para todos os tratamientos es del 100%.



ANEXO 2 – EVALUACION in vitro DEL PRODUCTO EXTRACTO ETANOLICO MICROENCAPSULADO DE FIQUE LIOFILIZADO SOBRE *Botrytis cinerea*, DE FORMA CURATIVA

Fundación Universidad de Bogotá Jorge Tadeo Lozano
Centro de Bio-Sistemas
Laboratorio de Control de Calidad de Bioinsumos y Extractos Vegetales de Uso Agrícola
INFORME DE ENSAYO

1. Descripción de la prueba

UBICACIÓN: Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental
TEMPERATURA: $20 \pm 1^\circ\text{C}$
HUMEDAD RELATIVA: $70 \pm 10\%$
FECHA DE APLICACIÓN: 24 de abril de 2018
BLANCO BIOLÓGICO: *Botrytis cinerea*
TIPO DE APLICACIÓN: Curativo
EFECTO EVALUADO: Porcentaje (%) de control
TRATAMIENTOS EVALUADOS:

Tabla A2-1. Dosis suministrada a cada tratamiento

TRATAMIENTO	DOSIS (g/L)
To	NA
T1	0.02
T2	0.03
T3	0.05
T4	0.06
T5	0.12

UNIDAD EXPERIMENTAL: Medio de cultivo
ANÁLISIS DE DATOS: Eficacia (actividad biológica): Corresponde solo para las muestras del producto evaluado.

2. OBJETIVO

Determinar la eficacia del producto extracto etanolico microencapsulado de fique liofilizado aplicado sobre el hongo fitopatogéno *Botrytis cinerea*. Proveniente del centro de Bio-Sistemas, en condiciones de laboratorio, midiendo el porcentaje de inhibición de crecimiento.

3. METODOLOGÍA

Evaluación de actividad biológica fungicida: Método interno del Laboratorio (P030).

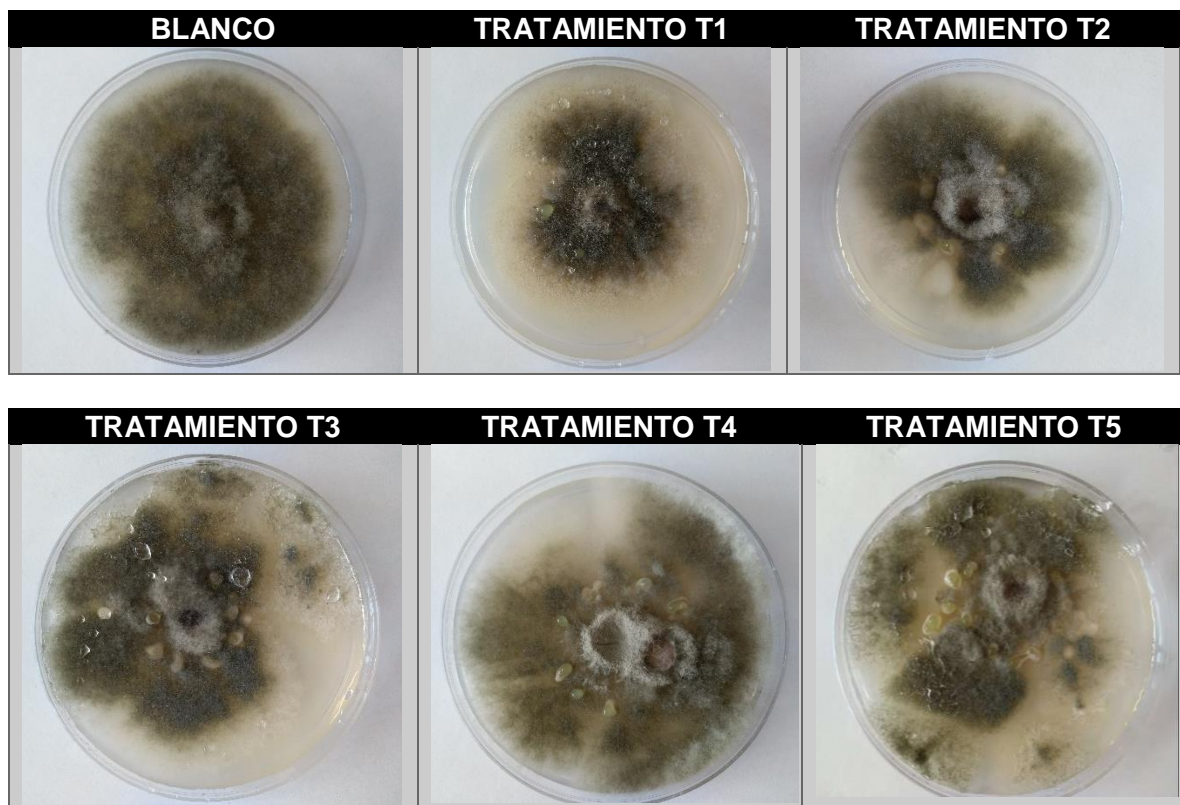
4. RESULTADOS

Los resultados están dados por porcentaje (%) de inhibición, es decir, la inhibición del crecimiento micelial del hongo fitopatogéno por la presencia del producto en el medio de cultivo. Los resultados de forma preventiva se presentan en la tabla A2-2

Tabla A2-2. Porcentaje de inhibición para cada dosis suministrada

TRATAMIENTOS	Diámetro de crecimiento micelial (mm)	Porcentaje (%) de inhibición de crecimiento
Blanco	88	0
T1	77	12.5
T2	80	8
T3	78	11.36
T4	83	5.68
T5	81	7.95

A continuación, se muestra el aspecto físico que presenta el crecimiento del hongo, como su crecimiento se ve alterado de forma física y así mismo como se inhibe.



ANEXO 3 – DESCRIPCION PRUEBA FT-IR PARA EL LIOFILIZADO DE FIQUE, MICROCÁPSULAS ACUOSAS DE FIQUE Y MICROCÁPSULAS ETANOLICAS DE FIQUE

a. FLO (liofilizado de fique o BFE)

La Figura A3-1 corresponde al espectro FTIR para el liofilizado de fique (BFE), mostrando el porcentaje de transmitancia correspondiente a las vibraciones de los diferentes grupos funcionales dentro de la mezcla (número de onda tomado en unidades de cm^{-1}),

El pico correspondiente a 521.600 cm^{-1} corresponde a vibraciones fuera del plano de las estructuras (Jaouadi, M'sahli, y Sakli, 2009). El pico de 897.737 cm^{-1} es atribuido a la presencia de relaciones glucosidicas entre monosacáridos (De Rosa et al., 2010; Reddy et al., 2014). El pico 1016.912 cm^{-1} se asocia al modo de estiramiento (CO) del hidroxilo y otros grupos funcionales en la celulosa (Fiore et al., 2014; Paiva, Ammar, Campos, Cheikh y Cunha, 2007). El pico 1259.417 cm^{-1} se relaciona con la vibración correspondiente al estiramiento (C O) del grupo acetilo en la lignina (Liu, Mohanty, Drzal, Askel, y Misra, 2004; Rao y Rao, 2007). Para el pico dado a 1376.863 cm^{-1} se tiene relación con vibraciones de flexion de (C H) (Bezazi et al., 2014; Le Troedec et al., 2008). El pico de 1584.803 cm^{-1} se relaciona con la presencia de agua dentro de la muestra (De Rosa et al., 2010). El pico dado a 2926.423 cm^{-1} se encuentra relacionado con vibraciones de estiramiento para los enlaces CH Y CH_2 en celulosa y hemicelulosa (Alvarez y Vázquez, 2006; Paiva et al., 2007) presente en la muestra. Finalmente, el pico dado en 3278.466 cm^{-1} se tiene que se da por el estiramiento de un grupo hidroxilo (OH) (Bezazi et al., 2014; Mohanty, Wibowo, Misra, y Drzal, 2004).

Agilent Resolutions Pro



Figura A3-1. Espectrograma FTIR del Liofilizado de fique

b. FAM (microcápsulas acuosas de fique)

La Figura A3-2 pertenece al espectro FTIR para las microcápsulas hechas a partir del extracto acuoso, mostrando el porcentaje de transmitancia correspondiente a las vibraciones de los diferentes grupos funcionales dentro de la mezcla (número de onda medido en unidades de cm^{-1}).

El pico correspondiente a 569.539 cm^{-1} corresponde a vibraciones fuera del plano de las estructuras (Jaouadi, M'sahli, y Sakli, 2009). Los picos 1032.972 cm^{-1} y 1083.001 cm^{-1} pueden ser asociados al modo de estiramiento (CO) del hidroxilo y otros grupos funcionales en la celulosa (Fiore et al., 2014; Paiva, Ammar, Campos, Cheikh y Cunha, 2007). El pico 1297.268 cm^{-1} es dado por la vibración correspondiente al estiramiento (C O) del grupo acetilo en la lignina (Liu, Mohanty, Drzal, Askel, y Misra, 2004; Rao y Rao, 2007). El pico 1418.173 cm^{-1} está asociado con el doblado simétrico de CH_2 presente en la celulosa (Belouadah et al., 2015; Sgriccia, Hawley y Misra, 2008). Los picos de 1631.317 cm^{-1} y 1892.479 cm^{-1} se relacionan con la presencia de agua dentro de la muestra (De Rosa et al., 2010). Por último, el pico dado en 3278.466 cm^{-1} se tiene que se da por el estiramiento de un grupo hidroxilo (OH) (Bezazi et al., 2014; Mohanty, Wibowo, Misra, y Drzal, 2004).

Agilent Resolutions Pro

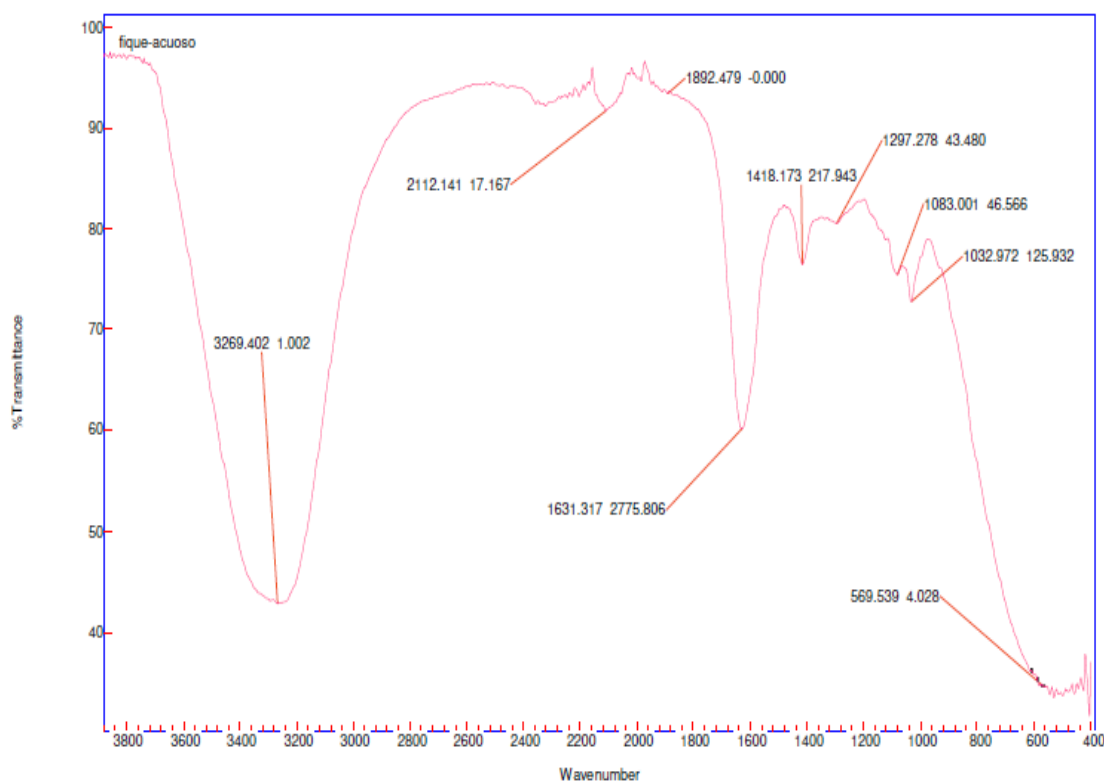


Figura A3-2. Espectrograma FT-IR de Microcápsulas acuosas de fique

c. FEM (microcápsulas etanólicas de fique)

Se tiene el espectro FTIR de las microcápsulas formadas a partir del extracto etanólico, además se registró el espectro en la figura 10, se tiene el porcentaje de transmitancia correspondiente a las vibraciones de los diferentes grupos funcionales dentro de la mezcla (número de onda tomado en unidades de cm^{-1}).

Para el pico dado a 482.699 cm^{-1} se dice que hay vibraciones fuera del plano de las estructuras (Jaouadi, M'sahli, y Sakli, 2009). El pico 893.532 cm^{-1} se puede atribuir a presencia de relaciones glucosídicas entre monosacáridos (De Rosa et al., 2010; Reddy et al., 2014) presentes en la muestra. El pico 1027.243 cm^{-1} puede ser asociado al modo de estiramiento (CO) del hidroxilo y otros grupos funcionales en la celulosa (Fiore et al., 2014; Paiva, Ammar, Campos, Cheikh y Cunha, 2007). Para el pico dado a 1396.294 cm^{-1} se tiene relación con vibraciones de flexión de (C H) (Bezazi et al., 2014; Le Troedec et al., 2008). El pico 1418.681 cm^{-1} está relacionado con el doblado simétrico de CH_2 presente en la celulosa (Belouadah et al., 2015; Sgriccia, Hawley y Misra, 2008). El pico de 1595.634 cm^{-1} se relaciona con la presencia de agua dentro de la muestra (De Rosa et al., 2010). El pico dado a 2929.075 cm^{-1} se da por vibraciones de estiramiento para los enlaces CH Y CH_2 en celulosa y hemicelulosa (Alvarez y Vázquez, 2006; Paiva et al., 2007) presente en la muestra. Por último, los picos dados a 3274.171 cm^{-1} y 3296.729 cm^{-1} se tiene que se da por el estiramiento de un grupo hidroxilo (OH) (Bezazi et al., 2014; Mohanty, Wibowo, Misra, y Drzal, 2004).

Agilent Resolutions Pro

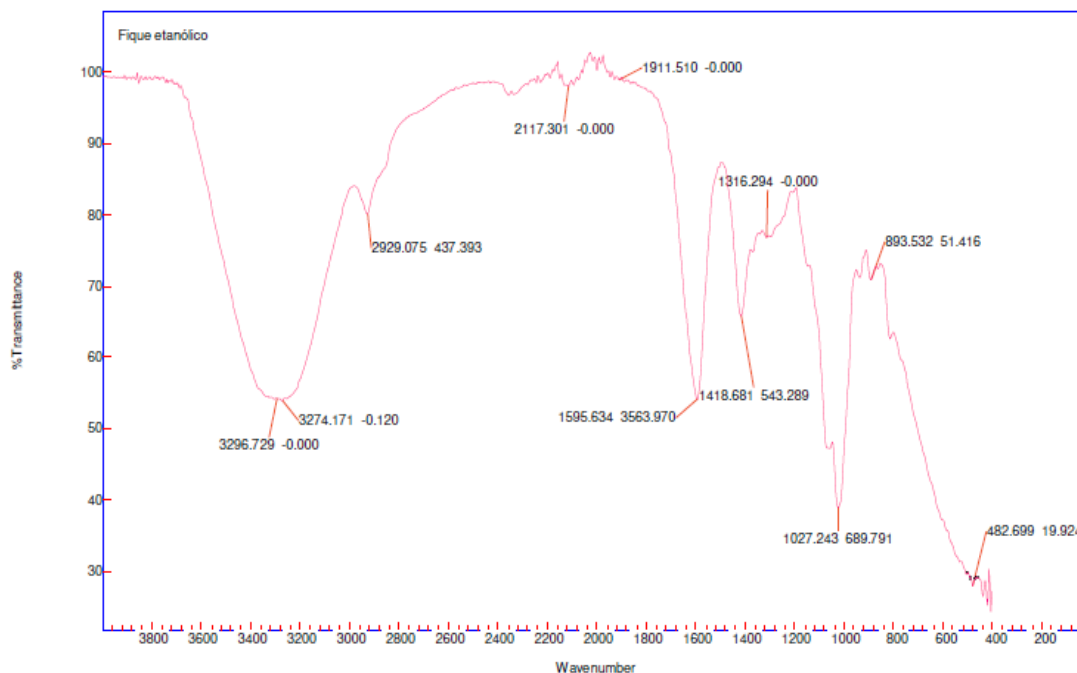


Figura A3-3. Espectrograma FTIR de microcápsulas etanólicas de fique

Las bandas espectrales obtenidas, se comparan con los datos reportados en literatura (Maache, Bezazi, Amroune, Scarpa, & Dufresne, 2017; Ochoa, 2016), y se tabulan a continuación:

Tabla A3-1. Espectrograma FT-IR para FLO, FAM Y FEM

Rango número de onda (cm ⁻¹) "Teórico"	Rango número de onda (cm ⁻¹) "FLO"	Rango número de onda (cm ⁻¹) "FAM"	Rango número de onda (cm ⁻¹) "FEM"	Origen
3600–3100	3278.466	3269.402	3274.17–3296.73	Presencia de agua en el compuesto
2950–2854	2926.423	–	2929.075	Vibraciones de estiramiento para los enlaces CH Y CH ₂ en celulosa y hemicelulosa
1740–1600	1584.803	1631.32–1892.48	1595.634	Estiramiento grupo hidroxilo
1430	–	1418.173	1418.681	Doblado simétrico de CH ₂ presente en la celulosa
1377	1376.863	–	1396.294	Vibración de flexión (C H)
1320	–	–	–	C-O interacción de anillos aromáticos en polisacáridos
1243	1259.417	1297.278	–	C-O estiramiento del grupo acetilo en la lignina
1055	1016.912	1032.972–1083.001	1027.243	C-O estiramiento del grupo hidroxilo y grupo éter en la celulosa
894	897.737	–	893.532	Enlaces glucosídicos entre los monosacáridos
670–620	521.600	569.539	482.699	Vibraciones fuera del plano involucrando en la estructura de los compuestos