

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación

Microencapsulación de conidios de *Metarhizium anisopliae* mediante
secado por aspersion y gelificación iónica

Estudiante

Eduardo Jose Altamirano Rizo

Asesores

Rogelio Trabanino, M.Sc.
Carolina Avellaneda, PhD.
Yuliana Sorto, Lcda.
Sayda Guzman, Lcda.

Honduras, noviembre 2021

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA MARGARITA MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA ODILA TREJO

Director Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Resumen

Metarhizium anisopliae es uno de los hongos entomopatógenos más utilizado en todo el mundo, además es producido en masa para el control de insectos de diferentes órdenes, entre los que destaca los lepidópteros, himenópteros, hemípteros, coleópteros, ortópteros, entre otros. Uno de los problemas más grandes que han enfrentado los bioplaguicidas para su uso comercial en el control biológico de plagas, es la estabilidad de la vida útil y la efectividad a nivel de campo. Debido a estos factores se han desarrollado diferentes formulados que involucran técnicas de microencapsulación para hongos entomopatógenos. Este proceso actúa como una envoltura de una sustancia dentro de otra, permitiendo así el mantenimiento de la viabilidad y cada una de las propiedades. Una vez que se identificó esta problemática se desarrolló esta revisión de literatura con el objetivo de evaluar el proceso de microencapsulación de conidios de *Metarhizium anisopliae* mediante dos técnicas de encapsulado. Durante la revisión de literatura se realizó una breve descripción del microorganismo, en donde se exponen las generalidades de *Metarhizium anisopliae*. Se describieron los procesos de formulación y almacenamiento de hongos entomopatógenos, enfatizando en el proceso de secado por aspersión y gelificación iónica. Se evaluó el control de calidad tomando en cuenta la concentración de conidios por gramo, el porcentaje de viabilidad antes y después del proceso de encapsulado y finalmente pruebas de patogenicidad posterior al microencapsulado mediante las dos técnicas. Ambas técnicas de encapsulado ofrecen resultados satisfactorios, cada una ofreciendo ventajas y desventajas de acuerdo con el material a encapsular y el uso al que se destina.

Palabras clave: Esporas, gelificación iónica, *Metarhizium anisopliae*, métodos de secado, microencapsulación, secado por aspersión.

Abstract

Metarhizium anisopliae is one of the most widely used entomopathogenic fungi in the world, it is also mass produced for the control of insects of different orders, among which Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Coleoptera, Orthoptera. One of the biggest problems bio pesticides have faced for commercial use in biological pest control is shelf-life stability and field effectiveness. Due to these factors, different formulations have been developed that involve microencapsulation techniques for entomopathogenic fungi. This process acts as an envelope of one substance within another, thus allowing the maintenance of viability and each of the properties. Once this problem was identified, this literature review was developed with the aim of evaluating the microencapsulation process of Metarhizium anisopliae conidia by means of two encapsulation techniques such as spray drying and ionic gelation. During the literature review, a brief description of the microorganism was made, where the generalities of Metarhizium anisopliae are exposed. The formulation and storage processes of entomopathogenic fungi were described. The quality control was evaluated considering the concentration of conidia per gram, the percentage of viability before and after the encapsulation process and finally pathogenicity tests after microencapsulation using spray drying and ionic gelation. Both encapsulation techniques offer satisfactory results, each offering advantages and disadvantages according to the material to be encapsulated and the use to which it is intended.

Keywords: drying methods, ionic gelation, Metarhizium anisopliae, microencapsulation, spores, spray drying.

Contenido

| | |
|---|----|
| Resumen | 3 |
| Índice de Figuras | 7 |
| Índice de Cuadros..... | 8 |
| Introducción..... | 9 |
| Materiales y Métodos | 11 |
| Resultados y Discusión..... | 12 |
| Descripción General de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 12 |
| Morfología Colonial..... | 12 |
| Ciclo Biológico y Patogénesis de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 13 |
| Producción de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 14 |
| Formulación | 15 |
| Secado por Aspersión | 19 |
| Gelificación Iónica..... | 23 |
| Almacenamiento..... | 26 |
| Secado por aspersion..... | 26 |
| Gelificación iónica..... | 26 |
| Control de Calidad del Microencapsulado Mediante Secado por Aspersión | 27 |
| Concentración de Conidios/gr | 27 |
| Evaluación de Viabilidad | 28 |
| Pruebas de patogenicidad | 30 |
| Control de Calidad del Microencapsulado Mediante Gelificación Iónica..... | 32 |
| Tamaño de las microesferas | 32 |
| Morfología..... | 32 |
| Rendimiento de producción | 33 |
| Contenido de principio activo..... | 33 |

| | |
|---|-------------------------------------|
| Eficiencia de encapsulación | 34 |
| Aplicación en Campo del Microencapsulado | 34 |
| Dispersión mecánica (secado por aspersión) | 34 |
| Dispersión manual de liberación lenta (gelificación iónica) | 35 |
| Conclusiones | 37 |
| Recomendaciones | 38 |
| Referencias..... | Error! Bookmark not defined. |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Aspecto macroscópico de colonias del aislamiento de <i>Metarhizium anisopliae</i> , Ma 9235, en el medio Sabouraud Dextrosa Agar. | 13 |
| Figura 2 Propágulos de ascomicetos de <i>Metarhizium anisopliae</i> : (a) fialoconidios aéreos; (b) conidios sumergidos. | 15 |
| Figura 3 Estructura de una Microcápsula. | 16 |
| Figura 4 Ilustración esquemática de los diferentes procesos de microencapsulación..... | 18 |
| Figura 5 Proceso de secado por aspersión..... | 20 |
| Figura 6 Flujograma para microencapsulación de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizando secado por aspersión..... | 22 |
| Figura 7 Apariencia de las capsulas de alginato de sodio, maltodextrina y conidios de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 23 |
| Figura 8 Perlas de alginato de sodio. | 24 |
| Figura 9 Flujograma para microencapsulación de <i>Metarhizium anisopliae</i> utilizando gelificación iónica..... | 25 |
| Figura 10 Flujograma para la evaluación de viabilidad del producto terminado de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 29 |
| Figura 11 <i>Metarhizium anisopliae</i> infectando adultos de <i>Metamasius hemipterus</i> plaga del plátano. | 30 |
| Figura 12 Flujograma para la evaluación de patogenicidad de <i>Metarhizium anisopliae</i> | 31 |

Índice de Cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1 Ventajas y desventajas de formulados en líquido..... | 17 |
| Cuadro 2 Ventajas y desventajas de formulados en sólido..... | 17 |
| Cuadro 3 Ventajas y desventajas de formulados microencapsulados..... | 17 |
| Cuadro 4 Parametros de secado..... | 21 |
| Cuadro 5 Principales plagas controladas por <i>Metarhizium anisopliae</i> | 36 |

Introducción

Uno de los factores que limita la producción de los cultivos agrícolas son las plagas. El uso indiscriminado de insecticidas orgánicos sintéticos ha traído como consecuencia la selección de individuos resistentes, la resurgencia de nuevas plagas y la contaminación ambiental y del hombre. Estos factores han hecho posible el replanteamiento de las prácticas de control de plagas (Cañedo y Ames 2004).

El control biológico puede definirse como el uso de un organismo para suprimir las actividades y poblaciones de otro organismo y se ha utilizado para manejar insectos plaga, patógenos y malas hierbas y otros tipos de plantas no deseadas (Mejía 2015). Existen muchos desafíos en el desarrollo, formulación y aplicación de los productos de control biológico, que incluyen la estabilidad de la vida útil, la inactividad en campo debido a la alta exposición a rayos UV y la actividad residual después de las aplicaciones. Estos pueden superarse formulando el producto de diversas formas y utilizando aditivos o técnicas de producción que sean adecuadas al medio de reproducción de estas. El desarrollo de formulaciones adecuadas es un componente clave para transformar los agentes de control biológico en bioplaguicidas. El desafío es optimizar la formulación para que sea práctica y económicamente viable (Jones y Burges 1998).

Los procesos de microencapsulación fueron desarrollados entre los años 1930 y 1940 por la National Cash Register para la aplicación comercial de un tinte a partir de grenetina como agente encapsulante (González et al. 2015) La microencapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas son retenidas dentro de una matriz o sistema pared con el propósito de protegerlos frente a condiciones ambientales deletéreas (Shoji et al. 2013).

Los procesos de encapsulación se pueden dividir en tres: proceso físico, químico y físico-químico. Dentro del proceso físico encontramos el secado por aspersión o pulverización, en el proceso químico encontramos la polimerización interfacial y la incompatibilidad polimérica y finalmente en el proceso físico-químico encontramos la coacervación, liposomas y gelificación iónica.

El hongo *Metarhizium anisopliae* es considerado uno de los primeros microorganismos en ser utilizado para el control biológico de insectos. Fue aislado por Metschnikoff de *Anisopliae* Herbst (1879) y fue descrito por Sorokin (1883) *Metarhizium anisopliae* se ha reportado presente, en distintos lugares del mundo, debido a su alta capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales. Ataca naturalmente más de 300 especies de insectos de diferentes órdenes, entre los que se incluyen plagas de lepidópteros, himenópteros, hemípteros, coleópteros y ortópteros de importancia agrícola (Faria y Wraight 2007).

Uno de los programas mejor conocidos es el control de langostas en África y Australia en donde se desarrollaron dos presentaciones comerciales: Green Muscle TM y Green Guard TM. Green Muscle es un recomendado por la OMS, para el control de langostas (Lomer et al. 2001). El éxito de este producto comercial se basa en la cepa de LUBILOSA la cual resulta virulenta en condiciones cálidas (30 °C), la producción masiva bifásica que resulta de dos etapas; siendo la primera de cultivos sumergidos y la segunda de fermentación sólida y por último una larga vida anaquel como resultado de adicionar aceites vegetales y gel de sílice seco a la formulación. El principio activo son las esporas del hongo natural *Metarhizium anisopliae varacridum*, posteriormente denominado *Metarhizium acridum* ya que es específico para langostas y saltamontes, este germina en la cutícula de las langostas jóvenes o adultas y perfora su dermatoesqueleto, destruyendo sus tejidos desde dentro (FAO 2006).

Finalmente, la revisión de literatura pretende de Describir y comparar el proceso de microencapsulación del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* mediante dos técnicas conocidas; secado por aspersión y gelificación iónica, dar a conocer las etapas del proceso de formulación usando la técnica de secado por aspersión y gelificación iónica, Identificar las ventajas y desventajas de las técnicas de microencapsulación por secado por aspersión y gelificación iónica y su impacto en la producción de *Metarhizium anisopliae* y por ultimo describir la aplicación en campo de *Metarhizium anisopliae* mediante las técnicas de secado por aspersión y gelificación iónica.

Materiales y Métodos

La revisión de literatura se realizó entre los meses de mayo a septiembre del año 2021, partiendo de una recopilación de información que va desde ensayos, libros, artículos científicos, reportes científicos y sitios web de alto prestigio. Para la recopilación de la información se utilizaron algunas bases de datos como: Research Gate, Google Scholar, Biblioteca Wilson Popenoe, Agora, E-libro, Scielo entre otras plataformas web de investigación. Para una mejor recopilación de información se utilizaron palabras claves como: Esporas, *Metarhizium anisopliae*, microencapsulación, secado por aspersión, gelificación iónica, métodos de secado. Se utilizó la fecha de publicación como filtro para la búsqueda dentro de los sitios web, esta información tuvo que haber sido publicada después del año 1990, además de utilizar información de autores con más de tres citas, siendo así información contundente y gran importancia. Dentro de los sitios web que contengan investigaciones en inglés se utilizarán palabras claves como: Spores, *Metarhizium anisopliae*, microencapsulated, ionic gelation, spray dry, drying methods.

Una vez recopilada la información, se procedió a realizar un análisis en donde se dio mayor relevancia de acuerdo con la importancia e impacto de la información en el control biológico y la elaboración de bioplaguicidas para el uso en la agricultura. Para esta revisión de literatura se tomaron los siguientes criterios de inclusión: la efectividad de los métodos de microencapsulación, parámetros de secado por aspersión y gelificación iónica, control de calidad, almacenamiento y efectividad de los microencapsulados en campo.

Resultados y Discusión

Descripción General de *Metarhizium anisopliae*

En el género *Metarhizium* (Hyphomycete), se han reportado siete especies: *M. anisopliae* (Metschn) Sorokin; *M. flavoviride* Gams y Rozypal; *M. album* (Petch); *M. pingshaeme* Chem y Giro; *M. guizhousense* Chem y Giro, y *M. taii* Liang y Liu (Rath et al. 1995). Fue descrito por Sorokin en 1883 y con base en sus características morfológicas se han descrito las variedades *M. anisopliae* var. *Anisopliae* (conidios más pequeños 3.5-9 mm de largo) y var. *Majus* (conidios más largos, en un rango de 9-18 mm) (Padilla Melo et al. 2000).

M. anisopliae es un patógeno que ataca naturalmente a más de 300 especies de insectos de diferentes familias, entre los cuales se encuentra el salta hojas, *Perkinsiella saccharicida*, coleópteros como *Phyllophaga* spp, ortópteros como *Schistocerca gregaria* y diversas especies de salivazo que afectan la caña de azúcar (Mendoza Mora et al. 2004). Este hongo entomopatógeno es mitospórico de reproducción asexual, el cual produce estructuras reproductivas como conidios, blastosporas y microesclerocios en condiciones ambientales adversas.

Morfología Colonial

Las colonias de *M. anisopliae* en PDA presentan un crecimiento de micelio con borde blanco y con grupos de conidióforos que se tornan coloreados al multiplicarse los conidios, con diferentes variaciones de color como se muestra en la (Figura 1), estos colores van de olivo a amarillo verdoso, de olivo a verde, decolorada en el envés, amarillo pálido y pigmento amarillo que se difunde en el medio (Padilla Melo et al. 2000). Varios autores registran que algunas características morfológicas y fisiológicas pueden contribuir en la diferenciación de aislamientos (Yip et al. 1992).

Figura 1

Aspecto macroscópico de colonias del aislamiento de Metarhizium anisopliae, Ma 9235,



Nota. Tomado de Padilla Melo et al. (2000)

La colonia de forma circular presenta un crecimiento micelar de color blanco inicialmente, exhibiendo variaciones de color cuando el hongo esporula. Los conidióforos crecen a partir del micelio de forma irregular con dos a tres ramificaciones en cada septo. Estos conidióforos presentan una longitud de 4 a 14 micras, y un diámetro de 1.5 a 2.5 micras. Los conidios son estructuras unicelulares, aseptados y de forma cilíndrica y truncada que forman largas cadenas. Los conidios tienen una longitud de 4 a 10 micras y un diámetro que va de 2 a 4 micras. Estas estructuras se obtienen principalmente de forma masiva a partir de la fermentación sólida, en donde se usan cereales como sustrato.

Ciclo Biológico y Patogénesis de Metarhizium anisopliae

Metarhizium anisopliae es un microorganismo aeróbico ya que requiere de oxígeno para sobrevivir. Es considerado un hongo endófito, debido a que la mayor parte de su ciclo biológico coloniza los tejidos internos de su huésped. Este hongo se caracteriza por ser mesófilo, con una temperatura óptima para germinación y crecimiento de 25 a 30°C, una temperatura máxima de 32 a 35 °C y una temperatura mínima de 10 a 12 °C (Padilla Melo et al. 2000). El ciclo biológico comprende

una fase infectiva celular en el interior del insecto y otra saprofita cuando el hongo completa su ciclo al aprovechar los nutrientes del cadáver del insecto (Khachatourians y Qazi 2008). Los insectos muertos por este hongo son inicialmente cubiertos de forma total por micelio de color blanco, el cual se torna verde cuando el hongo esporula solo en el interior del insecto. Generalmente, condiciones favorables, la germinación ocurre a las 12 horas posteriores a la infección. El proceso infectivo se da cuando las esporas son retenidas en la superficie del integumento, donde se inicia la formación del tubo germinativo, comenzando el hongo a excretar enzimas como las proteasas, quitinasas, quitobiasas, lipasas y lipooxigenasas. Estas enzimas degradan la cutícula del insecto y coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, que es una estructura especializada formada en el tubo germinativo. Una vez dentro del insecto, el hongo se desarrolla como cuerpos hifales que se van diseminando a través de la hemolinfa e invaden diversos tejidos musculares ocasionando la muerte del insecto (Días Pucheta et al. 2006). Una vez penetrado el insecto, las hifas se ramifican en su interior, invadiendo completamente la presa después de 3-4 días y completando la patogénesis del huésped a los 4-5 días (Vázquez Chacón 2018).

Durante la patogénesis, *M. anisopliae* tiene la capacidad de sintetizar enzimas extracelulares que pueden degradar polímeros de la cutícula (proteínas, lípidos y quitina), permitiendo el aprovechamiento de nutrimentos para su crecimiento (Leger et al. 1988).

Producción de Metarhizium anisopliae

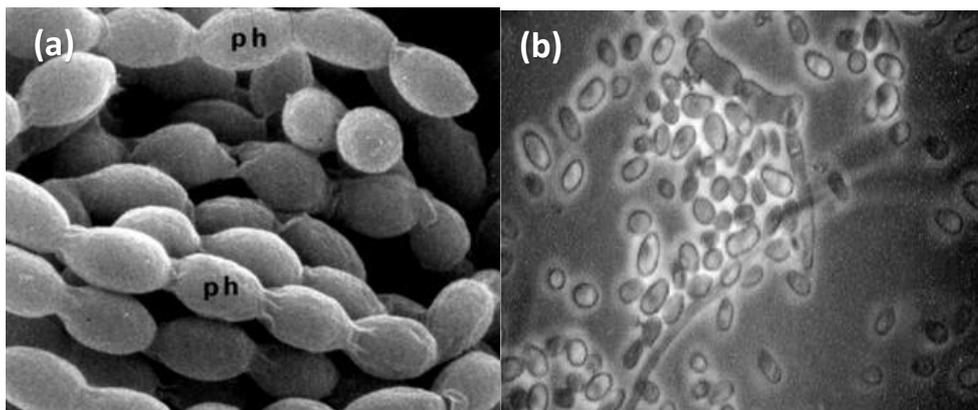
Uno de los propágulos más utilizados en la producción masiva de *Metarhizium anisopliae* son los conidios, tal como se muestra en la (Figura 2). Los conidios son cuerpos especializados, los cuales poseen una gruesa capa exterior, constituida por tres capas que protegen el interior de la espora (Jaronski y Mascarin 2014). Esto provoca que la pared de la espora la aisle del ambiente y permita que esta sobreviva a condiciones adversas al estar en latencia, hasta que se den las condiciones para su germinación.

La producción masiva de *Metarhizium anisopliae* se realiza utilizando principalmente dos metodologías como la producción por fermentación sólida y por cultivos sumergidos o fermentación

liquida. En la fermentación líquida los nutrientes se encuentran suspendidos libremente en el volumen de medio de cultivo. El proceso de fermentación líquida se realiza mediante la utilización de un biorreactor con condiciones controladas aptas para la producción y supervivencia de propágulos infectivos sumergidos. En la fermentación sólida se producen principalmente conidios aéreos (Figura 2) en donde se necesita como sustrato un cereal, principalmente arroz, trigo, maíz, y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados actualmente como se muestra. El objetivo de la producción masiva de *Metarhizium anisopliae* mediante la fermentación sólida o fermentación líquida es producir propágulos infectivos con un porcentaje de viabilidad superior al 95% (Avila de Moreno y Umaña 1988).

Figura 2

Propágulos de ascomicetos de Metarhizium anisopliae: (a) fialoconidios aéreos; (b) conidios



Nota. Tomado de Jaronski y Mascarin (2014); Fargues et al. (2002)

Formulación

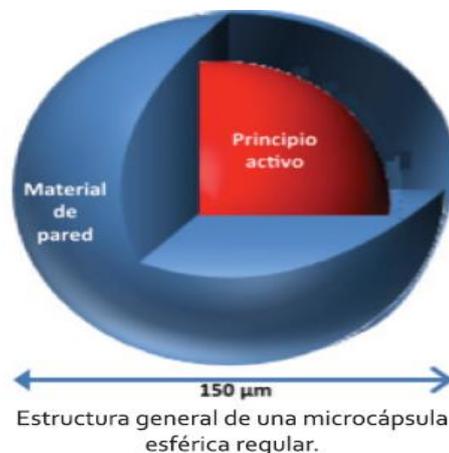
La formulación con hongos entomopatógenos para el control de plagas se origina de un proceso orgánico, el cual representa una alternativa viable. Es un proceso mediante el cual el propágulo infectivo del hongo entomopatógeno se mezcla con ciertos materiales inertes, tales como vehículos, solventes, emulsificantes o gelificantes, y otros aditivos que pueden ser nutrientes o estimulantes. Estos materiales favorecen la longevidad del hongo, ya sea protegiéndolo del medio ambiente, aumentando su vida útil o mejorando su viabilidad, además ayudan a su desarrollo una vez aplicado en campo (Urtania H y France 2007).

Entre las formulaciones más utilizadas destaca la formulación líquida, formulación sólida y la microencapsulación. Cada una de estas formulaciones presenta ventajas y desventajas (Cuadro 1, 2 y 3) las cuales serán de gran utilidad de acuerdo con el objetivo y tipo de aplicación en campo. Las formulaciones sólidas deben utilizar un vehículo, el cual puede ser de origen mineral o vegetal, que además de proporcionar una buena distribución de los propágulos infectivos, ayude a absorber la humedad de estas y que las mantenga viables por un tiempo considerable. En el caso de la formulación líquida se utiliza un líquido solvente y un emulsificante (o un aceite emulsificante). El líquido utilizado tiene la función de mantener suspendidos los propágulos infectivos en el medio para lograr una mezcla homogénea que garantice una buena aplicación en campo (Monzón 2000).

La formulación de microencapsulados es una técnica que protege a los materiales encapsulados de factores como el calor o la humedad, permitiendo mantener su estabilidad y propiedades. Ayuda a que los hongos microencapsulados sean liberados parcialmente por factores como disolución en agua, humedad del suelo en caso de aplicar capsulas de alginato, temperatura, reacciones químicas y enzimáticas o por cambios en la presión osmótica (MJ Martín Villena et al. 2009). Una microcápsula consiste de una membrana fuerte, delgada, semipermeable y esférica que rodea un núcleo sólido o líquido con un diámetro que varía de unas micras a 1 mm como se muestra en la (Figura 3).

Figura 3

Estructura de una Microcápsula.



Nota. Tomado de Díaz Sandoval (2019)

Existen técnicas que permiten llevar a cabo la microencapsulación de diversos compuestos y microorganismos y se ha sugerido que podrían identificarse más de 200 métodos; en la literatura (Figura 4); (Brazel C.S 1999). Las formulaciones obtenidas deben tener una viabilidad igual o superior al 95% y una humedad de 4 a 6 %.

Cuadro 1

Ventajas y desventajas de formulados en líquido.

| Ventajas | Desventajas |
|---|--|
| Baja volatilidad. | Baja cantidad de propágulos infectivos. |
| Menor degradación de los propágulos infectivos. | Los propágulos infectivos deben ser totalmente soluble en el solvente en un intervalo de temperaturas. |
| Toxicidad reducida. | Baja resistencia a la lluvia. |
| Seguro para la manipulación. | La mezcla de propágulos infectivos más solventes y emulsificantes deben ser estables a cambios de temperatura. |

Cuadro 2

Ventajas y desventajas de formulados en sólido.

| Ventajas | Desventajas |
|--|--|
| Distribución uniforme de los propágulos infecciosos. | Altos niveles de polvo pueden ser un motivo de malestar del operador durante la fabricación y aplicación del producto. |
| Alta carga de propágulos infecciosos posibles. | Debe realizarse una mezcla previa con aceites para la aplicación en campo. |
| No necesita de solventes. | Requieren constante agitación. |
| Barato para producir y empaçar. | |

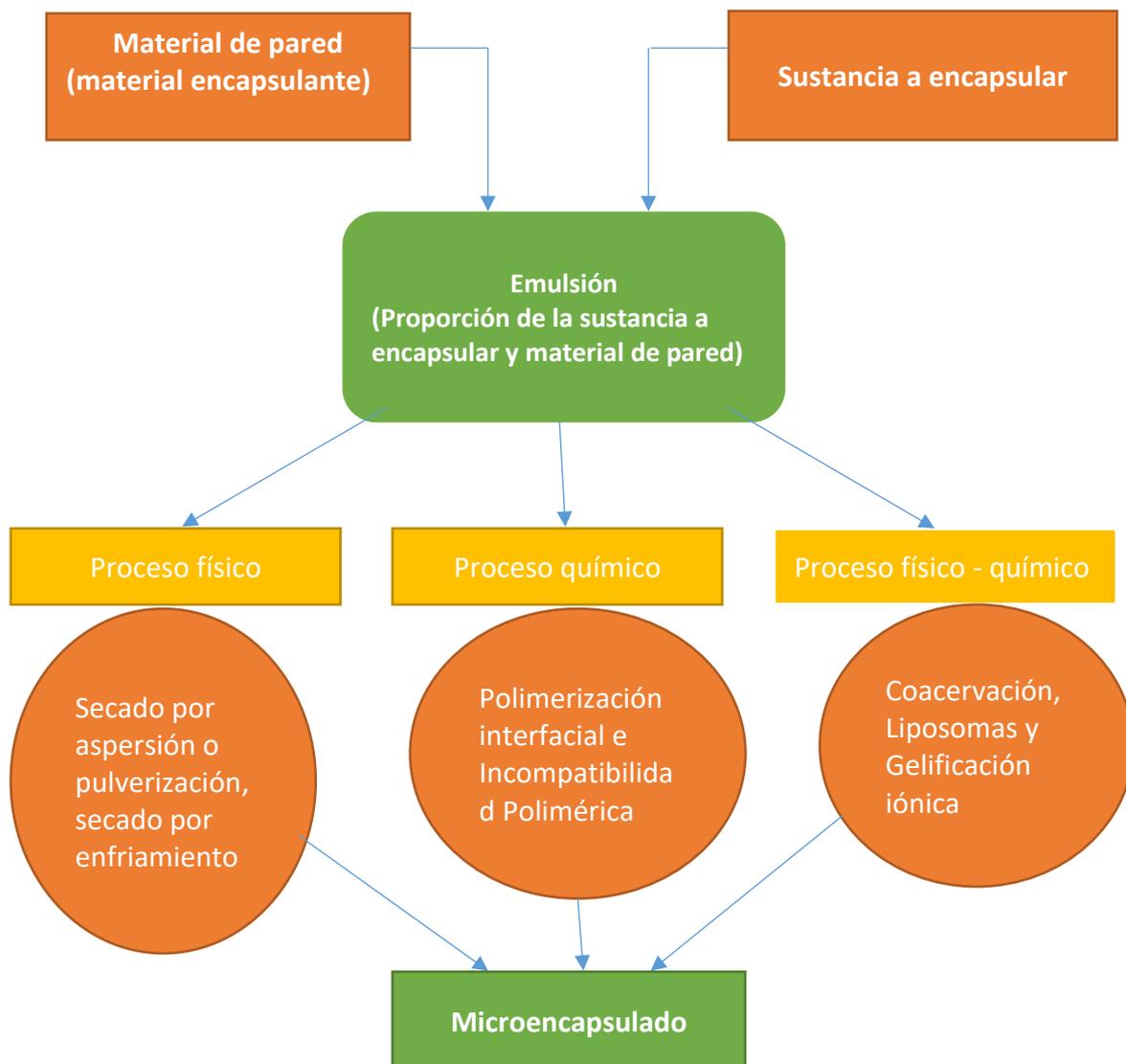
Cuadro 3

Ventajas y desventajas de formulados microencapsulados.

| Ventajas | Desventajas |
|--|--|
| Baja generación de polvo. | Altos niveles de polvo pueden ser un motivo de malestar del operador durante la fabricación y aplicación del producto. |
| Fácil manejo y medición. | Para formar de manera masiva puede necesitar de equipos especializados. |
| Mayor protección al propágulo infectivo. | Resulta más caro que formulaciones solidas o liquidas. |
| Tolera bajas temperaturas. | |

Figura 4

Ilustración esquemática de los diferentes procesos de microencapsulación



Nota. Tomado de Parra Huertas (2010)

En este esquema se describen los procesos para microencapsulación, así como las diferentes técnicas de microencapsulación más utilizadas. Primeramente, se debe de conocer el material encapsulante o material de pared, el cual será el responsable de cubrir el ingrediente activo del microencapsulado. Posteriormente se hace la emulsión, la cual consta de una proporción del material de pared y la sustancia a encapsular. Finalmente se utiliza una de las técnicas de microencapsulación de acuerdo al material que se planea encapsular.

Dentro del estudio se abordará el proceso de pulverización o secado por aspersión y el proceso de gelificación iónica.

Secado por Aspersión

Este método de secado apareció en la década de 1870 hasta 1900, sin embargo, en la actualidad está recobrando importancia y está teniendo un impacto significativo en diversas áreas tanto a nivel agroindustrial como a nivel agronómico.

Esta técnica de secado ha sido utilizada ampliamente para el secado de materiales altamente sensibles al calor, entre ellos alimentos, fármacos, microorganismos, vitaminas, proteínas, entre otros, debido a la rápida evaporación del disolvente que generalmente es agua. En este caso, el contenido de humedad del material es removido a través de aplicación de calor bajo condiciones controladas, disminuyendo así reacciones enzimáticas y microbiológicas, de tal manera que la alimentación en estado fluido (solución, dispersión o emulsión) a la cámara de secado, es transformada al ponerse en contacto con aire caliente, obteniéndose como producto seco en forma de polvo o de aglomerados (Alamilla-Beltrán et al. 2005).

Proceso de Secado por Aspersión de Propágulos de *M. anisopliae*

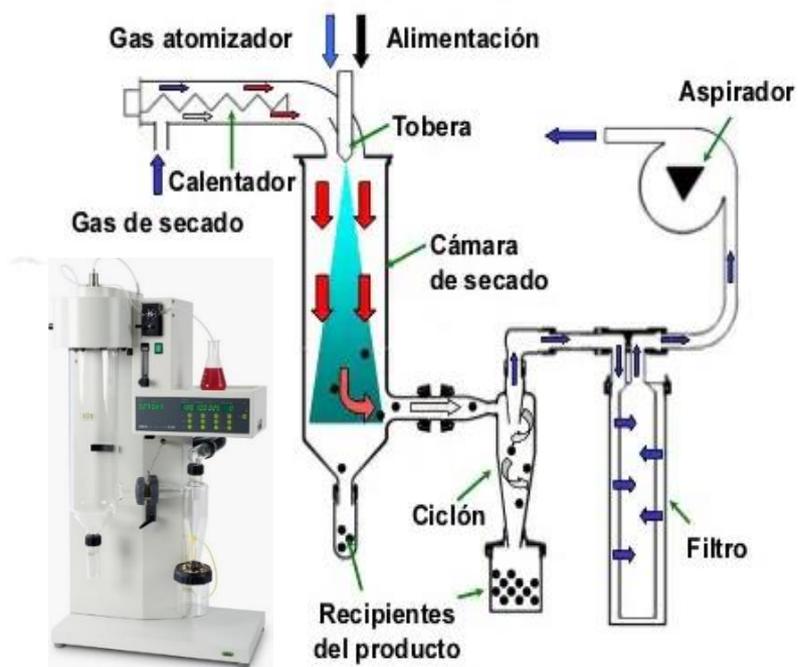
Estos secadores pueden operar con un rango de temperaturas de ingreso de aire (150-300 °C) y su eficiencia de operación es comparable o mejor que la de otros tipos de secadores. En la cámara de secado el material sometido al tratamiento no entra en contacto directo con una superficie sólida hasta que ha llegado a ser secado evitándose así problemas de contaminación. La temperatura del producto es baja aun cuando la temperatura del secador sea alta; la evaporación tiene lugar en una superficie grande, donde el tiempo del secado es bastante corto (1-10 segundos) y la temperatura de las partículas secas no se aproximará a la del aire de salida hasta que la mayor parte de agua haya sido evaporada, de esta manera se evita el sobrecalentamiento. El producto obtenido es un polvo con características de flujo libre y de granulación uniforme (Siccha M y Lock de Ugaz 1995).

La alimentación puede ser una solución, suspensión, dispersión o emulsión (Patel R et al. 2009). En este caso la alimentación es la solución de conidiosporas o blastosporas de *Metarhizium anisopliae* preparada en un medio líquido.

La solución líquida de los propágulos infectivos se dispersa en una solución de polímero con un disolvente adecuado, la mezcla se pulveriza en una cámara en donde circula aire caliente. Esta cámara es capaz de suministrar la temperatura adecuada de vaporización para eliminar el disolvente del material de cubierta. Finalmente se obtiene un producto microencapsulado con una mayor vida anaquel. El procedimiento está representado y descrito (Figura 5) (Figura 6).

Figura 5

Proceso de secado por aspersion.



Nota. Modificado de (Gómez Aguilera)

Parámetros de Secado

Los principales factores que deben ser optimizados en secado por aspersión son la temperatura de alimentación, temperatura de entrada y salida (Cuadro 4).

Cuadro 4

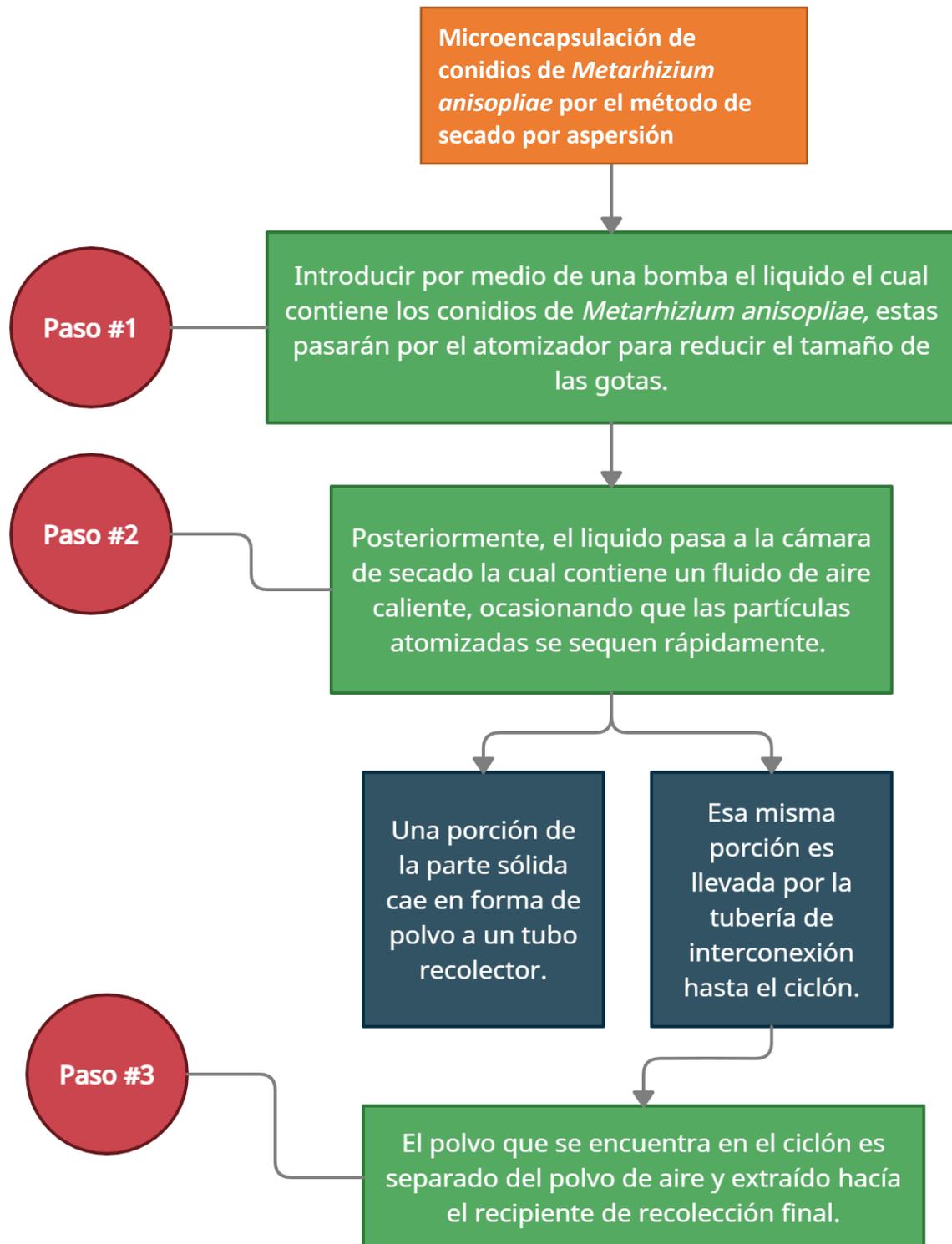
Parametros de secado.

| Parametros de secado | Caracteristicas afectadas |
|--------------------------------|--|
| Temperatura de alimentación | La temperatura de alimentación modifica la viscosidad de la emulsión. Cuando la temperatura de alimentación se incrementa, la viscosidad y tamaño de gota puede disminuir, pero a altas temperaturas puede ocurrir una volatilización o degradación de algunos ingredientes sensibles al calor. La velocidad de alimentación suministrada al atomizador se ajusta para asegurar que cada gota asperjada alcance los niveles de secado deseados antes de que se ponga en contacto con la superficie de la cámara de secado. |
| Temperatura de aire de entrada | La temperatura del aire de entrada se determina por la temperatura que puede ser usada sin producir un daño al producto. Esta temperatura es directamente proporcional a la velocidad de secado de las microcápsulas y al contenido de agua final. Una temperatura baja de aire de entrada provoca una baja velocidad de evaporación, una deformación de las microcápsulas con alta densidad, alto contenido de agua, poca fluidez y serán susceptibles a aglomerarse. Sin embargo, una temperatura alta de aire de entrada provoca una evaporación excesiva y resulta en el rompimiento de la membrana, induciendo una subsecuente liberación prematura, así como una degradación del ingrediente encapsulado y una pérdida de volátiles. Se han reportado mayores tasas de supervivencia a una temperatura de entrada de 50 a 60 °C. |
| Temperatura de aire de salida | La temperatura en la zona final de secado o temperatura de salida de aire se considera como un parámetro de control del secador, la cual depende de la temperatura de entrada y se ha reportado que varía de 50 a 80°C para microencapsulación. Para una mayor sobrevivencia de propágulos de <i>Metarhizium anisopliae</i> la temperatura de salida oscila entre 30 y 40 °C. |

Nota. Tomado de Medina-Torres et al. (2013)

Figura 6

Flujograma para microencapsulación de *Metarhizium anisopliae* utilizando secado por aspersión.



Gelificación Iónica

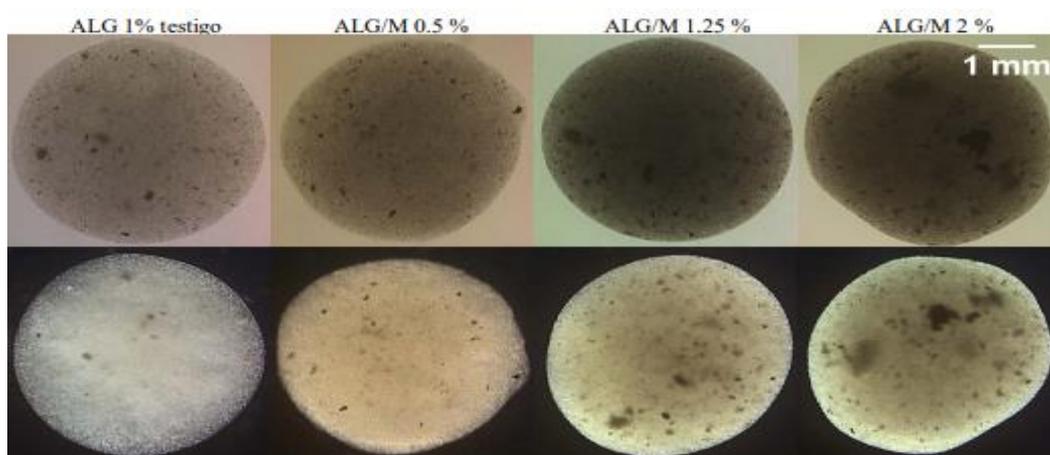
Este método utiliza biopolímeros aniónicos como material pared, que en combinación con iones divalentes como el calcio inducen la formación del gel, que finalmente origina la microcápsula (González Cuello et al. 2014).

La formación de microcápsulas por el método de gelación iónica consiste en la formación de una emulsión de dos fases, una hidrofóbica y otra hidrófila, esta última fase está compuesta por el biopolímero aniónico; en donde por agitación, se origina una gran cantidad de gotas, que son gelificadas por acidificación con δ gluconolactona; liberando gradualmente el calcio contenido en la sal utilizada (CaCO_3) por reacción de sustitución (González et al. 2015).

En cuanto al material de pared de esta técnica, alginato de sodio es una alternativa para las formulaciones de bioplaguicidas, debido a su compatibilidad con microorganismos. Además, la adición de carbohidratos a la formulación en el caso de maltodextrina como se observa en la (Figura 7) mejora la viabilidad de los propágulos de infección en este caso de conidios de *M. anisopliae*, lo cual fue reportado por (Gonzales Cadena 2019).

Figura 7

Apariencia de las capsulas de alginato de sodio, maltodextrina y conidios de Metarhizium anisopliae.



Nota. Tomado de Gonzales Cadena (2019)

Proceso de Gelificación Iónica con Alginatos en M. anisopliae.

El proceso de formación del gel se inicia a partir de una solución de sal de Alginato y una fuente de calcio externa o interna desde donde el ion calcio se difunde hasta alcanzar la cadena polimérica, como consecuencia de esta unión se produce un reordenamiento estructural en el espacio resultando en un material sólido con las características de un gel como se muestra en la (Figura 8) (Fuentes y López de Ramos 2001).

El metodo consiste en suspender los propagulos infectivos, en este caso conidios de *M. anisopliae* en una solución acuosa de alginato de sodio al 2%. Posteriormente, la mezcla es adicionada mediante goteo sobre una solución acuosa de CaCl_2 al 5%, la cual se encuentra sometida a una velocidad de agitación de (750 rpm). Al entrar en contacto la gota de alginato de sodio con el Ca^{2+} se produce la gelificación instantanea dando como resultado una membrana o cubierta de alginato cálcico que es insoluble en agua pero permeable. El procedimiento de esta técnica esta descrito (Figura 9).

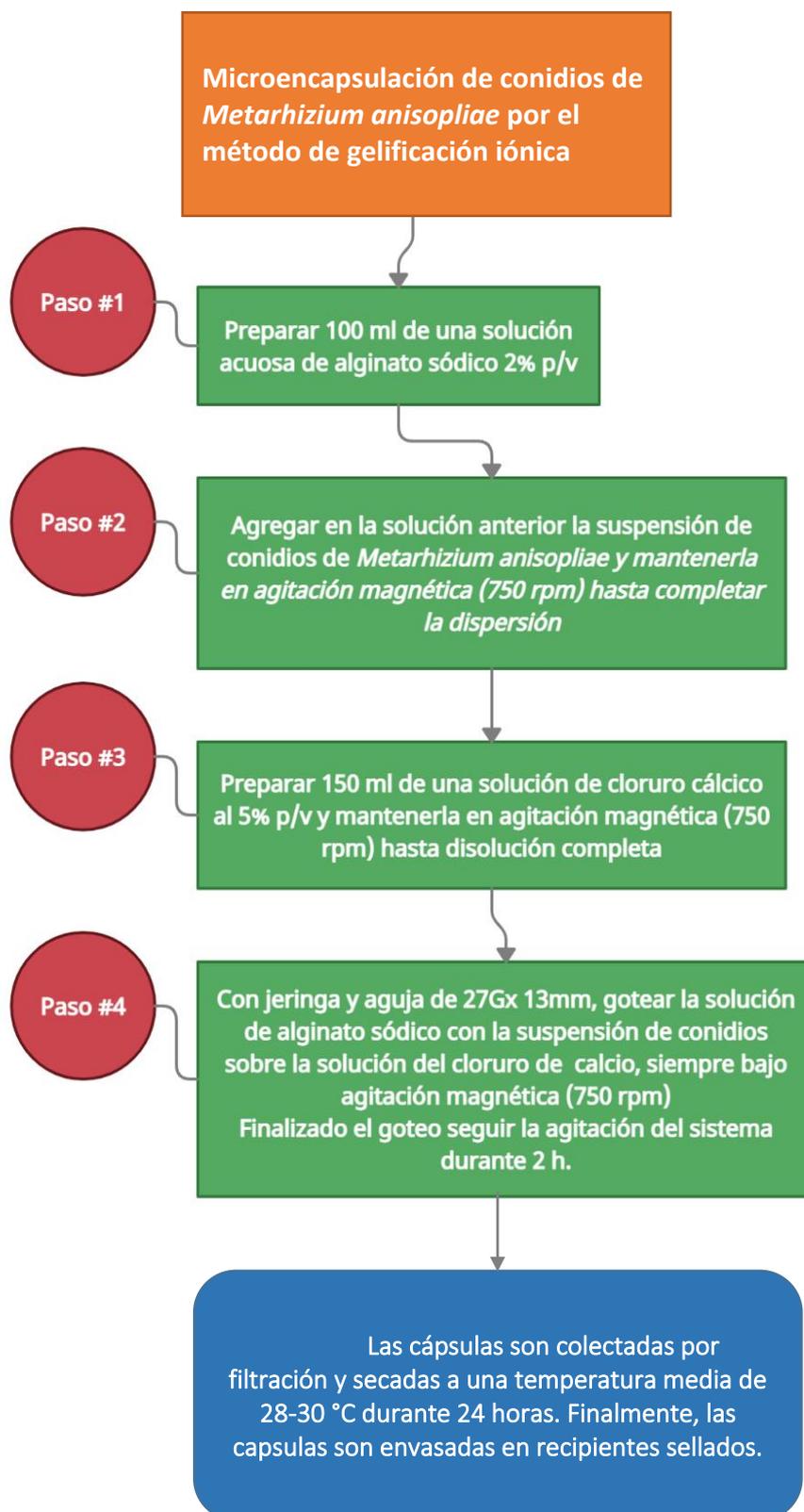
Figura 8

Perlas de alginato de sodio.



Figura 9

Flujograma para microencapsulación de *Metarhizium anisopliae* utilizando gelificación iónica.



Almacenamiento

Secado por Aspersión

En lo que refiere al secado por aspersión la temperatura y humedad son factores críticos durante el almacenamiento y la comercialización, pues determina la vida útil del formulado. Claramente se observa que la vida útil disminuye a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento, lo que ha sido demostrado para diferentes especies fúngicas (Alves et al. 2002). Por otro lado, la humedad residual es otro factor que determinará la capacidad de germinación del formulado durante diferentes periodos de tiempo.

Una vez que se tienen las microcápsulas de *Metarhizium anisopliae* por el método de secado por aspersión es importante obtener un porcentaje de humedad residual igual o menor al 5%. Un porcentaje de humedad residual superior al 5% podría afectar el tiempo de almacenamiento, así como reducir el porcentaje de germinación. La humedad es controlada por las temperaturas de entrada y salida del secado por aspersión, estas temperaturas varían desde 30 °C a 300 °C. Varios estudios recomiendan una temperatura de entrada de 60 °C y 40 °C de temperatura de salida. Cabe destacar que para obtener los mejores resultados durante el almacenamiento se puede adicionar capsulas de sílice al formulado para obtener tasas de supervivencia máxima del 90% a temperaturas de 10 °C durante 3 meses en bolsas de polipropileno. Luego de este tiempo, el porcentaje de germinación va disminuyendo paulatinamente.

Gelificación Iónica

Como referente al almacenamiento mediante la microencapsulación usando la técnica de gelificación iónica, las microcápsulas deben ser almacenado a una temperatura de 4 °C para ser utilizadas en un periodo de tiempo de 6 a 12 meses y a temperatura ambiente para un periodo corto de tiempo de 30 – 60 días (Liu y Da Liu 2009). Las microcápsulas se almacenan en frascos o recipientes oscuros que no permitan la entrada de luz, ya que la radiación ultravioleta podría afectar la actividad

biológica del material formulado. Estos recipientes deben estar cerrados herméticamente para evitar la absorción o penetración de agua.

Control de Calidad del Microencapsulado Mediante Secado por Aspersión

El control de calidad de producto debe respaldarse con pruebas específicas como la concentración de esporas, viabilidad de las esporas y las prueba de patogenicidad resultantes en la infección sobre el insecto de interés (Albuquerque Maranhão AElizabeth y Albuquerque Maranhão HEduardo 2008) además, esta debe de seguir hasta su aplicación en campo para evaluar su efectividad biológica.

Concentración de Conidios/gr

Un método muy utilizado para determinar las concentraciones es hacer una serie de diluciones del microencapsulado en 10 mL de una solución con Tween 80 al 0.1 % con él objetivo de evitar aglomeración de conidios y de esta manera facilitar el conteo. Luego de esto para realizar el conteo se utiliza una cámara Neubauer, en la cual se tomará una alícuota de la dilución seleccionada para el conteo la cual puede ser desde $(10)^{-1}$ hasta $(10)^{-6}$ para ser contadas haciendo uso de un microscopio hasta obtener un promedio. Para finalmente calcular la concentración de conidios/gr se hace mediante la ecuación 1, se debe de multiplicar el número de conidios observadas en el cuadro, por el factor de la cámara (puede ser de 10,000 para los cuadros principales y 250,000 para los cuadrados secundarios) y luego multiplicarlo por el factor de dilución seleccionado.

Ecuación 1

Concentración de conidios/gr.

$$\text{No. conidios/mL} = \text{No. conidios en el cuadro} \times \text{factor de la cámara} \times \text{factor de dilución}$$

Nota. Tomado de Monzón (2000)

De acuerdo con Acuña Jiménez et al. (2015) Utilizando la técnica de secado por aspersion se estima que las concentraciones óptimas para un excelente control deben ser de 2.5×10^9 conidios/gr.

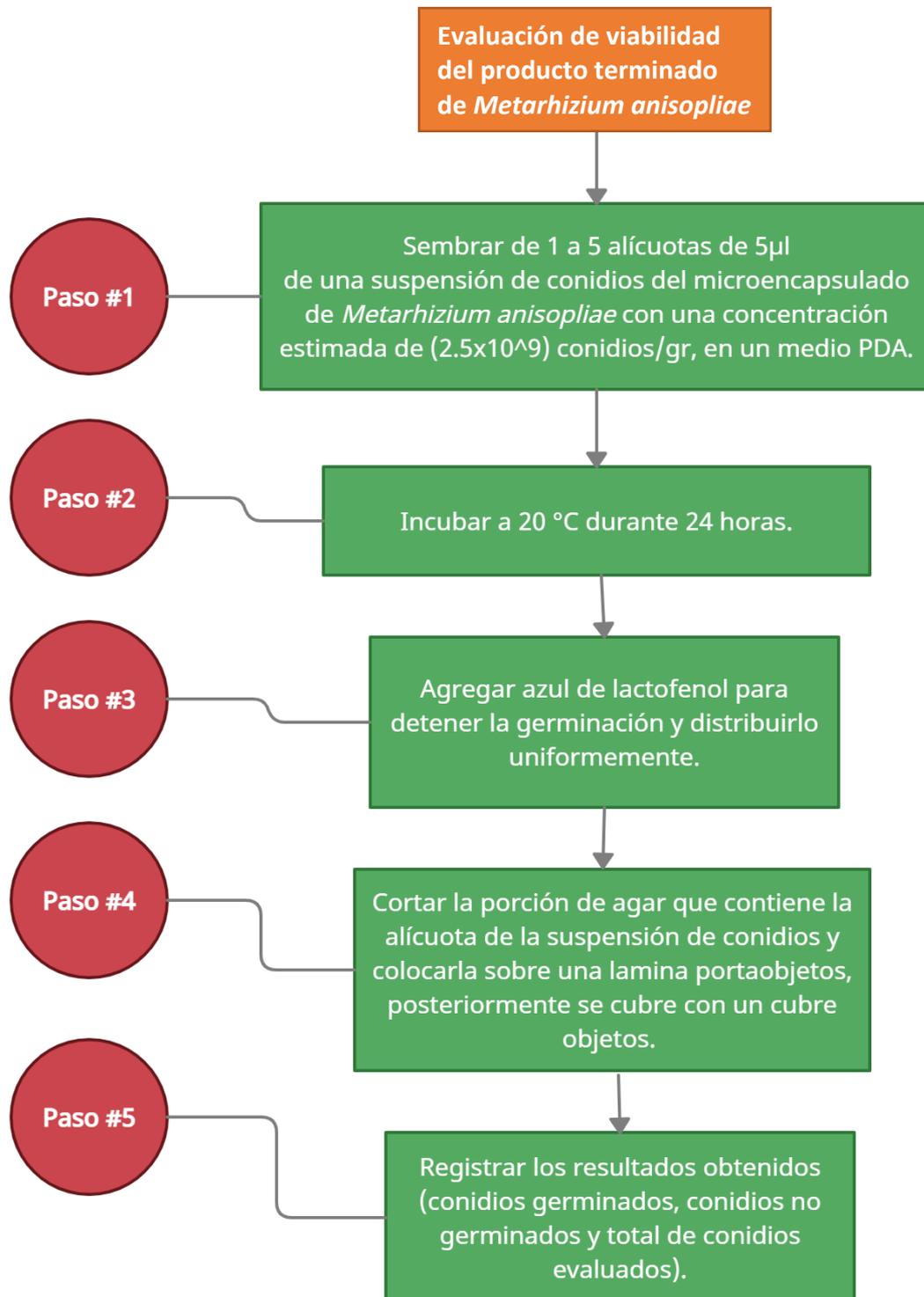
Evaluación de Viabilidad

La evaluación del porcentaje de viabilidad consiste en obtener la concentración efectiva del hongo, por lo tanto, se prepararán las dosis a utilizar en campo y se determinará el porcentaje de germinación el cual nos indicará cual será el porcentaje de viabilidad efectiva en campo.

La evaluación estará dada en este caso por el número de conidios germinados, el número de conidios no germinados y el total de conidios evaluados (Figura 10). El porcentaje de viabilidad deberá ser del 100% o lo más cercano a este valor para que este pueda causar infección, y pueda ser de gran efectividad en campo. El porcentaje de viabilidad obtenido es utilizado para calcular la cantidad de producto que se debe de producir, y a su vez la dosis requerida por el área a tratar (Monzón 2000).

Figura 10

Flujograma para la evaluación de viabilidad del producto terminado de *Metarhizium anisopliae*.



Nota. Adaptado de Vélez et al. (1997)

Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad son realizadas para evaluar la eficiencia del material que se utilizara para controlar insectos plagas o enfermedades.

Estas pruebas generalmente están diseñadas en un ambiente donde se proporcionen las condiciones ideales para que ocurra la exposición del hongo formulado al patógeno, para que ocurra la germinación e invasión del hospedante y favorezca la esporulación del hongo sobre el insecto huésped (Figura 11) para finalmente determinar si la mortalidad se debió a la exposición del hongo. El procedimiento para evaluar la patogenicidad se describe (Figura 12).

Sin embargo, ya que estas pruebas generalmente se realizan en ambientes controlados, la eficiencia de infección y control del hongo sobre el insecto no siempre será igual a los resultados obtenidos en condiciones de campo, por lo tanto, es debidamente necesario la realización de un ensayo en campo posteriormente a la evaluación de la patogenicidad en laboratorio.

Figura 11

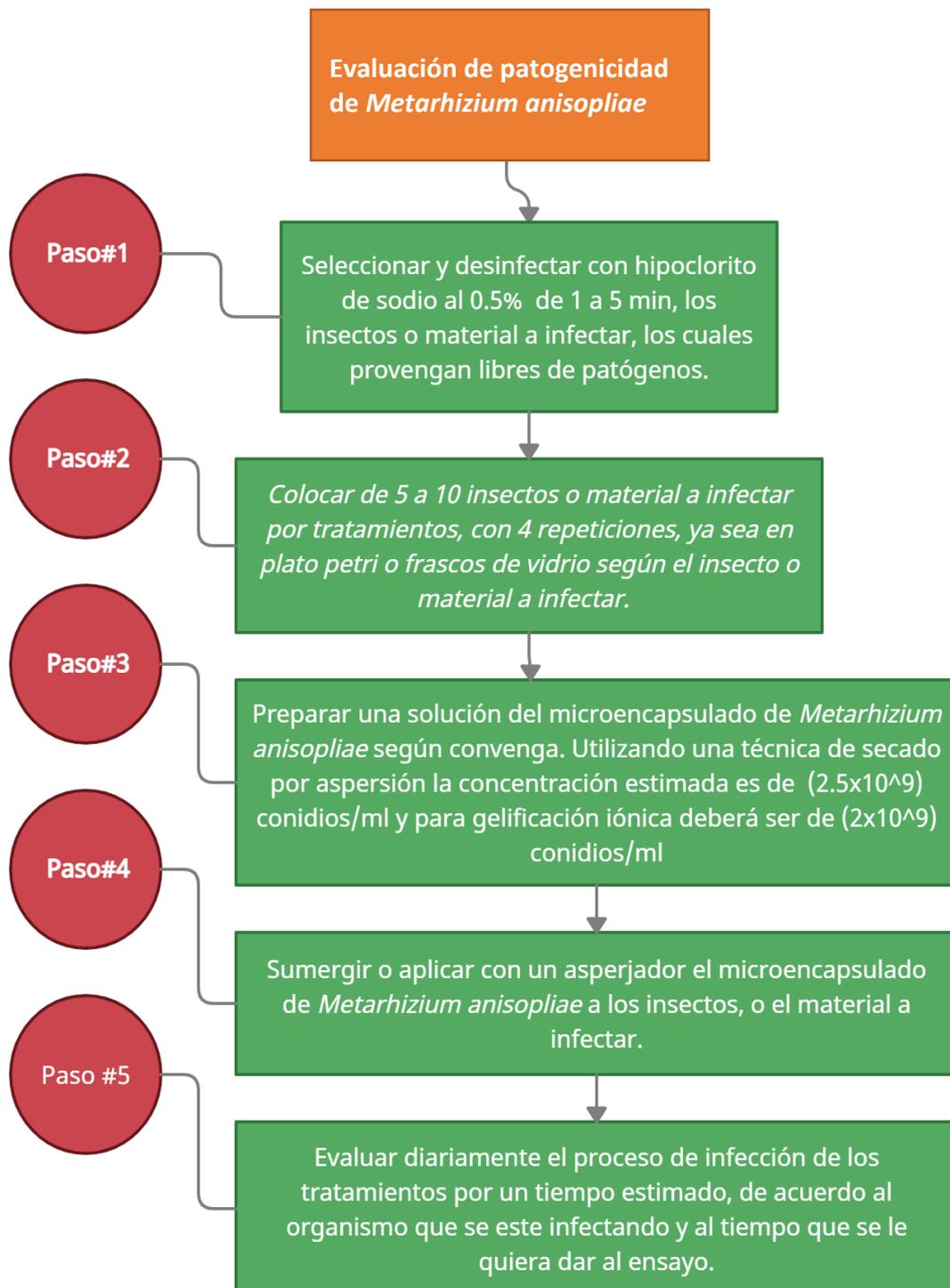
Metarhizium anisopliae infectando adultos de *Metamasius hemipterus* plaga del plátano.



Nota. Tomado de Góngora Botero (2008)

Figura 12

Flujograma para la evaluación de patogenicidad de *Metarhizium anisopliae*.



Nota. Adaptado de Vélez et al. (1997)

Control de Calidad del Microencapsulado Mediante Gelificación Iónica

Tamaño de las Microesferas

Para determinar el tamaño y la distribución de frecuencia de las partículas se dispone a utilizar el método de retención por tamices, el cual es uno de los métodos más sencillos para medir el tamaño y distribución de partículas.

Consiste en hacer pasar 100 g del material encapsulado de conidios de *M. anisopliae* a través de una serie de tamices circulares cercano a los 20 cm de diámetro y 7 cm de altura respectivamente. Estos tamices son organizados del más grande al más pequeño, de manera que encajen herméticamente. Posteriormente, los tamices son sometidos a una vibración constante durante 10 minutos hasta que el material quede distribuido entre los tamices. Finalmente, la prueba se da por concluida cuando el residuo no varía en más de 0.1 %/minutos (López Hernández y Gómez Carril 2008).

Morfología

Para determinar la morfología de las microcápsulas de alginato se utiliza el método microscópico, el cual se basa en la medición de las partículas contra un patrón de referencia para el tamaño. Para realizar el procedimiento se debe de tomar una muestra del microencapsulado de 0.2 g y observar las partículas desde 0.5 – 1000 μm en un microscopio con objetivos de 40 a 100x. La exactitud del método dependerá de tomar una muestra representativa y de la experiencia del analista en la preparación y conteo de las partículas (López Hernández y Gómez Carril 2008).

Rendimiento de Producción

El rendimiento de producción refleja el porcentaje de microesferas que se obtienen con respecto a la cantidad total del material empleado de microcápsulas con conidios de *M. anisopliae*. Este rendimiento es determinado con la ecuación 2.

Ecuación 2

Rendimiento de producción.

$$\text{Rendimiento de producción} = \frac{M}{\text{ASA} + A + \text{CaCl}_2} \times 100$$

Nota. Tomado de López Hernández y Gómez Carril (2008)

Donde:

ASA: Cantidad en gramos de la suspensión a encapsular

A: Cantidad en gramos de alginato de sodio utilizado

CaCl₂: Cantidad en gramos de cloruro de calcio utilizado

M: Cantidad en gramos de microesferas obtenidas al final del proceso

Contenido de Principio Activo

El contenido en principio activo o capacidad de encapsulación hace referencia en este caso a la cantidad suspendida de conidios de *Metarhizium anisopliae* encapsuladas en las microesferas. El porcentaje del principio activo se determina con la ecuación 3.

Ecuación 3

Contenido de principio activo (%).

$$\text{Contenido de principio activo (\%)} = \frac{\text{cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{peso final de microcapsulas}} \times 100$$

Nota. Tomado de López Hernández y Gómez Carril (2008)

Eficiencia de Encapsulación

La eficiencia de encapsulación se calcula a partir de la relación entre el principio activo encapsulado y la cantidad teórica de principio activo. El porcentaje de eficacia de encapsulación se determina con la ecuación 4.

Ecuación 4

Eficiencia de encapsulación (%).

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{cantidad de principio activo encapsulado}}{\text{cantidad teórica de principio activo}} \times 100$$

Nota. Tomado de López Hernández y Gómez Carril (2008)

Aplicación en Campo del Microencapsulado

Dispersión Mecánica (secado por aspersión)

La mezcla del microencapsulado de *Metarhizium anisopliae* debe de realizarse de manera separada. Se disuelve en agua la suspensión en polvo de conidios de *Metarhizium anisopliae*, posteriormente a la mezcla se agrega como aditivo aceite de maíz a una relación 4:1, el cual de acuerdo con Rodríguez Colorado et al. (2002) es un excelente aditivo para la mezcla en campo de *Metarhizium anisopliae*. Cabe mencionar, que los formulados a base de organismos entomopatógenos no deben mezclarse con fungicidas de origen químico, ya que estos podrían afectar la viabilidad y germinación del organismo entomopatógeno. Si se puede utilizar como adición el hidróxido de cobre, ya que se ha demostrado que este, genera una acción sinérgica con varias plagas.

Las aplicaciones mediante una dispersión mecánica deben de realizarse por la tarde para aprovechar la baja radiación solar y las bajas temperaturas durante la noche. El efecto de los hongos entomopatógenos no es inmediato, por lo que se recomienda hacer aplicaciones de manera preventiva, o cuando la incidencia de la plaga no ha alcanzado el nivel crítico de infección.

Dispersión Manual de Liberación Lenta (gelificación iónica)

La dispersión manual de liberación lenta consiste en la aplicación directa al suelo de las capsulas para el control de insectos como *Phyllophaga spp.* del orden Coleoptera descrita (Cuadro 5). Este método de aplicación ofrece la liberación controlada de los conidios de *Metarhizium anisopliae* durante un periodo de tiempo, el cual es determinado por la dureza de las capsulas. Cuando las capsulas entran en contacto con la humedad del suelo, los conidios se van dispersando controladamente por el suelo. Al ser una dispersión de liberación lenta se hace una sola aplicación, sin embargo, si la plaga persiste se recomienda hacer una segunda aplicación a los 30 días después de la primera aplicación. Las aplicaciones pueden realizarse durante la mañana o por la tarde, ya que las capsulas ofrecen mayor protección a los conidios ante factores abióticos como la radiación solar y la temperatura.

Cabe mencionar que este método de aplicación utilizando capsulas de alginato de sodio, es recomendable por la facilidad y eficiencia controlando plagas del suelo. Existe una forma de aplicación con pulverizadores, el cual consiste en la ruptura de las capsulas de alginato, posteriormente estas son pasadas por filtros para obtener los conidios de *Metarhizium anisopliae*. Estos conidios son mezclados con agua y preparados en bombas pulverizadoras de alta presión o bombas de mochila de baja presión. Sin embargo, esta técnica es menos recomendable ya que incluye un costo adicional para realizar la preparación de la mezcla. Es por eso que, para realizar aplicaciones con pulverizadores se recomienda utilizar otro método de encapsulación.

Cuadro 5

Principales plagas controladas por Metarhizium anisopliae.

| Hongo | Plaga | Cultivo | Referencia |
|---|--|---|-----------------------------------|
| | Gusano barrenador: <i>D. magnifactella</i> Dyar, 1911 | Caña de azúcar y maíz | (Álvares Buenosaires et al. 2013) |
| | Chapulines: <i>Sphenarium purpurascens</i> (Charpentier) y <i>Melanoplus differentialis</i> (Thomas) (Orthoptera: Acrididae) | Maíz y Frijol | (Tamayo Mejía 2009) |
| <i>M. anisopliae</i> (Metschnikoff) Sorokin | Langosta Centroamericana: <i>Schistocerca piceifrons</i> Walker | Maíz, sorgo, frijol, caña de azúcar, soya, algodón, ajonjolí, plátano y cacahuete | (Barrientos-Lozano et al. 2005) |
| | Mosca blanca: <i>B. tabaco Gennadius</i> | Más de 500 ornamentales | (García Ramírez et al. 2013) |
| | Larvas de gallina ciega: <i>Phyllophaga vetula</i> Horn | Maíz | (Ruiz Vega et al. 2012) |

Nota. Tomado de Pacheco Hernández et al. (2019)

Conclusiones

La microencapsulación es una técnica útil en la formulación de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*, ya que provee al organismo biológico una capsula protectora que le permitirá mantener o aumentar las características como agente controlador de insectos.

Las técnicas de secado por aspersión y gelificación iónica son utilizadas para la formulación de *Metarhizium anisopliae*, ya que esta primera resulta de un proceso corto y la segunda no requiere del uso de equipo de alta tecnología, sino que integra polímeros no tóxicos y biodegradable.

La aplicación en campo de conidios de *Metarhizium anisopliae* mediante la microencapsulación por gelificación iónica y secado por aspersión, representa una alternativa viable para reducir el uso de plaguicidas en la agricultura.

Las dos técnicas de microencapsulación, presentan ventajas durante la aplicación en campo. El producto en forma de polvo mojable resultante del secado por aspersión ofrece un fácil manejo y aplicación tanto a nivel foliar como al suelo. Por otro lado, los gránulos encapsulados resultantes de la gelificación iónica ofrecen una aplicación eficiente de liberación lenta cuando son aplicadas directamente sobre el suelo.

Recomendaciones

Se recomienda evaluar la eficiencia de las diferentes formulaciones descritas en el presente documento a nivel de campo. También se recomienda determinar los parámetros del proceso de secado por aspersión para diferentes hongos entomopatógenos y adicionalmente comparar los costos de ambos formulados descritos en este documento.

Referencias

- Acuña Jiménez M, García Gutiérrez C, Rosas García NM, López Meyer M, Saíñz Hernández JC. 2015. Formulación de *metarhizium anisopliae* (metschnikoff) sorokin con polímeros biodegradables y su virulencia contra *heliiothis virescens* (fabricius). Revista internacional de contaminación ambiental; [consultado el 3 de nov. de 2021]. 31(3):219–226. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v31n3/v31n3a1.pdf>.
- Alamilla-Beltrán L, Chanona-Pérez JJ, Jiménez-Aparicio AR, Gutiérrez-López GF. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. Journal of Food Engineering. 67(1-2):179–184. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404003413>. doi:10.1016/j.jfoodeng.2004.05.063.
- Albuquerque Maranhão AE, Albuquerque Maranhão HE. 2008. Hongos entomopatógenos: herramienta importante para el control de "moscas negras" (homoptera: aleyrodidae). Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 5:209–242. <http://journals.ufrpe.br/index.php/apca/article/view/180/163>.
- Álvarez Buenosaires AI, Peña Chora G, Rodríguez Del Bosque, Luis Ángel. 2013. Determinación de la virulencia de la cepa 148 de *Bacillus thuringiensis* y ma-156 de *Metarhizium anisopliae* sobre *Diatraea magnifactella* dyar; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 298–300. <http://www.socmexent.org/entomologia/revista/2013/CB/298-300.pdf>.
- Alves R, Batman R, GUNN J, PRIOR C, Leather S. 2002. Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. Neotrop. Entomol. 31(1):91–99. en. doi:10.1590/s1519-566x2002000100013.
- Avila de Moreno C, Umaña MI. 1988. Aspectos de la biología y patogenicidad del hongo *Metarhizium anisopliae* (Metchnikoff) Sorokin, sobre *Aeneolamia varia* (F). Revista ICA; [consultado el 5 de ago. de 2021]. 23:155–161. <https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/35483/17549.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Barrientos-Lozano et al. 2005. Control biológico de la langosta centroamericana *schistocerca piceifrons piceifrons* walker (orthoptera: acrididae) en el noreste de México. VEDALIA; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 12:119–128. <https://cutt.ly/iTVw16M>.
- Brazel C.S. 1999. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. San Antonio, TX, Estados Unidos: American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN. <https://pascal-francis.inist.fr/vibad/index.php?action=getrecoDetail&idt=1873259>.
- Cañedo V, Ames T. 2004. Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú: International Potato Center. ISBN: 9290602384. es.
- Días Pucheta M, Macías Flores A, Navarro Rodríguez S, La Torre M de. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 31(12). https://www.researchgate.net/profile/Antonio-Flores-Macias/publication/285522262_Mechanism_of_action_of_entomopathogenic_fungi/links/604994e1a6fdcc4d3e55ff49/Mechanism-of-action-of-entomopathogenic-fungi.pdf.
- Díaz Sandoval B. nov. 2019. Análisis termodinámico para establecer condiciones de almacenamiento de geles de mucilago de nopal – alginato de sodio que contienen aceite de ajonjolí [Tesis]. Toluca, México: Universidad Autónoma del Estado de México. 95 p; [consultado el 8 de nov. de 2021].

http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/109013/Tesis_Byron%20D%C3%ADaz_IQ.pdf?sequence=3&isAllowed=y.

- FAO. 2006. Lucha biológica contra las langostas. [sin lugar]: [sin editorial]; [actualizado el 29 de ene. de 2008; consultado el 5 de nov. de 2021]. <https://www.fao.org/Newsroom/es/focus/2006/1000345/index.html>.
- Fargues J, Smits N, Vidal C, Vey A, Vega F, Mercadier G, Quimby P. 2002. Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*. 154(3):127–138. eng. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1016068102003>. doi:10.1023/A:1016068102003.
- Faria MR de, Wraight SP. 2007. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*. 43(3):237–256. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964407001843>. doi:10.1016/j.biocontrol.2007.08.001.
- Fuentes J, López de Ramos A. 2001. Nuevo metodo para medir la tension superficial mediante la tecnica de la gota colgante. *Informacion Tecnologica*; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 12(2):181–188. <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=xLpyZHgw-IAC&oi=fnd&pg=PA181&dq=Nuevo+m%C3%A9todo+para+medir+la+tensi%C3%B3n+superficial+mediante+la+t%C3%A9cnica+de+la+gota+colgante.&ots=24xo9oRuS5&sig=5IVcYMOzl4Q00AQ3i uya8zIMa00>.
- García Ramírez E, Pérez Pacehco R, León Enríquez BL, Pliego Marín L. 2013. Patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* sobre mosca blanca (*Bemisia tabaci*). *Revista mexicana de ciencias agrícolas*; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 6:1129–1139. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v4nspe6/v4spe6a5.pdf>.
- Gómes Aguilera M. Secado por asperión de jugo de arándano (*Vaccinium spp*), con maltodextrina como agente acarreador. [sin lugar]: Universidad Autónoma de San Luis de Potosí. 32 p; [consultado el 24 de nov. de 2021]. <http://www.ingenieria.uaslp.mx/agroindustrial/Documents/Proyectos/Presentaciones%20sem%202016-2017%20I/Gomez%20Aguilera%20Mariana.pdf>.
- Góngora Botero CE. 2008. Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana: Capitulo 9 - Los hongos entomopatógenos en el control de insectos. *Cenicafé*; [consultado el 8 de nov. de 2021]. <https://cutt.ly/jTVw3Xt>.
- Gonzales Cadena TE. nov. 2019. Identificación molecular, encapsulación y patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* sobre *Scyphophorus acupunctatus*. Yautepec, Morelos: Instituto Politécnico Nacional. 86 p; [consultado el 5 de nov. de 2021]. <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/27899/P%20Tesis%20Tania%20E.%20Gonzalez%20Cadena.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- González RE, Tarón A, Morón LB. 2015. Formación de microcápsulas de tamaño controlado por gelación iónica Utilizando Mezclas Biopoliméricas Binarias. *Inf. tecnol*; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 26(6):31–38. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v26n6/art05.pdf>. doi:10.4067/S0718-07642015000600005.
- González Cuello RE, Pérez Mendoza J, Urbina Suarez NA. 2014. Efecto de la microencapsulación sobre las propiedades reológicas y fisicoquímicas del yogurt blando. *Inf. tecnol*; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 25(6):45–56. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v25n6/art07.pdf>. doi:10.4067/S0718-07642014000600007.

- Jaronski ST, Mascarín GM. 2014. Mass Production of Entomopathogenic Fungi: State of the Art. En: Mass Production of Beneficial Organisms. [sin lugar]: Elsevier. p. 357–413 ; [consultado el 5 de nov. de 2021]. https://www.researchgate.net/profile/Stefan-Jaronski/publication/281766568_Mass_Production_of_Entomopathogenic_Fungi_State_of_the_Art/links/5aaa9e9a0f7e9b8826711de2/Mass-Production-of-Entomopathogenic-Fungi-State-of-the-Art.pdf.
- Jones KA, Burges HD. 1998. Technology of Formulation and Application. En: Burges HD, editor. Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 7–30.
- Khachatourians GG, Qazi SS. 2008. Entomopathogenic Fungi: Biochemistry and Molecular Biology. En: Brakhage AA, Zipfel PF, editores. Human and Animal Relationships. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. p. 33–61.
- Leger R, Durrands PK, Charnley AK, Cooper RM. 1988. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 52(2):285–293. doi:10.1016/0022-2011(88)90137-1.
- Liu CP, Da Liu S. 2009. Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. *Journal of Microencapsulation*. 26(5):377–384. eng. doi:10.1080/02652040802365455.
- Lomer CJ, Bateman RP, Johnson DL, Langewald J, Thomas M. 2001. Biological control of locusts and grasshoppers. *Annu Rev Entomol*; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 46:667–702. eng. https://www.researchgate.net/profile/Daniel-Johnson-75/publication/12216333_Biological_Control_of_Locusts_and_Grasshoppers/links/00b7d51ae7f840b1a8000000/Biological-Control-of-Locusts-and-Grasshoppers.pdf. doi:10.1146/annurev.ento.46.1.667.
- López Hernández OD, Gómez Carril M. 2008. Preparación de microesferas mediante secado por aspersión. *Revista Cubana de Farmacia*; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 42(3). https://www.researchgate.net/profile/Orestes-Lopez-Hernandez/publication/237365246_Preparacion_de_microesferas_mediante_secado_por_aspersion/links/605d381ca6fdccbfea084f55/Preparacion-de-microesferas-mediante-secado-por-aspersion.pdf.
- Medina-Torres L, García-Cruz EE, Calderas F, González Laredo RF, Sánchez-Olivares G, Gallegos-Infante JA, Rocha-Guzmán NE, Rodríguez-Ramírez J. 2013. Microencapsulation by spray drying of gallic acid with nopal mucilage (*Opuntia ficus indica*). *LWT - Food Science and Technology*; [consultado el 8 de nov. de 2021]. 50(2):642–650. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0023643812003222>
- Mejía LC. 2015. Manejo agroecológico de la roya del café; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 1–96. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2015/09/manejo-agroecologico-de-la-roya-del-cafe.pdf>.
- Mendoza Mora J, Mejía Moreira K, Gualle Alvarado D. 2004. El salivazo de la caña de azúcar, *Mahanarva andigena*. publicación técnica; [consultado el 5 de nov. de 2021]. (4). <https://cincae.org/wp-content/uploads/2013/05/Publicaci%C3%B3n-T%C3%A9cnica-N%C2%B0-4-Salivazo.pdf>.
- MJ Martín Villena, ME Morales Hernández, V Gallardo Lara, MA Ruiz Martínez. 2009. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. 1. 50(1):43–50. es. <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/4884>.

- Monzón C. 2000. Producción y uso de hongos entomopatogenos; [consultado el 5 de nov. de 2021]. <http://www.sidalc.net/repdoc/A0949E/A0949E.PDF>.
- Pacheco Hernández MdL, Reséndiz Martínez JF, Arriola Padilla VJ. 2019. Organismos entomopatógenos como control biológico en los sectores agropecuario y forestal de México: una revisión. RMCF; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 10(56). <http://www.scielo.org.mx/pdf/remcf/v10n56/2007-1132-remcf-10-56-4.pdf>. doi:10.29298/rmcf.v10i56.496.
- Padilla Melo GN, Bernal Uribe MG, Vélez Arango PE, Restrepo Montoya EC. 2000. Caracterización patogénica y morfológica de asilamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes ordenes insectiles. Cenicafe; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 51(1):28–40. <https://www.cenicafe.org/es/publications/arc051%2801%29028-040.pdf>.
- Parra Huertas RA. 2010. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 63(2):5669–5684. <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a20v63n01.pdf>.
- Patel R, Patel M, Suthar A. 2009. Spray drying technology: an overview. Indian Journal of Science and Technology; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 2(10):44–47. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.972.1186&rep=rep1&type=pdf>.
- Rath AC, Carr CJ, Graham BR. 1995. Characterization of *Metarhizium anisopliae* Strains by Carbohydrate Utilization (API50CH). Journal of Invertebrate Pathology. 65(2):152–161. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201185710233>. doi:10.1006/jipa.1995.1023.
- Rodríguez Colorado SR, Rodríguez Maciel JC, Riestra Díaz D, Villanueva Jiménez JA, Rodríguez Lagunes DA. 2002. Influencia de la luz y de aditivos naturales sobre la germinación de conidias de *Metarhizium anisopliae*. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica); [consultado el 5 de nov. de 2021]. 64:34–40. <https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/6397/A2041e.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Ruiz Vega J, Aquino Bolaños T, Silvia Rivera ME, Girón S. 2012. Control integrado de la gallina ciega *Phyllophaga vetula* Horn (Coleoptera: Melolonthidae) con agentes entomopatógenos en Oaxaca, México. Revista Científica UDO Agrícola; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 12(3):609–616. <http://www.bioline.org.br/pdf?cg12069>.
- Shoji AS, Oliveira AC, Balieiro J, Freitas O, Thomazini M, Heinemann R, Okuro PK, Favaro-Trindade CS. 2013. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. Food and Bioproducts Processing. 91(2):83–88. doi:10.1016/j.fbp.2012.08.009.
- Siccha M A, Lock de Ugaz O. 1995. Secado por atomización (spray dryer). Revista de Química; [consultado el 5 de nov. de 2021]. 9(1):39–48. <http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/download/8354/8661>.
- Tamayo Mejía F. 2009. Control biológico de *Sphenarium purpurascens* (Charpentier) y *Melanoplus differentialis* (Thomas)(Orthoptera: Acrididae) con *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin. Vedia (México). 13(2):85–90.
- Urtania H I, France A. 2007. Formulaciones de hongos entomopatogenos para control de plagas en agricultura. Tierra Adentro. Tierra adentro; [consultado el 5 de nov. de 2021]. (77):46–49. <https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/123456789/6379/NR34779.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Vázquez Chacón JY. 19 de nov. de 2018. *Metarhizium anisopliae*: características, taxonomía, morfología. lifeder; [consultado el 5 de nov. de 2021]. <https://www.lifeder.com/metarhizium-anisopliae/>.

- Vélez P, Posada F, Marín P, González MT, Osorio E, Bustillo Á. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos; [consultado el 5 de nov. de 2021]. https://www.researchgate.net/profile/Alex-Bustillo/publication/275153888_Tecnicas_para_el_control_de_calidad_de_formulaciones_de_hongos_entomopatogenos_1997/links/5533d3db0cf20ea0a0767f70/Tecnicas-para-el-control-de-calidad-de-formulaciones-de-hongos-entomopatogenos-1997.pdf.
- Yip HY, Rath AC, Koen TB. 1992. Characterization of *Metarhizium anisopliae* isolates from Tasmanian pasture soils and their pathogenicity to redheaded cockchafer (Coleoptera: Scarabaeidae: *Adoryphorus couloni*). *Mycological Research*. 96(2):92–96. doi:10.1016/S0953-7562(09)80921-0.