

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE UN POLÍMERO OBTENIDO A PARTIR
DE TIBICOS (KÉFIR DE AGUA) Y SU EVALUACIÓN COMO AGENTE
ENCAPSULANTE DE *BACILLUS THURINGIENSIS***

POR

MARIO ALBERTO HERNÁNDEZ TORRES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

AGOSTO, 2018

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE UN POLÍMERO OBTENIDO A
PARTIR DE TIBICOS (KÉFIR DE AGUA) Y SU EVALUACIÓN COMO
AGENTE ENCAPSULANTE DE *Bacillus thuringiensis***

Comité de Tesis



Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Presidente



Dra. Myriam Elias Santos
Secretario



Dra. Katiushka Arevalo Niño
Vocal



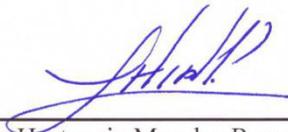
Dr. Hugo Alberto Luna Olvera
Vocal



Dr. Isela Quintero Zapata
Vocal

**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE UN POLÍMERO OBTENIDO A
PARTIR DE TIBICOS (KÉFIR DE AGUA) Y SU EVALUACIÓN COMO
AGENTE ENCAPSULANTE DE *Bacillus thuringiensis***

Dirección de Tesis



Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos
Director de tesis

“Y aunque con mucha dificultad he llegado hasta aquí no me arrepiento de todo el trabajo que me ha costado. Dejo mi espada a quien me sucede en la peregrinación; mi coraje y pericia al que los pueda conseguir. Mis marcas y cicatrices llevo conmigo, para dar testimonio de que he peleado la batalla de Aquél que será ahora mi galardón”.

El progreso del peregrino por Jhon Bunyan

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Universidad Autónoma de Nuevo León, por la beca otorgada al Mérito Académico para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias. A la Facultad de Ciencias Biológicas, institución en la cual trabajo y de la cual siempre he recibido apoyo.

A la Doctora Lilia Hortencia Morales Ramos por su dirección, recursos, tiempo, paciencia y consejo. Valores que me permitieron alcanzar los objetivos del presente trabajo.

Al Maestro Arzave, ejemplo de vocación, por su apoyo incondicional en todo momento.

A la Doctora Lucia Leticia Palacios Cortez por su codirección y valiosa asesoría en la ejecución de este trabajo.

A los Doctores Myriam Elías Santos, Katiushka Arévalo Niño, Hugo Alberto Luna Olvera e Isela Quintero Zapata por su tiempo, asesoría y valiosos comentarios en la redacción y desarrollo estructural de esta tesis.

Al Instituto de Biotecnología de la FCB, sus diferentes laboratorios y personal que de alguna manera facilitaron el acceso a equipo y material para concluir los objetivos trazados en esta investigación.

Al Departamento de Química de la FCB y su laboratorio de Bioquímica por la atención, espacio y recursos brindados en el desarrollo metodológico de algunos objetivos del presente trabajo.

Al programa **PAICYT**, por el apoyo aportado al proyecto de investigación clave CT271-15. Y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca otorgada para la realización de este trabajo con No. de Registro 706423.

Mi entera gratitud a Dios por haberme acompañado en esta etapa de mi carrera profesional, por su fortaleza en momentos de debilidad y por brindarme aprendizaje, experiencia y sobre todo felicidad a lo largo de mi vida.

Estoy profundamente agradecido con mis padres Roberto y María Elena por haberme dado una excelente educación y la oportunidad de una formación académicamente profesional. Sus valores, constancia y amor, los convierten en un verdadero ejemplo de vida a seguir.

A mis Hermanos: Juan, Julio y Mayra por su amor y comprensión a mi trabajo y vocación.

En especial, para aquellos mis alumnos y amigos que estuvieron conmigo en cuerpo y alma en las diferentes etapas de esta investigación: Manuel Ceniceros Castañón, meme tu determinación, ahínco y complicidad, forjaron la base de este trabajo; Edgar Allan Estrada Garza, mi flaco más allá de tu disposición laboral agradezco el que estuvieras ahí en los momentos de desaliento; José Antonio Solís González[†], mi Toño sin conocer a fondo este trabajo y simplemente por amistad me acompañaste a divulgarlo. Espero algún día volver a abrazarte; Jesús Abelardo Salazar Alanis, ¡Chucho! tu curiosidad y empeño en este proyecto avivaron las ganas de seguir haciendo ciencia; Emilio Machorro Salinas, mi perrillo tu apoyo incondicional y alegría en cada momento me motivaron a culminar esta tesis. A ustedes, ¡un mol de Gracias!

A mí carnalito Fharid Villegas y su entrañable familia por sus buenos deseos siempre.

A quienes solo quisieron y desearon lo mejor para mí sin conocimiento de la enorme presión que ejercían cada uno de sus halagos. Nora Estrella y Martha López, por su fe y cariño siempre seré su M.A.

A mis amigos colegas: Tania Villarreal, Rubén Fragoso, Ricardo Luevano, Martín Maldonado y Wendy Zenteno, por alentarme a seguir caminando la senda de mi vocación.

Y a todos aquellos amigos y alumnos que no dudaron en extenderme una mano, una palabra de ánimo, o su sola presencia en algún momento de esta etapa: Rito Carranza, Félix Molina, Josafath Gutiérrez, Max Jurado, y en especial a las boricuas Shalimar Miranda y Keishla Rodríguez por su colaboración al final de este proyecto.

Y para los que se suman a la familia Bioquímica, mi constante motivación, Luis Quique, Pepe Beto, Javi, Mar, Lalo, Alan y Alonso, gracias por enseñarme más de lo que ustedes aprenden de mí.

“Ser mal agradecido es uno de los peores pecados del mundo del que jamás se tenga memoria. Yo, pues, agradecido a la merced que aquí se me ha hecho, no pudiendo corresponder a la misma medida y conteniéndome en los estrechos límites de mi poderío, ofrezco lo que puedo y lo que tengo de mi cosecha”.

Don Quijote, Segunda Parte: Capítulo LVIII.

DEDICATORIA

A Dios y a la Vida

A mis Padres y Hermanos

A mis Maestros

A mi Familia laboral

A mis Amigos y Detractores

A mis Alumnos

Y a ti lector,

esperando encuentres

respuesta a lo que te trajo

aquí.

*"Porque tenía hambre, y me disteis de comer; tenía sed, y me disteis de beber;
era un extraño, y me recibisteis bien; estaba desnudo, y me disteis ropa;
era prisionero, y vosotros me visitasteis; estaba enfermo y viniste a mí".*

Mateo 25:35-35.

ÍNDICE

	Pág.
Agradecimientos	v
Dedicatoria	vii
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xii
Abreviaturas y símbolos	xiv
1. Resumen	1
Abstract	2
2. Introducción	3
3. Antecedentes	5
3.1. Plaguicidas y Control biológico	5
3.2. Formulación: aspectos generales y composición	7
3.3. Avances en el desarrollo de formulaciones a base de <i>B. thuringiensis</i> y soportes poliméricos.	12
3.4. La encapsulación como método para el desarrollo de formulaciones.	15
3.5. La encapsulación mediante secado por aspersión en el desarrollo de formulaciones a base de <i>B. thuringiensis</i> .	16
3.6. Kéfir de agua: origen, composición y alcances.	17
4. Justificación	20
5. Hipótesis	21
6. Objetivos	22
6.1. Objetivo general	22
6.2. Objetivos específicos	22
7. Metodología	23
7.1. Producción de kéfir de agua	23
7.2. Obtención del extracto polimérico extracelular del grano de kéfir de agua.	23
7.3. Caracterización fisicoquímica del extracto polimérico extracelular obtenido.	26
7.4. Producción de microcápsulas mediante secado por aspersión.	32

7.5. Evaluación de las microcápsulas asperjables a base de extracto de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros como posibles agentes encapsulantes.	34
7.6. Elaboración de formulados asperjables a base de extracto de kéfir de agua solo o combinado con otros biopolímeros y complejo espora-cristal de <i>B. thuringiensis</i> .	38
7.7. Bioensayo de retención de la actividad tóxica de los formulados asperjables de <i>B. thuringiensis</i> GM-10 al 10% elaborados.	40
8. Resultados.	41
8.1. Producción de kéfir de agua	41
8.2. Obtención del extracto polimérico extracelular del grano de kéfir de agua.	41
8.3. Caracterización fisicoquímica del extracto polimérico extracelular obtenido.	42
8.4. Producción de microcápsulas mediante secado por aspersión.	45
8.5. Evaluación de las microcápsulas asperjables a base de extracto de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros como posibles agentes encapsulantes.	46
8.6. Formulados asperjables a base de extracto de kéfir de agua solo o combinado con otros biopolímeros y complejo espora-cristal de <i>B. thuringiensis</i> .	52
8.7. Retención de la actividad tóxica de los formulados asperjables de <i>B. thuringiensis</i> GM-10 al 10% elaborados.	56
9. Discusión	60
10. Conclusiones	68
11. Perspectivas	70
12. Bibliografía	71
13. Resumen Biográfico	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla No.		Página
1.	Agentes patógenos empleados en el desarrollo de formulaciones.	8
2.	Diluyentes empleados en el desarrollo de formulaciones.	9
3.	Aditivos empleados en el desarrollo de formulaciones.	11
4.	Formulaciones comerciales a base de <i>B. thuringiensis</i> .	14
5.	Combinaciones de microcápsulas a evaluar preferencia alimentaria.	36
6.	Producción de kéfir de agua (peso húmedo).	41
7.	Batería bioquímica de pruebas coloridas aplicadas al extracto derivado del kéfir de agua.	42
8.	Obtención y Caracterización fisicoquímica del extracto polimérico del grano de kéfir de agua.	45
9.	Factibilidad de aspersión de las microcápsulas a base de extracto polimérico de kéfir de agua, solo y en combinación con otros biopolímeros.	50
10.	Preferencia alimentaria de <i>T. ni</i> sobre las microcápsulas a base de kéfir de agua solo o en combinación con otros biopolímeros.	51
11.	Preferencia alimentaria de <i>S. exigua</i> sobre las microcápsulas a base de Kéfir de agua solo o en combinación con otros biopolímeros.	52
12.	Prueba preliminar de actividad tóxica del complejo espora cristal de <i>B. thuringiensis</i> contra dos lepidópteros.	53
13.	Determinación de la viabilidad de la cepa BtGM10 en los formulados, después del proceso de secado por aspersión.	56
14.	Porcentaje de mortalidad en <i>S. exigua</i> y <i>T. ni</i> tratadas con formulado asperjable a base de extracto de Kéfir y BtGM10 al 10%.	57

- 15.** Porcentaje de mortalidad en *S. exigua* y *T. ni* tratadas con formulado asperjable a base de extracto de Kéfir/Almidón y BtGM10 al 10%.

57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura No.		Página
1.	Granos de kéfir de agua.	18
2.	Composición química del exopolímero del grano de kéfir de agua.	18
3.	a) Producción kéfir de agua b) pesaje de biomasa de kéfir c) disolución del grano de kéfir mediante hidrólisis ácida d) Precipitación alcohólica del extracto polimérico e) molienda del extracto obtenido f) Extracto polimérico obtenido del grano de kéfir de agua.	25
4.	a) Extracto derivado del kéfir de agua b) Pruebas cualitativas para naturaleza química: Molisch, Fheling y Biuret c) Bateria bioquímica para carbohidratos: Molisch, Selliwanoff, Benedict, Barfoed, Bial y Lugol d) Ensayo para cuantificación de azúcares reductores: método DNS e) Cuantificación de azúcares totales: método de Antrona f) Método de Bradford para cuantificación de proteínas totales.	28
5.	a) Equipo de secado por aspersión b) Ciclón y vaso de colecta c) Recuperación de microcápsulas d) Microcapsulas a base del extracto polimérico del kéfir de agua e) Microcapsulas a base de kéfir, Kéfir-copolímero y de otros biopolímeros al 10 % p/v	33
6.	Evaluación de las microcápsulas a base de extracto de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros como posible agente encapsulante para el desarrollo de formulados: a) Prueba de suspensibilidad b) Prueba de adherencia en portaobjetos c) Factibilidad de aspersión d) preferencia alimentaria.	37
7.	Obtención de microcapsulas a partir del extracto polimérico del kéfir de agua y otros biopolímeros mediante secado por aspersión: T.E 160°C, T.S 100°C, aire igual a 0.64 m ³ /min, presión de aspersión de 0.10 MPa, velocidad de alimentación de 2.1 mL/min.	46
8.	Suspensibilidad de las microcápsulas en porcentaje de masa suspendida con respecto al tiempo.	47
9.	Suspensibilidad de las microcápsulas en porcentaje de masa suspendida tras ocho horas de reposo. (F=3.866, p<0.05).	48

10.	Evaluación de la propiedad adherente de las microcapsulas (% de masa perdida o lavada). (F=20.828, p<0.05).	49
11.	Bioensayo para determinar la CL50 de la cepa BtGM10 frente a T. ni. (F=44.146, p< 0.01), n= 24 larvas, N= 216 larvas.	54
12.	Bioensayo para determinar la CL50 de la cepa BtGM10 frente a S. exigua (F=34.557, p< 0.01). n= 24 larvas, N= 216 larvas.	55
13.	Tiempo letal medio para las CL50 del complejo espora cristal de la cepa BtGM10.	55
14.	Tiempo letal medio para las CL50 del formulado K-BtGM10.	58
15.	Tiempo letal medio para las CL50 del formulado KA-BtGM10.	59

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

α	alfa	L	Litro
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	±	Más/menos
ANOVA	Análisis normal de varianza	≥	Mayor o igual a
AOAC	Association of Analytical Communities	≤	Menor o igual a
B.	<i>Bacillus</i>	μg	Microgramo
BAL	Bacteria ácido láctico	mg	Miligramo
cm	Centímetro	mL	Mililitro
CL₅₀	Concentración letal media	mm	Milímetro
Cry	Toxina proteica	min	Minuto
δ	delta	m³	Metro cúbico
eq	Equivalente	MPa	Megaapascal
et al	Colaboradores	N	Normalidad
DS	Desviación estándar	NaOH	Hidróxido de sodio
DNS	Ácido dinitrosalicílico	nm	Nanómetro
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations	p	Probabilidad
g	Gramo	pH	Potencial de Hidrógeno
g/L	Gramo por litro		Libra-fuerza por pulgada
G (+)	Gram positivo	psi	cuadrada
h	Hora	p/v	Masa sobre volumen
IAA	Índice de absorción de agua	®	Marca registrada
ISA	Índice de solubilidad en agua	rpm	Revoluciones por minuto
Kg	Kilogramo	s	Segundo
kDa	Kilodalton	sp	Especie
		SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
		TL₅₀	Tiempo Letal medio
		UV	ultravioleta

1. RESUMEN

El sector agrícola y salud pública, preocupados por solucionar la contaminación generada debido al uso irracional de sustancias químicas para el control de plagas, ha implementado estrategias para el manejo integral de insectos polífagos, dentro del cual se incluye el control biológico, definido como el manejo de “enemigos naturales selectos, (depredadores, parásitos y entomopatógenos) así como sus derivados capaces de reducir la población de plagas y con ello evitar severos daños a la economía. Las perspectivas de éxito del control biológico son alentadoras, de manera que una gran cantidad de investigaciones se han enfocado en el desarrollo de procesos sustentables que generen bioplaguicidas más efectivos, y amigables con el medio ambiente. Desde los años cincuenta, la tecnología de encapsulación se ha aplicado exitosamente a una amplia gama de principios activos en la industria farmacéutica y alimenticia. Esta herramienta tecnológica también ha sido aplicada para la formulación de agentes de control biológico, especialmente agentes microbianos ya que provee las condiciones adecuadas para obtener una mayor persistencia y eficacia en el medio ambiente, así como también disponer de productos con una vida de anaquel más larga. Buscando obtener nuevas formulaciones a un bajo costo y mediante secado por aspersión, este trabajo se centró en la obtención y caracterización físicoquímica de la matriz polimérica producida por el kéfir de agua, así como su evaluación como agente encapsulante del complejo espora cristal de *B. thuringiensis*. Se encontró que, el extracto extracelular del kéfir de agua consiste principalmente de un polímero de naturaleza carbohidrato, no asociado a proteínas ni lípidos. Además, presentó propiedades de adherencia a superficie, suspensibilidad en agua hasta por ocho horas, factibilidad de aspersión y preferencia alimentaria, características que permitieron su empleo en el desarrollo de formulados a base de *B. thuringiensis* mediante secado por aspersión. Se desarrollaron dos formulados al 10 % de Bt-GM10 empleando el exopolisacárido kéfir de agua solo y en combinación con almidón modificado en proporción 1:1 sin aditivos. Los formulados fueron aplicados a la dieta artificial Shorey de larvas neonatas de *S. exigua* y *T. ni*. Ambos formulados fueron del agrado alimenticio de las larvas lepidópteras y mostraron toxicidad a concentraciones superiores a 1.0 ng/cm² de proteína BtGM10.

ABSTRACT

The agricultural sector and public health, concerned to resolve the pollution generated due to the irrational use of chemicals for pest control, has implemented strategies for the integrated management of polyphagous insects, within which includes the biological control, defined as the management of selected "natural enemies (predators, parasites, and entomopathogenic) as well as their derivatives capable of reducing the pest population and thus avoid severe damage to the economy. The prospects of success of biological control are encouraging, so that a large amount of research has focused on the development of sustainable processes that generate biopesticides more effective, and friendly with the environment. Since the 1950, the encapsulation technology has been successfully applied to a wide range of active ingredients in the food and pharmaceutical industry. This technological tool has also been applied to the formulation of biological control agents, especially microbial agents because it provides the right conditions for greater persistence and effectiveness in the environment, as well as also have products with a longer shelf life. Looking for new formulations at a low cost and using spray-drying, this work focused on obtaining and physicochemical characterization of the polymer matrix produced by water kefir, as well as its evaluation as an agent of the complex spore glass encapsulant of *B. thuringiensis*. It was found that the extract extracellular water kefir consists mainly of a carbohydrate polymer, not associated with proteins and lipids. In addition, presented adhesion properties, suspensibility in water, feasibility of spraying and food preference, characteristics that allowed its use in the development of *B. thuringiensis* formulated using spray drying. Two formulated of Bt-GM10 in 10 % using the kefir water polymer alone and in combination with modified starch (1:1) without additives. The formulated were applied to the artificial Shorey diet of *S. exigua* and *T. ni* larvae. Both formulated were to the liking food of the lepidopteran larvae and showed toxicity at concentrations above 1.0 ng/cm² of protein BtGM10.

2. INTRODUCCIÓN

En el sector agrícola, las plagas por artrópodos constituyen una de las principales causas de pérdidas de cosecha y por ende, la generación de mermas económicas de miles de millones de dólares al año a nivel mundial. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que, las pérdidas económicas globales oscilan entre 20 y 40 % directamente en los campos de cultivo y hasta un 10 % en los almacenes. La magnitud del daño varía en función del cultivo, temporada, región y agente causal. (Gutiérrez et al. 2013).

Recientemente, el cambio climático ha traído consigo condiciones agroclimáticas diferentes en todas las regiones agrícolas del planeta, generando ambientes que favorecen la rápida reproducción de insectos y con ello, diseminación de fitopatógenos de amplio espectro geográfico que se transmiten por insectos vectores (Ruiz et al. 2013).

El problema se agrava en países en vías de desarrollo, como lo son la mayor parte de los países latinoamericanos. A nivel Internacional, México figura entre los principales países que más productos agroalimentarios exporta. Durante el año 2014 se estimó que un 39.9 % equivalente a 10,217 millones de dólares de la producción total agroalimentaria exportada, provino del sector agrícola. La Nación Mexicana cuenta con poco más de 22,000,000 millones de hectáreas de superficie agrícola sembrada con más de 200 especies de vegetales entre los que destacan los cultivos de tomate, aguacate, chiles y pimientos como los principales productos agrícolas exportados (SAGARPA 2015).

Por ello, en la actualidad el sector agrícola y en particular la sanidad vegetal se enfocan cada vez más en desarrollar programas gubernamentales para el control de plagas y enfermedades agrícolas; para lo cual se requiere cubrir dos aspectos importantes: 1) modelar el efecto del cambio climático sobre las plagas agrícolas y 2) desarrollar sistemas de manejo integrado de plagas que incluyan la modelación bioclimática de plaga y cultivo, el desarrollo e implementación de alertas fitosanitarias con base agrometeorológicas, la obtención de plantas resistentes a plagas y enfermedades así como la utilización de agentes biológicos de control. Sin embargo, la necesidad de mantener un mercado globalmente

competitivo ha provocado el aumento en el uso de productos químicos para el control biológico de insectos. Los insecticidas empleados se caracterizan por ser de amplio espectro, ser tóxicos, contaminantes de mantos acuíferos subterráneos e incluso actuar de forma negativa sobre las diferentes especies de insectos benéficos, como los depredadores y polinizadores. El desconocimiento de los plaguicidas y las malas técnicas de su aplicación, provocan un desequilibrio en el ecosistema agrícola además de convertirse en un problema toxicológico para el sector salud (Gutiérrez et al. 2013).

Ante ello, la legislación y las demandas públicas en la actualidad están dirigidas a reducir el uso de compuestos químicos en áreas forestales y agrícolas. En respuesta a estas demandas, la industria de plaguicidas ha dirigido sus esfuerzos hacia el desarrollo de productos biorazonables tales como: plantas modificadas genéticamente, pesticidas botánicos y formulaciones a base de entomopatógenos (Hall y Barry 1995).

Una alternativa al uso de insecticidas químicos, es el empleo de entomopatógenos como un método de control biológico de plagas. Sin embargo, las principales limitantes que presentan estos “enemigos naturales” para ser empleados a gran escala en campo y que a su vez, los hacen poco competitivos frente plaguicidas químicos son: la corta viabilidad del patógeno después de su aplicación ya que estos agentes son inestables en condiciones ambientales degradándose rápidamente con la exposición a radiaciones electromagnéticas, temperatura y pH extremos, desecación, falta de nutrientes o por ataque de otros agentes microbianos; la ineficiencia de infectar a la especie blanco (baja probabilidad que el insecto encuentre o ingiera al patógeno) y no todas las etapas y estadios de desarrollo del insecto son igualmente susceptibles. (Caballero y Ferré 2001; Caballero e Iriarte 2001; Melnick 2011).

Estos hechos y la necesidad de contar con un sistema de control biológico específico nos han impulsado a desarrollar formulaciones estables y efectivas durante su almacenamiento y aplicación en campo, respectivamente. Para ello, es menester buscar y disponer de nuevos soportes inertes a partir de fuentes naturales y procesos de bajo costo que permitan encapsular y proteger a los entomopatógenos.

3. ANTECEDENTES

3.1 Plaguicidas y Control Biológico.

Los plaguicidas, pertenecen al grupo de sustancias químicas ampliamente empleados por el hombre, tanto para proteger de plagas la producción y calidad de las cosechas, como para el control de vectores y agentes patógenos importantes en salud pública. La FAO, establece como plaguicida a cualquier compuesto químico o mezcla de ellos, destinados a prevenir, destruir o controlar cualquier organismo (animal, planta o microorganismo) que, al aumentar su población de manera descontrolada provoque daño a los cultivos, alterando su desarrollo normal y trayendo consigo pérdidas económicas para los agricultores (Rivero 2012).

El control de plagas ha sido por décadas el mayor campo de investigación en el área agrícola. El uso de compuestos químicos para el control de plagas se inició en la década de los 40's, cuando se descubrieron compuestos orgánicos como el Dicloro difenil tricloroetano (DDT), hexacloruro de benceno (BHC) y Ac. 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D), lo que originó una revolución en el manejo de plagas. Los plaguicidas químicos hicieron posible el control de plagas y patógenos para los cuales no existía un control efectivo disponible, debido a esto, el empleo de estos agentes químicos especialmente los insecticidas se extendieron rápidamente. Como resultado del uso inadecuado y el abuso de insecticidas, se desarrollaron plagas resistentes a estos productos; algunos grupos de insectos benéficos presentaron efectos adversos y como consecuencia aparecieron plagas secundarias que con anterioridad no se presentaban y no eran de importancia económica. Muchos de los insecticidas originales organoclorados (Clordano, Clorobencilato, DDT, Dicofol, Endosulfan, Lindano, Mitoxicloro, Toxafeno) presentaron residualidad y contaminación ambiental, así como riesgos a la salud humana por lo que fueron removidos del uso agrícola y reemplazados con compuestos menos residuales como organofosfatos, carbamatos y piretroides (Hall y Barry 1995; Evans 2004).

Ante este panorama, en las últimas décadas el interés en el control biológico se ha incrementado, sobre todo en lo concerniente al uso de organismos usados como

bioplaguicidas (hongos, bacterias, virus y protozoarios). El costo relativamente bajo de desarrollo junto con la alta diversidad de agentes y toxinas microbianas, la tecnología de formulación y la aparición de técnicas de ADN recombinante, han incrementado el rango de condiciones bajo las cuales los bioplaguicidas son efectivos y han hecho posible el desarrollo de una nueva generación de productos microbianos más efectivos y aceptables ambientalmente (Frankenhuyzen 1993; Gan-Mor y Matthews 2003; Navon 2000).

Una alternativa al uso de insecticidas químicos es el uso de organismos benéficos, como son los depredadores, parasitoides y entomopatógenos que ofrecen la regulación de la plaga debido a la relación densodependiente que establecen con sus hospederos. Los entomopatógenos son causantes de enfermedades en los insectos, estos organismos pueden ser protozoarios, bacterias, hongos y nematodos los cuales específicamente infectan o producen compuestos tóxicos para los insectos, causando su muerte o disminución del ciclo de vida, por lo que son candidatos para ser utilizados como bioinsecticidas ya que son específicos para ciertos grupos de insectos o para ciertos estadios de desarrollo del insecto. Adicionalmente los entomopatógenos microbianos generalmente no afectan directamente a los insectos benéficos, no son tóxicos para la vida silvestre ni para el ser humano y no son contaminantes para el ambiente. Estos organismos generalmente infectan a su hospedero por ingestión o por contacto directo con el insecto blanco (Hall y Barry 1995).

El control biológico al igual que el químico, debe ser predecible y de efecto consistente y una formulación apropiada, es necesaria para explotar y optimizar las propiedades intrínsecas de los agentes de control biológico. Varios factores son responsables del uso limitado de los bioinsecticidas como son: rango específico de hospederos, falta de actividad residual y persistencia en el ambiente.

3.2 Formulación: aspectos generales y composición.

En el control biológico, la formulación tiene como objetivo disponer de una mezcla correcta de ingredientes, en la cual el principio activo junto con otros materiales forme un producto plaguicida que sea de fácil aplicación, efectivo, con larga viabilidad en el ambiente y durante su almacenamiento, así como bioseguro para quien lo aplica (Couch 1978). A fin de asegurar que el formulado cumpla con las especificaciones requeridas para su registro y venta autorizada, debe seguirse un estricto control de calidad, por lo que es menester evaluarlo fisicoquímica y biológicamente (Sawicka y Couch 1983).

Independientemente de su finalidad, toda formulación está constituida por tres ingredientes principales:

1. Principio activo responsable de la actividad plaguicida: en el caso de agentes de control biológico, el principio activo lo constituyen organismos vivos y/o sus derivados (células, esporas, partículas virales, etc.), (Tabla 1). Los agentes activos, deben ser capaces de replicarse en el medio ambiente, en algunos casos, su multiplicación es necesaria solo después de la aplicación del formulado. Por ello, la formulación debe ofrecer las condiciones adecuadas para retener la viabilidad durante la preparación, almacenamiento y aplicación. Además, de asegurar su sobrevivencia en el ambiente. Los principios activos pueden suspenderse en fluidos, sin embargo, no deben ser disueltos y perder su actividad. Muchos de los agentes de control biológico, ejercen su actividad mediante la producción de sustancias tóxicas, establecimiento de relaciones simbióticas negativas como son: parasitismo o competencia, por lo que cada modo de acción presenta diferentes requerimientos de formulación, Por ejemplo, para el control de plagas insecto mediante patógenos, el formulado debe ser apetecible para la especie blanco y estar depositado en la zona de alimentación del mismo a fin de asegurar su eficacia. Cuando el modo de acción es mediante el establecimiento de una relación simbiótica negativa, la formulación debe mantener viable y activo al agente plaguicida y en algunas ocasiones es menester que la formulación provea los nutrientes y condiciones ambientales necesarias para la reproducción del mismo.

Tabla 1. Agentes patógenos empleados en el desarrollo de formulaciones.

	Patógeno	Insecto susceptible	Nombre comercial
Virus	<i>Granulovirus</i>	<i>Adoxophyes honmai</i>	Hamaki-tenteki Carpovirusina 6,7%
	<i>Nucleopolyhedrovirus</i>	<i>Bombix mori</i> <i>Gusano bellotero</i> <i>Polilla Gitana asiática</i> <i>T. ni</i> <i>Palomilla de la papa</i>	Helicovex, Littovir, Spexit
		<i>B. thuringiensis</i>	Larvas de Lepidópteros
Bacteria	<i>B. popillae</i>	Coleópteros,	
	<i>B. sphaericus</i>	Dípteros	
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Escarabajo de la papa	
	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Coleópteros, Dípteros, Himenópteros Lepidópteros, Ortópteros Thysanópteros, y	Spinosa, Spintor 480 SC
		<i>Rickettsiella melolonthae</i>	Dípteros, Coleópteros, Ortópteros
<i>Beauveria bassiana</i>	Mosca blanca, polilla de los diamantes	BotaniGard	
Hongo	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Áfidos	Preferd
	<i>Lecanicillium longisporum</i>	Áfidos	Vertalec
	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Coleópteros, Dípteros, Homópteros Himenópteros Lepidópteros,	
Nematodo	<i>Steinernema carpocapsae</i>	Gorgojo, Polilla del melocotón	Bio Safe
	<i>Steinernema glaseri</i>	Gusano de césped, Gorgojos	Bio Topia
Protozoario	<i>Nosema locustae</i>	Ortópteros	

(Adaptado de Leng. et al. 2011; Nava et al. 2012).

2. Diluyente o disolvente: es el vehículo o soporte inerte que lleva embebido el principio activo, puede ser sólido o líquido y de naturaleza química diversa (Tabla 2). Su función es distribuir, proteger y brindar estabilidad al agente bioplaguicida. En la selección del soporte adecuado se debe tener en cuenta la estabilidad del agente activo en el mismo, por lo que es importante caracterizar fisicoquímicamente cada diluyente, evaluando propiedades como: pH, grado de absorción de agua, grado de solubilidad, intercambio iónico y tamaño de partícula.

Tabla 2. Diluyentes empleados en el desarrollo de formulaciones.

Naturaleza química	Formulaciones		
	Sólidas	Líquidas	Asperjables
Mineral	Arcilla, Bentonita Bentonita, Caolinita, Palygorskita, Polvo de diatomeas, Silicatos, Zeolita, otros.		
Orgánica: Solventes aromáticos, alcoholes, cetonas y amidas		Xileno, Etanol, Isopropanol y Butanol Ciclohexanona, Dimetilformamida	
Derivados del petróleo	Ceras	Aceite mineral	
Carbohidrato	Harinas		Agar, Alginato, Almidón, Amilosa, Carragenano, Celulosa, Dextrinas, Quitina, Quitosán, Xantanas, Xilanas
Proteica	Hidrolizados		Albúmina, Caseína, Colágeno, Fibrinógeno, Gelatina, Queratinas
Polímeros naturales	Ácido húmico, Corcho, Lignina, Taninos		
Poliésteres			Poliacetato, Poli(acrilamida), Polihidroxibutirato, Polihidroxivalerato, Polilactato, Polivinilo

(Adaptado de Palacios 2015).

3. Adyuvantes o aditivos: son sustancias inertes que por sus propiedades fisicoquímicas optimizan la actividad del principio activo, mejorando las características del producto final. Algunos de sus objetivos son: otorgar un efecto apetecible, proteger al principio activo de las radiaciones solares y retardar la evaporación de agua. Los adyuvantes, confieren a la formulación plaguicida persistencia en el ambiente, estabilidad de su integración física y la retención del principio activo. En ocasiones, un adyuvante en particular puede presentar múltiples propiedades de forma simultánea. Generalmente, la incorporación de los adyuvantes en el formulado, ha de aplicarse por separado en el tanque de mezclado. Algunos tipos de adyuvantes empleados en el desarrollo de formulados, son: agentes tensoactivos o surfactantes, de fluidez, adherentes, dispersantes, amortiguadores de pH, estabilizantes, sustancias humectantes, fagoestimulantes, detergentes y sustancias fotoprotectoras (Tabla 3), (Barbera 1976; Couch 1978; Sawicka y Couch 1983).

Tabla 3. Aditivos empleados en el desarrollo de formulaciones.

Propiedad	Función	Sustancias
Adherente	Evitar el arrastre del formulado por lluvia o viento	Albumina, Caseína, Carragenano, Dextrinas, Leche en polvo.
Amortiguador	Mantener el pH del formulado	Sales ácidas de fosfato
Estabilizante	Evitar la descomposición del principio activo	Glicoles, fenoles y polímeros
Fagoestimulante	Aumentar la palatabilidad del formulado	Aceite de semilla de algodón, Aceite de maíz, Azúcar, Extractos acuosos de grano, hoja, flor y pelo de maíz. Follaje de maíz deshidratado, Germen de trigo, Glutamato monosódico
Fotoprotector	Proteger al principio activo de las radiaciones solares y la temperatura.	Carbón vegetal, Colorantes como rojo congo y verde malaquita, Celulosa, Dióxido de titanio
Surfactante	Promover la emulsificación, humectación y dispersión del principio activo	Tween 80, Triton B-1956
Suspensante	Favorecer la suspensión de los formulados al aumentar la viscosidad del agua	Albumina, Alcohol polivinílico, Almidón, Carragenano, Goma Guar, Metilcelulosa, Naftaleno, Sulfonato de lignina, Xantanas

(Adaptado de Rosas 2008 y Palacios 2015).

3.3 Avances en el desarrollo de formulaciones a base de *B. thuringiensis* y soportes poliméricos.

Bacillus thuringiensis es el agente microbiano más empleado como principio activo en el diseño de formulaciones plaguicidas. Sus productos celulares (δ -endotoxina y espora), se caracterizan por no presentar actividad toxicológica en vertebrados y plantas, además, de ser altamente específicas para una plaga determinada.

Bacillus thuringiensis es una bacteria entomopatógena, Gram (+), aislada por primera vez en el año 1901 a partir de larvas enfermas del lepidóptero *Anagasta kuebniella* por Shigitane Ishiwata y posteriormente, por Berliner en 1911 (Aizawa 2001). En 1930, en Yugoslavia se emplea por primera vez como agente de control biológico contra la plaga del maíz europeo (Lord, 2005). A raíz de ello, su empleo contra insectos lepidópteros se incrementó en Europa, siendo Francia, el primer país en desarrollar y comercializar el primer formulado llamado Sporaine® (Aronson 1986).

A la fecha, existen más de 100 formulados a base de *B. thuringiensis* en el mundo representando cerca del 90 % de los bioplaguicidas. Tan solo en el continente americano se han desarrollado más del 50 % de la producción mundial (Galán et al. 2006).

La principal actividad plaguicida de *B. thuringiensis* radica en sus toxinas Cry producidas durante la etapa de esporulación; actualmente, se han descrito más de 30 isoformas proteicas a partir de poco más de 90 subespecies de *B. thuringiensis* (Galán et al. 2006) y constantemente se buscan nuevas cepas con mayor actividad toxicológica para la producción de insecticidas. A pesar de su inocuidad y especificidad entomopatógena, su empleo se ha visto reducido a causa de la inactivación funcional debido a condiciones climáticas y agroambientales, tales como: radiaciones solares, humedad, pH, salinidad del suelo, etc. Ante ello, continuamente se han buscado formulaciones mediante procesos asequibles que brinden protección y estabilidad, así como aseguramiento de la viabilidad del agente microbiano (Palacios 2015).

En el desarrollo de formulaciones a base de *B. thuringiensis* se han probado matrices o soportes inertes de diversa naturaleza química, entre ellos los polisacáridos, por ejemplo:

El almidón de maíz ha sido uno de los soportes favoritos que más éxito ha tenido en la formulación de insecticidas con entompatógenos gracias a sus propiedades adherentes y de protección al principio activo (Rosas y De Luna 2006; Tamez et al. 1996).

No así, los formulados a base de maíz quebrado o el salvado de trigo, su baja adherencia ha condicionado su empleo a las partes bajas de la planta o a nivel de suelo (Gillespie et al. 1994).

Por otro lado, Tamez y colaboradores en el año 1998, emplearon harina de maíz bajo proceso de nixtamalización, mejorando la actividad residual de los formulados con *B. thuringiensis* hasta por dos años (Tamez et al. 1998).

Otros polímeros de naturaleza carbohidrato ampliamente utilizados en la formulación con *B. thuringiensis*, son el alginato y la quitina. Sin embargo, no han sido del agrado alimenticio de larvas lepidópteras de *T. ni* (Morales et al. 1998).

La harina de maíz pregelatinizada en combinación con lignina, mejoró la actividad residual de formulados a base de *B. thuringiensis* al evitar el arrastre por lluvia (Tamez et al. 2000).

Actualmente, existe gran variedad de formulaciones comerciales a base *B. thuringiensis* para el control de plagas agrícolas y forestales (Tabla 4). Sin embargo, sus patentes refieren el empleo de diferentes soportes inertes, aditivos y tecnología de formulación para mejorar aún más la actividad insecticida (Rosas, 2009). En la mayoría de los casos, estos productos ofrecen interesantes ventajas sobre bioplaguicidas previamente desarrollados.

Tabla 4. Formulaciones comerciales a base de *Bacillus thuringiensis*.

Principio Activo	Insecto susceptible	Nombre comercial	Empresa
<i>B. thuringiensis</i> v. <i>aizawai</i>	Larvas de Lepidópteros	Agree WG	Certis
		Florbac	Sumitomo Chemical Co.
		Quark	Arysta Life Science Co.
		Sabrina	Meiji Seika Kaisha
		Sabrina	Sankei Chemical Co.
<i>B. thuringiensis</i> v. <i>aizawai</i> + v. <i>kurstaki</i>	Larvas de Lepidópteros	Bacilex	SDS Biotech Co.
<i>B. thuringiensis</i> v. <i>israelensis</i>	Larvas de moscas de scáridos de hongos	GnatrolDG	Valent Biosciences Corp.
	Larvas de mosquito	VectoBac	Valent Biosciences Corp.
	Larvas de Mosquito y de Mosquita negra	Teknar	Valent Biosciences Corp.
<i>B. thuringiensis</i> v. <i>japonensis</i>	Abejorros y larvas blancas	BuiHunter	Sumitomo Chemical Co.
<i>B. thuringiensis</i> v. <i>kurstaki</i>	Lepidópteros	>30 especies	Agribac
			AFA Environment Inc.
			Biobit
			Valent Biosciences Corp.
			BioMax DF
			Nihon Green & Garden Co.
			Condor
			Certis
			CoStar
			Certis
			DiPel
			Valent Biosciences Corp.
			Dipol
			Sumitomo Chemical Co.
			Deliver
			Certis
			Esmark
			Sumitomo Chemical Co.
			Fivestar
			Agro-Kanesho Co.
	Foray		
	Valent Biosciences Corp.		
	Guardjet		
	Kubota; Syngenta Japan Co.		
	Jackpot WP		
	Certis		
	Javelin/Delfin		
	Certis		
	Lepinox WDG		
	Certis		
	Thuricide		
	Valent Biosciences Corp.		
	Tuneup		
	SDS Biotech Co.		
	Turix WP/Agree WP		
	Certis		
	<i>Spodoptera</i> ssp. Y <i>Plutella xilostella</i>	XenTari	Valent Biosciences Corp.

(Adaptado de Rosas 2009 y Leng et al. 2011).

3.4 La encapsulación como método para el desarrollo de formulaciones

Los procesos de encapsulación se desarrollaron en la década del año 1930 por la National Cash Register. Son procesos en los cuales un ingrediente activo en gotas o microparticulado es cubierto o embebido en una matriz homogénea o heterogénea en forma de microcápsulas brindando al principio activo estabilidad durante su almacenamiento, manejo y aplicación, así como protección a condiciones desfavorables (Yáñez et al. 2005).

El término microcápsula se ha utilizado o para describir pequeñas partículas, en un rango de una micra a varios milímetros, los cuales pueden contener una amplia variedad de ingredientes activos. Entre los materiales convenientes para la producción de microcápsulas se tienen polímeros biodegradables de naturaleza carbohidrato como alginatos, carragenanos, agar, agarosa, pectina, goma de guar, goma de acacia, almidón, celulosa y quitosán; proteica como gelatina o suero de leche; polipeptídica como poli-L-lisina; lipídica como ceras, parafinas, tristerina o ácido esteárico y otros biopolímeros de estructura y composición compleja como la lignina, carboximetilcelulosa, etilcelulosa y acetilcelulosa. (Yáñez et al. 2005).

Existen diferentes métodos para el desarrollo de microcápsulas como son el secado por aspersión, extrusión, coacervación, inclusión molecular, entre otros. La selección del proceso debe considerar el tamaño medio de la partícula requerida, propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, así como las aplicaciones de las microcápsulas, el mecanismo de liberación y el costo (Yáñez et al. 2005; Vemmer y Patel 2013).

El diseño de microcapsulas abarca una amplia gama de campos: la liberación controlada de aromas, sabores, colorantes, fármacos y fertilizantes. Recientemente se han aplicado los métodos de encapsulación en el desarrollo de formulados a base de antimicrobianos, plaguicidas y agentes de control biológico, empleando diferentes matrices poliméricas y secado por aspersión (Yáñez et al. 2005; Chen et al. 2013; Muñoz et al. 2012; Vemmer y Patel 2013).

El método de secado por aspersión, se logra cuando el material a encapsular es homogenizado con el agente encapsulante; la mezcla es alimentada al secador por aspersión, atomizada por una boquilla y secada al momento por una corriente de aire caliente. Este proceso es económico y flexible, y se obtienen partículas uniformes de buena calidad y ha sido utilizado tradicionalmente para encapsular ingredientes alimenticios como lípidos, carotenoides, vitaminas y sabores. (Yáñez et al. 2005; Gharsallaoui et al. 2007; Vemmer y Patel 2013).

3.5 La encapsulación mediante secado por aspersión en el desarrollo de formulaciones a base de *B. thuringiensis*.

Con respecto a la formulación de insecticidas a base de *B. thuringiensis*, en el año 1996, McGuire y su grupo de trabajo emplearon la técnica de secado por aspersión, encapsulando al agente microbiano en un soporte a base de almidón de maíz pregelatinizado, obteniendo buena protección del principio activo (McGuire et al. 1996).

Por otro lado, en el año 1999, Tamez y su grupo de trabajo observaron que los formulados a base de harina de maíz nixtamalizada y algunos aditivos como aceite vegetal, azúcar pulverizada, 2-propanol, verde malaquita y formaldehído y obtenidos mediante secado por aspersión ofrecían mayor protección a la radiación solar *B. thuringiensis* en contraste con las mismas mezclas que no fueron secadas por aspersión (Tamez et al. 1999).

Aplicando esta tecnología a los agentes entomatógenos se logra obtener productos que mejoran las características de los agentes de control biológico con una vida de anaquel mayor, un manejo más seguro del bioinsecticida, reducir la dosis o el número de aplicaciones en campo es factible adicionar en la formulación agentes adyuvantes para proveer características de adherencia o propiedades fagoestimulantes, así como protegerlos de los efectos ambientales para prolongar la efectividad y persistencia con la finalidad de hacerlos más competitivos contra los insecticidas químicos (Hall y Barry. 1995; Muñoz et al. 2012; Vemmer y Patel 2013).

3.6 Kéfir de agua: origen, composición y alcances

La palabra *Kéfir* tiene su origen en los montes Caucásicos, su historia se remonta a la preparación del *ayrag*, bebida obtenida al dejar en reposo la leche cruda de los animales dentro de bolsas elaboradas a partir de la piel de cabra, que nunca se lavaban y que continuamente se iban llenando de leche conforme se producía el *ayrag*. En cierto momento se observó que, la masa blanquecina y mucilaginosa, recuperada de las bolsas de piel, podían fermentar la leche produciendo una bebida con mejor sabor al *ayrag*. Esta bebida fermentada se llamó Kéfir, del turco Kief que significa *de agradable sensación* (Tratnik et al. 2006; De Oliveria et al. 2013, Marsh et al. 2013).

Inicialmente, el kéfir se elaboraba a partir de leche de camello, yegua, cabra y vaca. Hoy en día es casi imposible acceder a este tipo de materia prima. Sin embargo, se ha logrado producir en leche comercial y en algún momento, se pasó a cultivarse en agua azucarada, por lo que los granos fueron llamados kéfir de agua o kéfir de azúcar adoptando así su propia fisiología y composición microbiana.

El origen de kéfir de agua fue descrito por primera vez por Ward en el año 1892 con el nombre de "grano de cerveza de jengibre" dando alusión a la bebida acidulada, carbonatada y con un ligero sabor a alcohol. (Gulitz et al., 2011; Marsh et al. 2013).

El kéfir de agua, se distingue del kéfir de leche en su composición bioquímica y microbiológica. Los granos de kéfir de agua, también llamados tibicos, consisten de una asociación simbiótica entre bacterias del ácido láctico (BAL), bacterias productoras de ácido acético y levaduras; embebidas en una matriz polimérica. En contraste con los granos de kéfir de leche, los tibicos de agua, son de una tonalidad amarilla-blanca casi transparente, de aspecto gomosa y de forma irregular, semejante a pequeños trozos de coliflor con un diámetro variable entre 3 y 35 mm. (Seher 2015), (Figura 1).



Figura 1. Granos de kéfir de agua.

Se ha reportado a *Lactobacillus hilgardii* como principal microorganismo productor de un $\alpha(1\rightarrow6)$ glucano insoluble dentro del grano de kéfir de agua (figura 2); mientras que, en el grano de kéfir de leche, *Lactobacillus kefiranofaciens*, la principal BAL productora de un polisacárido soluble, cuya unidad monomérica consiste de un disacárido formado por α -D-glucosa y α -D-galactosa unidas por enlace glucosídico $\alpha 1\rightarrow6$ (Pidoux 1989; Gulitz et al. 2011; Stadie et al. 2013 y Zajšek et al. 2013).

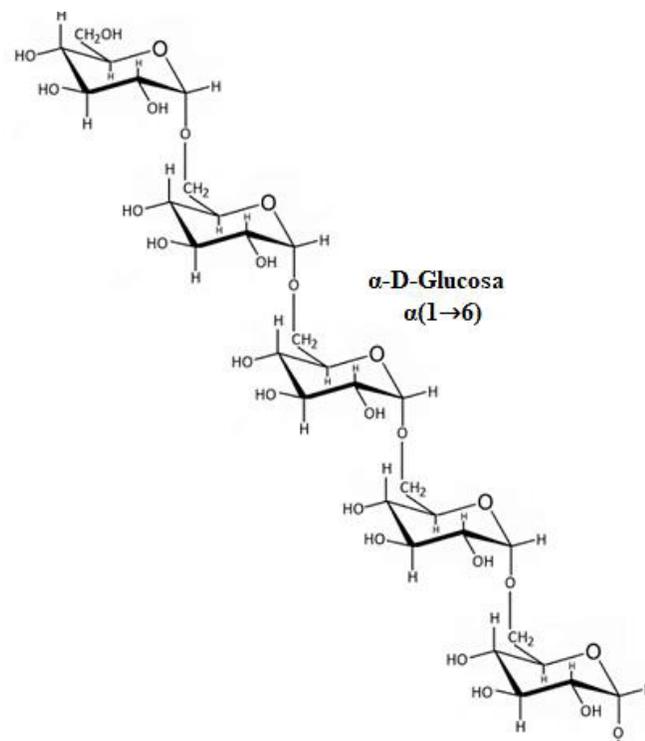


Figura 2. Estructura química del exopolímero en el grano de kéfir de agua.

El cultivo de los granos de túbico, es un proceso fermentativo asequible que se logra, mediante la adición de los granos, que sirven como inóculo, a una mezcla de agua de grifo estéril y sacarosa refinada o no; después de 48 a 96 horas de incubación a temperatura ambiente se obtiene, además de la bebida probiótica, un incremento en la biomasa.

Los exopolisacáridos derivados de procesos fermentativos con bacterias del ácido láctico se utilizan para modificar las propiedades reológicas de sistemas acuosos. Pueden ser utilizados como agentes emulsificantes, espesantes, floculantes, gelatinizantes entre otras aplicaciones. También pueden constituir una fuente de monosacáridos con propiedades edulcorantes o antioxidantes para la industria alimenticia y farmacéutica, respectivamente en la industria química y biotecnológica como floculantes, absorbentes y agentes de eliminación de metales pesados (Zajšek et al. 2013).

En ese tenor, la producción del grano de kéfir de agua constituye una alternativa para la obtención de un exopolisacárido con diversa aplicabilidad en la industrial.

4. JUSTIFICACIÓN

El cambio climático ha generado condiciones agroclimáticas diferentes en todas las regiones agrícolas del planeta, estableciendo ambientes que favorecen la rápida reproducción de artrópodos insectos y con ello, la rápida distribución de fitopatógenos de amplio espectro geográfico por insectos vectores dejando a su paso pérdidas de hasta el 40 % en la producción total de agroalimentos equivalentes a miles de millones de dólares para los agricultores y la agroindustria. Ante esta situación, se ha incrementado el uso de plaguicidas químicos de amplio espectro directamente en los cultivos y con ello, la contaminación de mantos acuíferos subterráneos, la afectación de insectos benéficos y el deterioro de la salud en animales y humanos.

Como alternativa a esta problemática, el sector agrícola y los sistemas de sanidad vegetal se han dado a la tarea de establecer nuevos programas de control biológico como el uso de bioplaguicidas entompatógenos cuya formulación adecuada permita disponer de un producto seguro, efectivo, fácil de aplicar, con una larga vida de anaquel y que logre extender la viabilidad del principio activo en el ambiente.

Por tal motivo, es necesario establecer nuevos métodos sustentables para la elaboración de formulados que incluyan: la implementación de biopolímeros como soportes y agentes encapsulantes que permitan la liberación rápida o prolongada del principio activo, así como su protección a condiciones adversas durante su almacenaje y aplicación en campo.

Se propone aquí por primera vez, la evaluación del extracto polimérico extracelular del grano de kéfir de agua como agente encapsulante de *B. thuringiensis*. Como valor agregado, la producción del grano de kéfir de agua es un proceso asequible, la formulación mediante secado por aspersión es relativamente de bajo costo y el producto final constituye un producto amigable con el medio ambiente.

5. HIPÓTESIS

El extracto polimérico del grano de kéfir de agua, solo o en combinación con otros biopolímeros puede ser empleado como agente encapsulante de *B. thuringiensis* en el desarrollo de formulaciones para control biológico.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar fisicoquímicamente el extracto polimérico producido por un consorcio microbiano conocido como tibicos o kéfir de agua, así como evaluarlo como posible agente encapsulante de *B. thuringiensis*, solo o en combinación con otros biopolímeros.

6.2 Objetivos generales

- a) Producir kéfir de agua, a partir de un cultivo casero empleando piloncillo como principal fuente de carbono.
- b) Obtener el exopolisacárido de los gránulos de kéfir de agua mediante extracción ácida y precipitación etanólica.
- c) Caracterizar fisicoquímicamente el exopolisacárido del kéfir de agua, evaluando parámetros como: azúcares totales, azúcares reductores, proteínas, humedad, cenizas, pH, Índice de solubilidad en agua e Índice de absorción de agua.
- d) Producir microcápsulas a partir del exopolisacárido del kéfir de agua, solo y en combinación con otros biopolímeros (almidón modificado y pectina) mediante secado por aspersión.
- e) Evaluar la suspensibilidad, adherencia a superficie, factibilidad de aspersión y preferencia alimenticia de las microcápsulas a base de exopolisacárido de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros.
- f) Desarrollar formulados a base del complejo espora cristal de *B. thuringiensis* GM10 al 10% y la matriz encapsulante que mejor características presentó.
- g) Efectuar un bioensayo de retención de actividad tóxica en laboratorio con los formulados de *B. thuringiensis* GM-10 al 10%.

7. METODOLOGÍA

7.1 Producción de kéfir de Agua

Obtención del consorcio microbiano kéfir de agua.

Los gránulos de kéfir de agua fueron proporcionados por el Laboratorio 1 del Instituto de Biotecnología, FCB/UANL procedentes de un cultivo casero presente en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México.

Activación y producción del consorcio microbiano Kéfir de agua.

Para la activación del consorcio microbiano, 100g de biomasa de kéfir de agua (peso húmedo) fueron inoculados a un litro de medio a base de piloncillo al 10 % P/v como principal fuente de carbono e incubado a $27\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas. Luego, los granos de kéfir fueron filtrados, lavados con agua de grifo y drenados. La producción de biomasa se llevó a cabo constantemente en matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 mL mediante un procedimiento similar al descrito. El porcentaje de rendimiento de biomasa obtenida en peso húmedo se calculó a partir de cinco cultivos.

7.2 Obtención del extracto polimérico extracelular del grano de Kéfir de agua.

La extracción del exopolisacárido del grano de kéfir de agua fue realizada mediante extracción ácida y precipitación alcohólica. En un matraz Erlenmeyer con capacidad de 1000 mL se colocaron 100 g de kéfir de agua (peso húmedo). Luego, se añadieron 200 mL de una solución acuosa de Ácido sulfúrico 0.1 N; la mezcla se calentó a 100°C hasta la disolución completa de los granos de kéfir empleando para ello una plancha térmica con agitación continua. Transcurrido el tiempo estipulado, la mezcla se dejó reposar hasta tomar temperatura ambiente y se centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos a 24°C para permitir la remoción de proteínas y células. Luego, con la ayuda de un potenciómetro se midió el pH de la mezcla y se ajustó hasta un pH de 7.0 con una solución acuosa de NaOH. Una vez ajustado el pH, se agregaron a la mezcla 3 volúmenes de alcohol étílico absoluto frío y se dejó reposar toda la noche a -20°C . Al día siguiente se eliminó el sobrenadante

por decantación, la masa sólida y húmeda fue recuperada y transferida a un vaso de precipitados con capacidad de 100 mL previamente tarado. El sobrenadante fue centrifugado a 7000 rpm durante 15 minutos a cuatro centígrados con la finalidad de recuperar la mayor cantidad posible de extracto polimérico. La masa sólida del extracto obtenido fue secada en un horno a 40°C por 48-72 horas. El porcentaje de rendimiento del extracto obtenido (peso seco) fue calculado a partir de cinco repeticiones del proceso de extracción. Finalmente, el extracto sólido fue macerado hasta la obtención de un polvo de partícula uniforme, empleando para ello un molino de perlas con rotación constante a 40 rpm por 24-48 horas, ver figura 3.

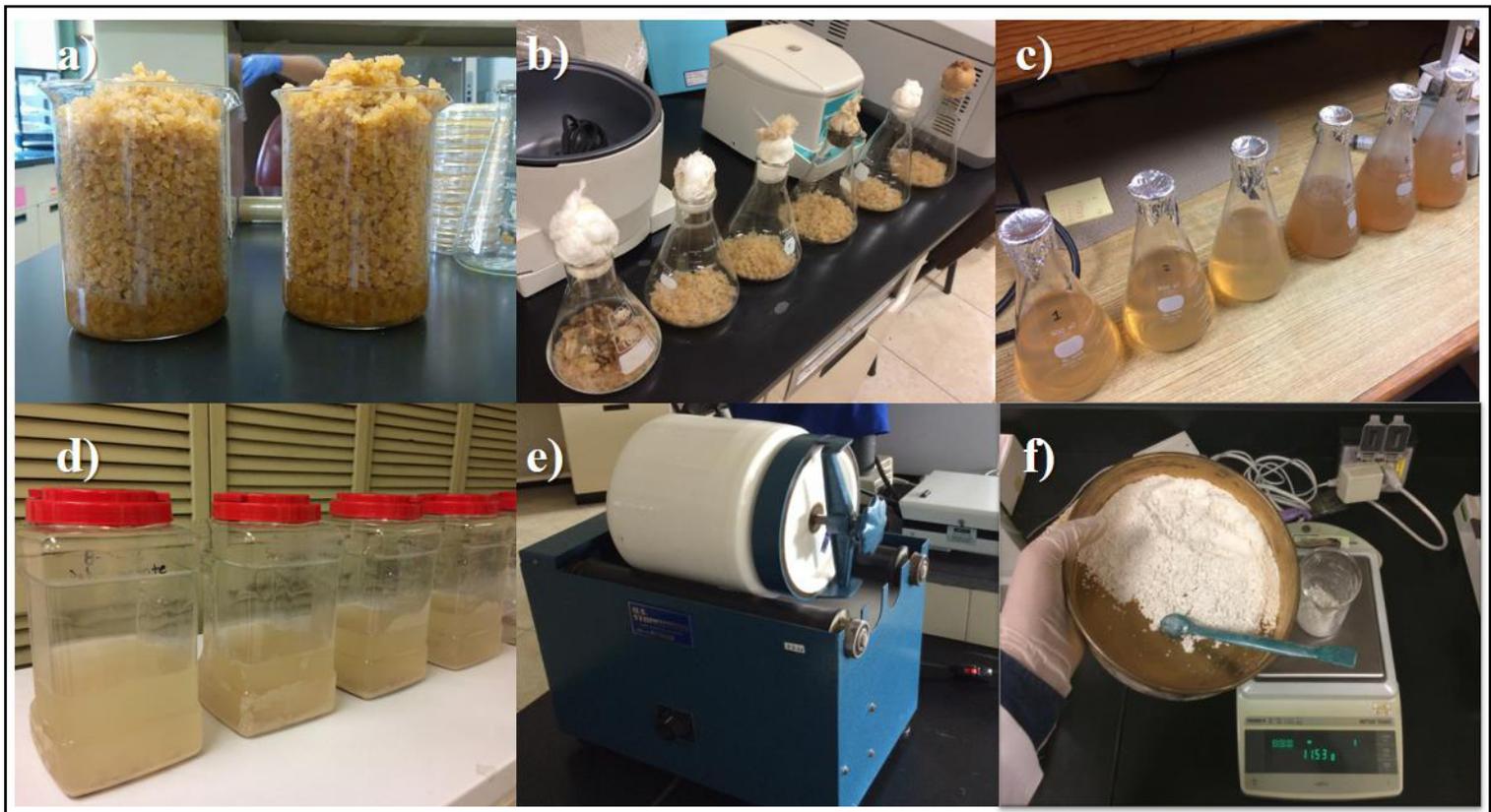


Figura 3. a) Producción kéfir de agua b) pesaje de biomasa de kéfir c) disolución del grano de kéfir mediante hidrólisis ácida d) Precipitación alcohólica del extracto polimérico e) molienda del extracto obtenido f) Extracto polimérico obtenido del grano de kéfir de agua.

7.3 Caracterización fisicoquímica del extracto polimérico extracelular obtenido

Para conocer la naturaleza y composición química del extracto obtenido, se realizó una batería bioquímica de pruebas cualitativas coloridas. Se ensayaron las pruebas de Molisch, Fheling y Biuret para detectar carbohidratos, azúcares libres y proteínas, respectivamente. En tanto que las pruebas de Selliwanoff, Benedict, Barfoed, Bial y Lugol se aplicaron para la detectar la presencia de cetosas, azúcares reductores, monosacáridos, pentosas y almidón, respectivamente (Plummer 1978).

Azúcares totales

El contenido de azúcares totales del extracto sólido obtenido fue determinado espectrofotométricamente por el método de Antrona, usando glucosa como estándar. 1 mL de una dilución 1:2 de una solución acuosa del extracto obtenido a una concentración de 0.1g/L fue depositado en un tubo de ensaye de 18 x 150 mm dispuesto en un baño de hielo, enseguida se agregó un mL de agua destilada y cuatro mL de reactivo Antrona al 0.2 % disuelta en Ácido sulfúrico. La mezcla en el tubo fue agitada en vortex y enseguida se colocó el tubo en un baño de agua en ebullición durante diez minutos. Al transcurrir el tiempo de reacción, el tubo fue retirado del baño de agua y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez frío el tubo, la solución se transfirió a una celda para espectrofotómetro y se midió la absorbancia empleando una longitud de onda de 620 nm (Plummer 1978). El contenido de azucares totales se realizó por quintuplicado.

Azúcares reductores

Se determinó el contenido de azúcares reductores mediante espectrofotometría, aplicando el método de DNS y empleando glucosa como estándar (Plummer 1978). En un tubo de ensaye de 18 x 150 mm se depositaron tres mL de una solución del extracto obtenido a una concentración de 1 mg/mL y un mL de la solución de DNS, el tubo se agitó en un vortex y enseguida fue colocado dentro de un baño de agua en ebullición durante cinco minutos. Al terminar el tiempo de incubación, el tubo fue retirado del baño de agua y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución fue vertida en una celda para espectrofotómetro y se midió su absorbancia empleando una longitud de onda de 540 nm. La determinación de azúcares reductores fue realizada por quintuplicado.

Proteínas Totales

El método de Bradford fue aplicado para la determinación del contenido proteico total. Para ello, se empleó albumina sérica bovina como estándar (BioRad). 0.100 mL de una solución del extracto polimérico obtenido a una concentración de 0.1 mg/mL fueron depositados en un tubo para microcentrífuga con capacidad de 1.5 mL. Enseguida, se añadió un mL del reactivo de Bradford (BioRad) diluido 1:5, el tubo se agitó en un vortex y se dejó reposar bajo oscuridad por cinco minutos. Al terminar el periodo de reposo, la solución se vertió en una celda para espectrofotómetro y se registró la absorbancia a 595 nm de longitud de onda. El ensayo fue realizado por quintuplicado.

La caracterización química aplicada para el extracto polimérico obtenido del grano de kéfir de agua, se presenta en la figura 4.

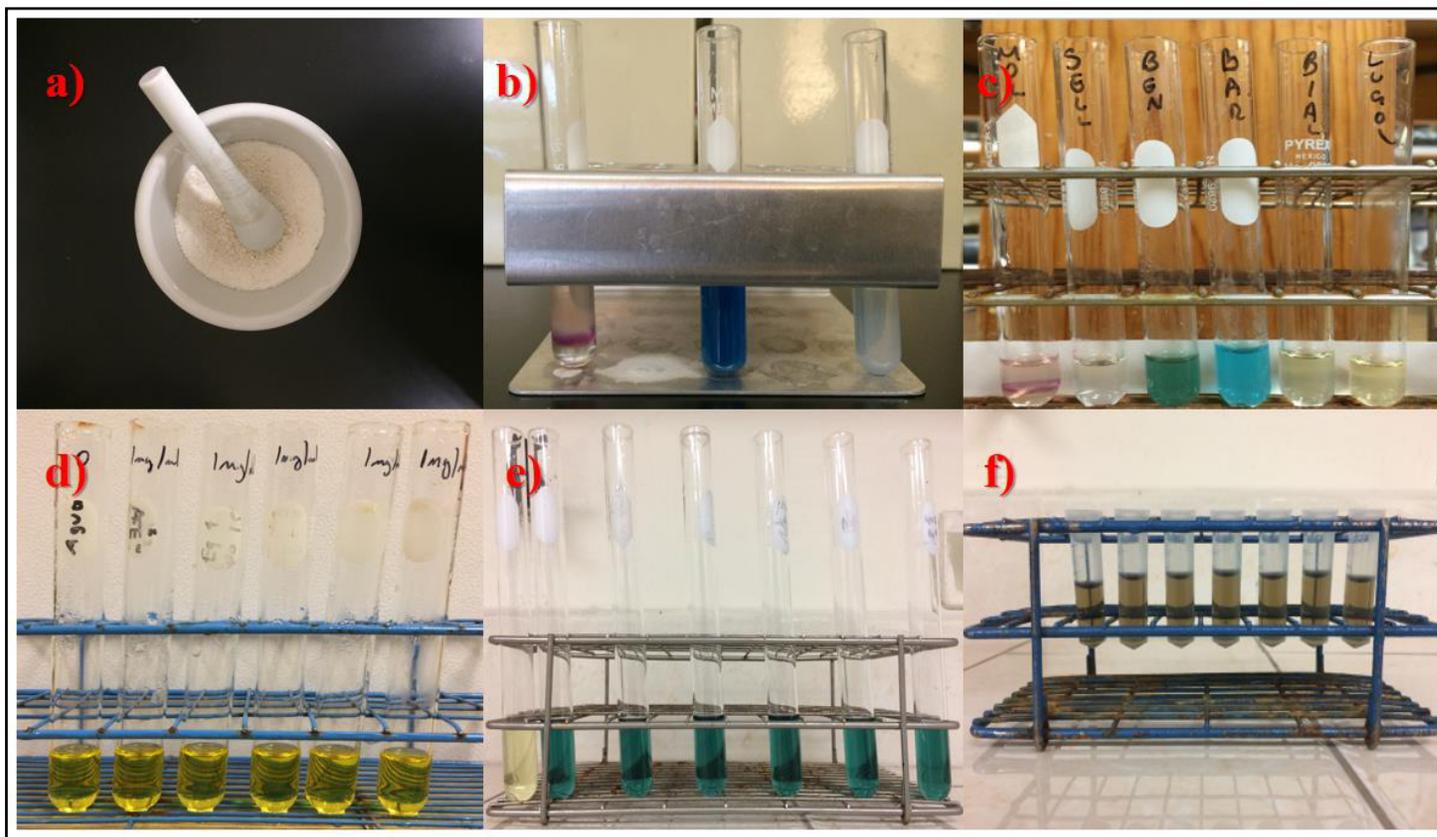


Figura 4. a) Extracto derivado del kéfir de agua b) Pruebas cualitativas para naturaleza química: Molisch, Fehling y Biuret c) Batería bioquímica para carbohidratos: Molisch, Seliwanoff, Benedict, Barfoed, Bial y Lugol d) Ensayo para cuantificación de azúcares reductores: método DNS e) Cuantificación de azúcares totales: método de Antrona f) Método de Bradford para cuantificación de proteínas totales.

Humedad

El porcentaje de humedad se determinó mediante el método gravimétrico 925.10 de la AOAC, 2005. Aproximadamente dos gramos del extracto polimérico obtenido se depositaron en un crisol de porcelana previamente tarado hasta registrar una masa constante, M1. La masa del crisol con el extracto polimérico fue registrada y designada como M2. Enseguida, se llevó el crisol conteniendo la muestra a un horno de calentamiento a 100°C durante cinco horas. Al terminar el tiempo de calentamiento, los crisoles fueron retirados del horno y colocados en un desecador durante toda la noche hasta obtener la masa constante de la muestra anhidra, M3. El ensayo fue realizado por quintuplicado. El porcentaje de humedad del extracto polimérico, se calculó empleando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ de Humedad} = \frac{M2 - M3}{M2 - M1} (100)$$

Cenizas

El contenido de cenizas se determinó mediante gravimetría, aplicando el método 942.05 de la AOAC, 2005. Una masa de dos gramos del extracto polimérico obtenido se depositó en un crisol de porcelana previamente tarado. El crisol con la muestra fue colocado sobre una plancha térmica a 100°C para permitir su precalcificación hasta no observar desprendimiento de humo. Luego, los crisoles fueron introducidos en una mufla a 600 °C durante dos horas. Al termino del tiempo de incineración, la mufla se apagó y los crisoles con las cenizas fueron dejados dentro del equipo para permitir su enfriamiento. Al día siguiente, los crisoles fueron retirados de la mufla y colocados en un desecador hasta registrar una masa constante. La determinación de cenizas, se realizó por quintuplicado. El contenido de cenizas se calculó aplicando la siguiente fórmula matemática:

$$\% \text{ de Cenizas} = \frac{M3 - M1}{M2 - M1} (100)$$

Dónde: M1, es la masa del crisol tarado

M2, es la masa del crisol con el extracto polimérico

M3, representa la masa del crisol con las cenizas.

pH

Para la determinación del pH del extracto polimérico obtenido se aplicó el método 943.02 de la AOAC, 2005. Una masa del extracto polimérico obtenido se disolvió en agua previamente hervida y fría para obtener una solución al 10 %. La solución homogénea recién preparada se llevó a un potenciómetro calibrado a dos puntos y se midió el potencial de Hidrogeno. El ensayo se realizó por sextuplicado.

Índice de Solubilidad en Agua e Índice de Absorción de agua.

El índice de solubilidad en agua (ISA) e índice de absorción de agua (IAA) del extracto polimérico extracelular del grano de kéfir de agua, fueron evaluados mediante el método propuesto por Anderson y su grupo de trabajo (Anderson et al.1969). Se midió la masa de un tubo de ensayo cónico con capacidad de 50 mL y en él se depositaron aproximadamente 1.25g del extracto polimérico obtenido, la masa del tubo con el extracto fue registrada. Enseguida, se agregaron 30 mL de agua destilada a 60°C y la mezcla se agito en un vortex, el tubo fue llevado a un baño de agua caliente a 60°C durante 30 minutos, la solución se agitó manualmente después de 10 minutos de incubación y en periodos de cinco minutos. Al terminar el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue transferido a un crisol de porcelana previamente tarado y se dejó en un horno de calentamiento a 100°C toda la noche, al día siguiente el crisol con los solubles fue llevado a un desecador durante una hora para luego registrar su masa en una balanza analítica. Por otro lado, el tubo cónico con el gel residual se llevó a una balanza analítica y se registró su masa. El índice de solubilidad en agua fue calculado aplicando la siguiente expresión matemática:

$$ISA = \frac{Masa\ solubles}{masa\ de\ la\ muestra}$$

En donde, la masa de los solubles, es la masa residual en el crisol, determinada después de la evaporación del sobrenadante.

El índice de absorción de agua fue calculado a partir de la siguiente fórmula:

$$IAA = \frac{\textit{Masa del gel}}{\textit{masa de la muestra}}$$

En donde, la masa del gel, es la masa residual en el tubo, determinada después de la centrifugación y separación del sobrenadante.

Ambos índices, fueron determinados por quintuplicado.

7.4 Producción de microcápsulas mediante secado por aspersión

Microcápsulas a partir del extracto polimérico extracelular derivado del grano Kéfir de Agua.

Se preparó una solución acuosa del extracto polimérico obtenido a una concentración de 0.10 g/mL. La solución se calentó a 100°C empleando para ello una plancha térmica con agitación constante hasta disolución completa del extracto. Luego, la solución se sometió por al sistema de secado por aspersión ADL311 de la compañía Yamato Scientific, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de entrada de 160°C, temperatura de salida 100°C, flujo de aire igual a 0.64 m³/min, presión de aspersión de 0.10 MPa, velocidad de alimentación de 2.0 mL/min. Las microcapsulas obtenidas fueron colectadas en frascos de vidrio y almacenadas en un desecador hasta su caracterización.

Microcápsulas mixtas a partir del extracto polimérico extracelular derivado del grano Kéfir de Agua y otros biopolímeros.

Para la preparación de las microcapsulas mixtas, se prepararon 2 mezclas a una proporción 1:1 combinando por separado el extracto polimérico de kéfir de agua con almidón (K-A) y con pectina (K-P). Luego, con cada mezcla se preparó una solución a una concentración de 0.10 g/mL empleando como solvente agua destilada. Las soluciones se calentaron en una plancha térmica a 100°C con agitación continua hasta la disolución completa de los polímeros. Cada solución fue sometida por separado al sistema de secado por aspersión ADL311 de la compañía Yamato Scientific, bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de entrada igual a 160°C, una temperatura de salida de 100 a °C, un flujo de aire igual a 0.64 m³/min, presión de aspersión de 0.10 MPa, velocidad de alimentación de 2.1 mL/min. Las microcapsulas obtenidas fueron colectadas en frascos de vidrio y almacenadas en un desecador hasta su caracterización

La figura 5 ilustra la producción de microcápsulas a base de extracto de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros mediante secado por aspersión.

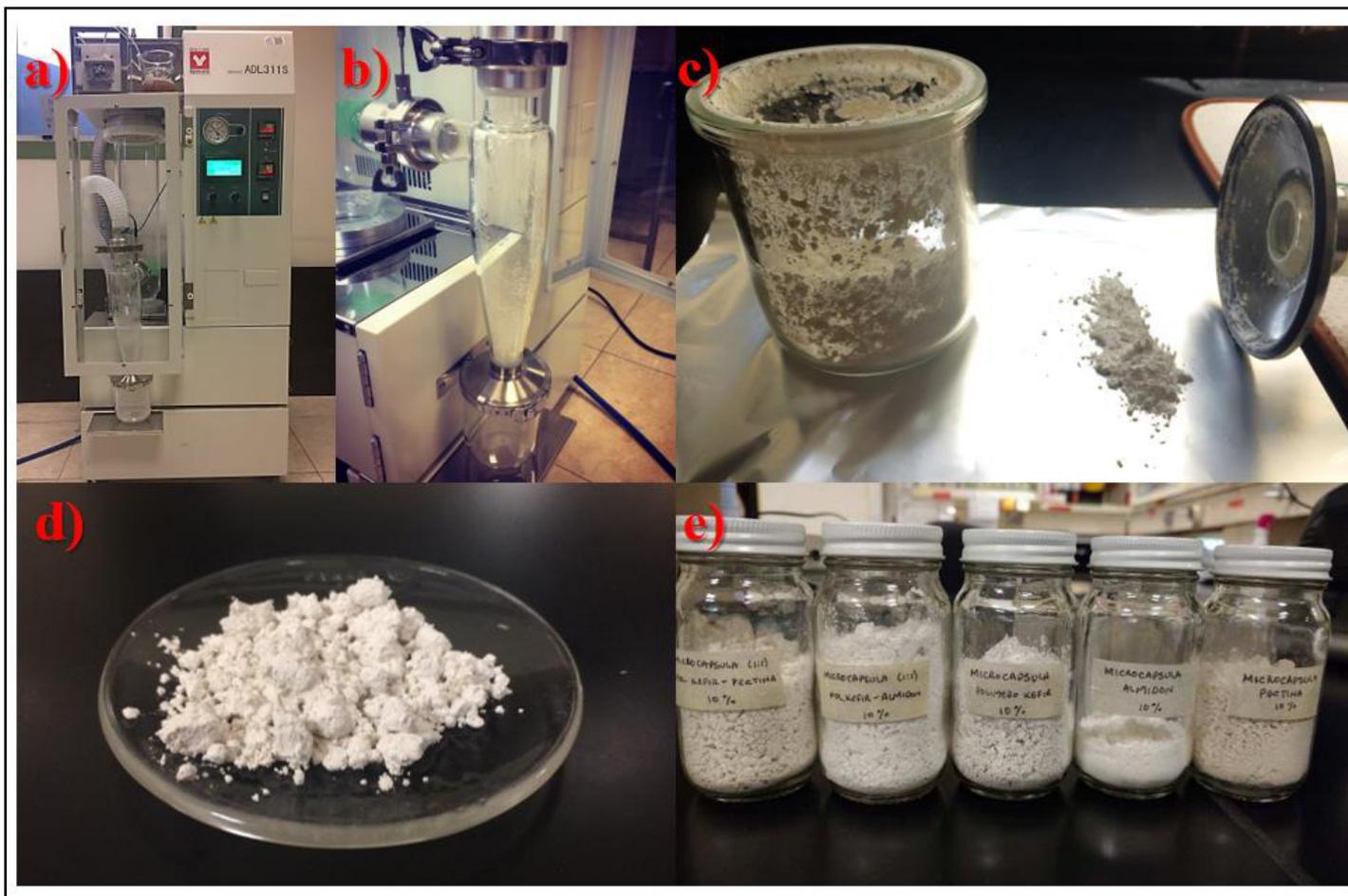


Figura 5. a) Equipo de secado por aspersión b) Ciclón y vaso de colecta c) Recuperación de microcápsulas d) Microcápsulas a base del extracto polimérico del kéfir de agua e) Microcápsulas a base de kéfir, Kéfir-copolímero y de otros biopolímeros al 10 % p/v

7.5 Evaluación de las microcápsulas a base de extracto de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros.

Suspensibilidad

Se prepararon 100 mL de una solución al 1 % p/v en agua destilada de cada una de las microcápsulas. Cada solución se colocó en una bureta con capacidad de 125 mL y se dejó reposar a temperatura ambiente. Transcurridas 0.5, 1, 2, 4 y 8 horas, se tomó una alícuota de cinco mL y se depositó en un vial de vidrio con capacidad de 12 mL previamente tarado. Luego, se eliminó el agua por evaporación y finalmente se midió la masa del vial. Por diferencia de masas, se calculó la masa del residuo contenido en el recipiente. El resultado se expresó como porcentaje de producto en suspensión con respecto al tiempo. Los registros obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico empleando el paquete computacional estadístico SPSS, versión 20. Se aplicó la prueba estadística Kolmogórov Simrnov para conocer el tipo de distribución al que se ajustaban los resultados. El análisis de varianza (ANOVA de 1 factor) fue aplicado para conocer si hubo diferencia en el % de microcapsulas en suspensión con respecto al tiempo. Por último, se aplicó la prueba Tukey a un nivel de confianza $P \leq 0.05$ % y se estableció cual o cuales microcápsulas marcaron la diferencia (Palacios 2015).

Factibilidad de Aspersión

Para probar la factibilidad de aspersión de las microcápsulas en solución al 10 % p/v, se utilizó un frasco aspersor SMI® con capacidad de 50 mL con salida de 0.5 mm a una presión de 5 psi. El resultado se expresó como: Factible de asperjar o No factible de asperjar (Muñiz et al. 2007).

Adherencia en portaobjetos (% de masa lavada)

La propiedad adherente de cada microcápsula se evaluó por el método propuesto por McGuire y Shasha con algunas modificaciones (McGuire y Shasha 1992). Para ello, se utilizaron 10 portaobjetos limpios y tarados. La superficie de cada laminilla de vidrio fue rociada con agua destilada y posteriormente sobre ella se espolvorearon cuidadosamente y con la ayuda de una brocha de cerdas finas, 20 mg de las microcapsulas a evaluar y se permitió secar a temperatura ambiente por 12 horas. Luego, las laminillas se colocaron en

posición inclinada bajo la punta de una bureta con capacidad de 25 mL y se lavaron con de agua destilada a flujo continuo. Las laminillas fueron secadas en una estufa a 60°C por dos h. Al término del tiempo de secado, se midió la masa de la laminilla con las microcapsulas remanentes adheridas y por diferencia de peso se determinó la masa del formulado que permaneció adherida al portaobjetos. El resultado se expresó como porcentaje de masa perdida por arrastre con agua destilada. Además, los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico empleando el paquete computacional estadístico SPSS, versión 20. Se aplicó la prueba estadística Kolmogórov Simrnov para conocer el tipo de distribución al que se ajustaban los registros obtenidos. Luego, los resultados fueron analizados mediante una prueba de ANOVA de 1 factor para conocer si hubo diferencia en el % de masa de microcápsula perdida. Por último, se aplicó la prueba Tukey a un nivel de confianza $P \leq 0.05$ % y se estableció cual o cuales formulados marcaron la diferencia.

Preferencia Alimentaria

La preferencia alimentaria para las microcapsulas a base del extracto de kéfir de agua, solo y combinado con otros biopolímeros (K-A, K-P), se determinó mediante el método de dos alternativas para dos lepidópteros: *S. exigua* y *T. ni* (Bartelt et al. 1990). En cajas Petri desechables de 5 cm de diámetro con fondo cubierto con una mezcla de pasta de parís y carbón activado a una proporción 15:1, se depositaron en sitios opuestos 25 mg de las microcápsulas a evaluar. Luego, se colocaron 10 larvas neonatas de *T. ni* o *S. exigua* y se les permitió alimentarse durante 16 horas a 28°C bajo oscuridad. Al término de este periodo, las cajas Petri fueron llevadas a un congelador a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, se registró el número de larvas presentes sobre las microcapsulas. Los bioensayos se realizaron por quintuplicado utilizando como control positivo un trozo de hoja fresca de lechuga y hoja de maíz de un cm de diámetro, previamente desinfectado, para *T. ni* y *S. exigua*, respectivamente. Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico empleando para ello el paquete computacional SPSS, versión 20. La prueba estadística Kolmogórov Smirnov, fue aplicada para conocer el tipo de distribución al que se ajustaban los datos obtenidos. Luego, se realizó un ANOVA simple de un factor y la prueba comparativa múltiple de medias, Tukey a un nivel de confianza del 95 % para establecer si hay diferencia en la preferencia alimentaria entre las diferentes

microcapsulas. La tabla 5 muestra las combinaciones de microcápsulas a evaluar la preferencia alimentaria para dos insectos.

Tabla 5. Combinaciones de microcápsulas a evaluar preferencia alimentaria.

MICROCÁPSULAS	A	P	K-A	K-P	Control
K	K + A	K + P	K + K-A	K + K-P	K + Ctról
A		A + P	A + K-A	A + K-P	A + Ctról
P			P + K-A	P + K-P	P + Ctról
K-A				K-A + K-P	K-A + Ctról
K-P					K-P + Ctról

Extracto de Kéfir (K), almidón Capsul® (A), Pectina de limón (P), Kéfir-Almidón (K-A) y Kéfir-Pectina (K-P), control positivo: para *T. ni* hojas de lechuga y para *S. exigua* hojas de maíz.

La figura 6 muestra la evaluación de las microcápsulas a base de extracto de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros como posible matriz para el desarrollo de formulados.

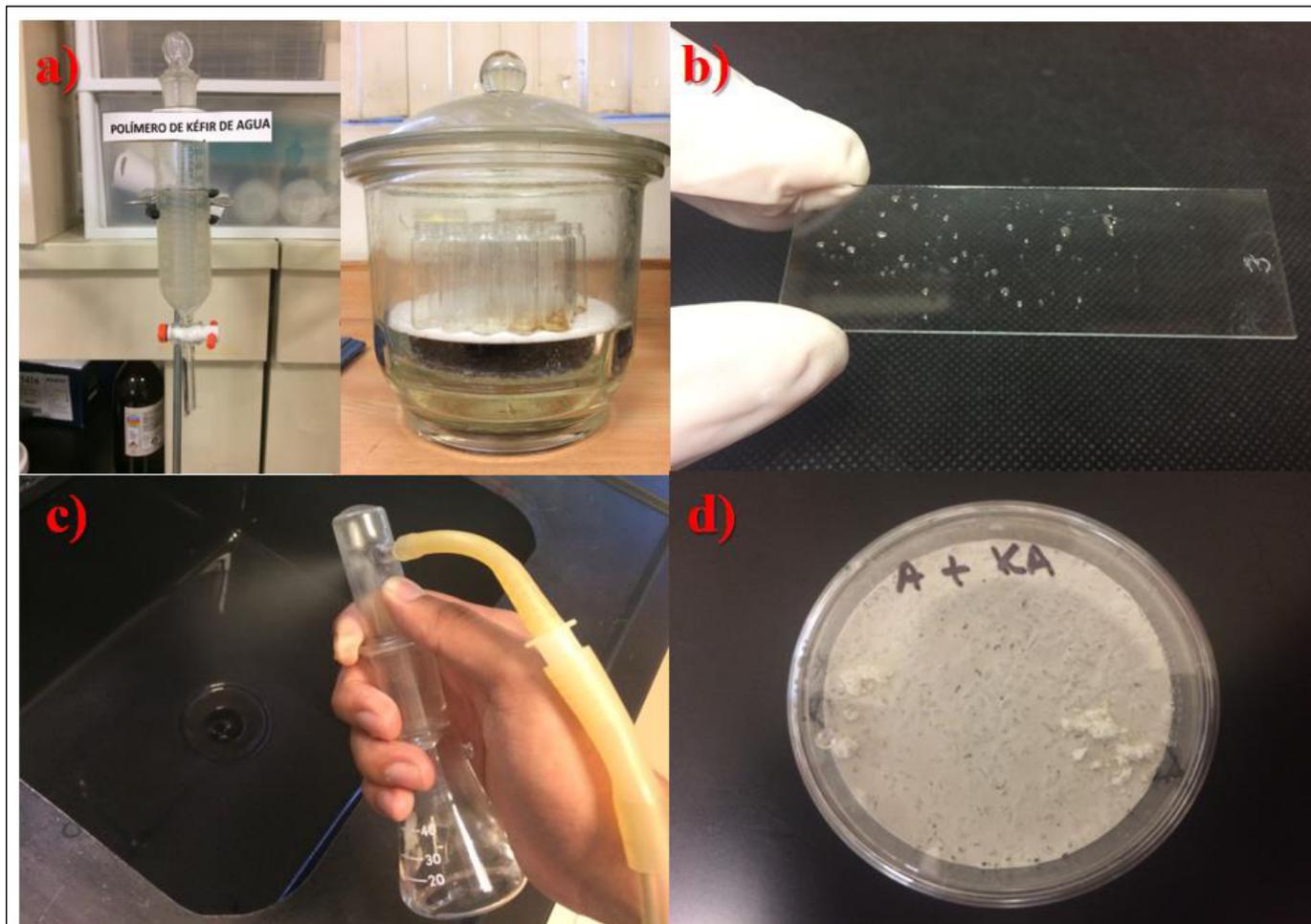


Figura 6. Evaluación de las microcápsulas a base de extracto de kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros como posible agente encapsulante para el desarrollo de formulados: a) Prueba de suspensibilidad b) Prueba de adherencia en portaobjetos c) Factibilidad de aspersión d) preferencia alimentaria.

7.6 Desarrollo de formulados asperjables a base de extracto de kéfir de agua solo o combinado con otros biopolímeros y complejo espora-cristal de *B. thuringiensis*.

Obtención de la cepa de *B. thuringiensis*

La cepa de *B. thuringiensis*, identificada como Bt-GM10 fue proporcionada por el cepario del Laboratorio 1 del Instituto de Biotecnología, UANL. BT-GM10 es una cepa productora de δ endotoxinas de forma bipiamidal de $5.70 \pm 0.21 \mu\text{m}$ con peso molecular de 159.96 kDa en concentración igual a 25 $\mu\text{g/mL}$ de biomasa y 5 UFC/mL de Biomasa (Rosas 2002; Palacios, 2015).

Producción y Obtención del complejo espora cristal de la cepa Bt-GM10

La activación de la cepa Bt-GM10 se llevó a cabo en agar nutritivo, posteriormente se tomaron varias asadas para inocular 100 mL de caldo triptosa y fosfato (CTP), el cultivo se incubó en agitación a 250 rpm a 30° C durante 16 h. Para la propagación y producción del complejo espora cristal, se inocularon 5 matraces Erlenmeyer con medio melaza a pH 7.2, depositando 1 mL de cultivo CTP en 100 mL de medio melaza. Los cultivos se incubaron en agitación a 250 rpm. a 30° C y monitoreados hasta observar mediante tinción simple y microscopía, un 80% de esporulación. En ese momento, la fermentación se detuvo y se ajustó el pH del medio a 7.0. La obtención del complejo espora cristal, se realizó por el método lactosa-acetona (Dulmage 1970). Para ello, el medio de cultivo se centrifugó a 10,000 rpm por 30 minutos, se descartó el sobrenadante y se midió la masa del precipitado. Para obtener el volumen total de solución de lactosa al 5% P/v necesario para la precipitación del complejo espora cristal, la masa del precipitado se multiplicó por un factor de 1.71 y al volumen obtenido se le sumó la masa del precipitado. Luego, el volumen total se multiplicó por un factor de 3.34 para obtener el volumen de acetona necesario para la precipitación. La masa del precipitado se colocó en un vaso de precipitados y se mezcló con los volúmenes de lactosa y acetona, la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos. Luego, la mezcla se filtró al vacío en un matraz Kitasato utilizando papel Whatman #1, el complejo espora cristal precipitado se lavó con 3 volúmenes de acetona y se dejó secar dentro de un desecador. Finalmente, el complejo espora cristal se molió finamente con ayuda de un mortero y se guardó en un frasco con tapa hermética hasta su empleo.

Bioensayo de toxicidad del complejo espora cristal de Bt-GM10 frente a *S. exigua* y *T. ni*

Al complejo espora cristal obtenido se le realizó una cuenta viable de esporas mediante la técnica de vertido en placa. Con el número de UFC y la concentración de proteína activa se calculó, la masa de complejo espora cristal necesaria para preparar una solución de concentración igual a 300 ng/cm² y a partir de ella, otra solución a una concentración de 30 ng/cm² (Palacios, 2015). Las dos soluciones fueron empleadas para determinar el % de mortalidad del complejo espora cristal de Bt-GM10 frente a *S. exigua* y *T. ni*. Para ello, en placas costar de 24 hoyos conteniendo dieta artificial de desarrollo Shorey (2 mL de dieta por hoyo) se incorporaron 40 µL de la dosis a evaluar, la placa se agitó de manera circular procurando que la dosis se extendiera por la superficie de la dieta y se dejó absorber. Enseguida, se transfirió una larva neonata por hoyo. Como control negativo se utilizó dieta sin complejo espora-cristal. Los bioensayos se realizaron por duplicado, un total de 24 larvas de *S. exigua* y *T. ni* para cada dosis y control negativo fueron empleados para determinar el % de mortalidad a los cinco días.

Determinación de CL₅₀ y TL₅₀ del complejo espora cristal de Bt-GM10 para *S. exigua* y *T. ni*

A partir de la solución de complejo espora-cristal de BtGM10 que presentó un 60 % de mortalidad se prepararon siete concentraciones sucesivas menores para determinar la CL₅₀ y TL₅₀ para *S. exigua* y *T. ni*. El bioensayo se realizó tal como se describió anteriormente. Para determinar la concentración letal media y el tiempo letal medio, el % de mortalidad se registró diariamente durante cinco días consecutivos. La prueba estadística Kolmogórov Smirnov, fue aplicada para conocer el tipo de distribución al que se ajustaban los datos obtenidos. Luego, se realizó un ANOVA simple de un factor y la prueba comparativa múltiple de medias, Tukey a un nivel de confianza del 95 % para establecer si hay diferencia en el % de mortalidad entre las diferentes concentraciones y así establecer la CL₅₀.

Elaboración de formulados asperjables base del complejo espora cristal Bt-GM10 al 10% y empleando como agente encapsulante el extracto polimérico de kéfir de agua solo y en combinación con otro biopolímero.

Con base en los resultados obtenidos en la evaluación de los biopolímeros como posibles agentes encapsulantes, se prepararon formulados asperjables empleando el complejo espora cristal de *B. thuringiensis* GM10 al 10%v P/p. Las soluciones elaboradas fueron disueltas en suficiente agua destilada y sometidas a secado por aspersión bajo las mismas condiciones a las que se elaboraron las microcápsulas.

7.7 Bioensayo de retención de la actividad tóxica de los formulados asperjables de *B. thuringiensis* GM-10 al 10% elaborados.

A los formulados desarrollados se les realizó una cuenta viable de esporas mediante la técnica de vertido en placa; Con el número de UFC y la concentración de proteína activa de la cepa Bt-GM10 se calculó, la masa de formulado necesaria a reconstituir en agua estéril para incorporarse a la dieta artificial de *S. exigua* y *T. ni* (Palacios, 2014). El bioensayo fue realizado siguiendo la metodología descrita para el extracto (complejo espora cristal) de BtGM10. El % de mortalidad fue registrado durante cinco días para determinar la CL₅₀ y TL₅₀ de los formulados. La prueba estadística Kolmogórov Smirnov, fue aplicada para conocer el tipo de distribución al que se ajustaban los datos obtenidos. Los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA, así como una prueba de Tukey con una $P \leq 0.05$, donde se comparó el % de mortalidad.

8. RESULTADOS

8.1 Producción de kéfir de agua.

En este estudio se trabajó con un consorcio microbiano conocido como tibicos presente en el área metropolitana de Monterrey N.L. La producción de biomasa de kéfir de agua, se llevó a cabo a partir de un medio de cultivo preparado con tibicos como inóculo al 10 % P/v peso húmedo previamente activados y condicionado con piloncillo al 10 % P/v como principal fuente de carbono. El bioproceso se realizó por 72 horas a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Posterior a este tiempo, los granos fueron recuperados, lavados con agua de grifo y drenados completamente, observándose como granos translúcidos de tonalidad amarilla, forma irregular y tamaño variable entre 5 y 10 mm. La masa neta promedio de los granos de tibico al final de cinco fermentaciones, así como la productividad y la estadística descriptiva se presenta en la tabla 6.

Tabla 6. Producción de kéfir de agua (peso húmedo).

Parámetro	n*	g/L \pm DS	CV
Biomasa neta	5	182.30 \pm 6.5	6.40
Productividad	5	2.53 \pm 0.09	3.51

n*= Numero de repeticiones; CV= coeficiente de variación; Fermentación a 27°C por 72 h.

8.2 Obtención del extracto polimérico extracelular del grano de Kéfir de agua.

Para la obtención del biopolímero extracelular en los granos de tibico, una masa de 100 gramos de kéfir de agua peso húmedo fue sometida a disolución completa con una solución diluida de ácido sulfúrico 0.1 eq/L, a 100°C durante 45-60 min. El polímero en el sobrenadante fue precipitado con etanol absoluto frío, previa eliminación de células y neutralizado con NaOH en solución. El precipitado fue aislado, secado a 48°C durante 72 horas y molido en un molino de perlas a 40 rpm durante 48 h. Al final del proceso se obtuvo un polvo de partícula uniforme color blanco nacarado. Además, se registró un promedio de 152.28 ± 10.32 gramos de extracto/Kg de tibico peso húmedo.

8.3 Caracterización fisicoquímica del extracto polimérico extracelular obtenido.

Para conocer la naturaleza química del extracto obtenido se realizaron pruebas bioquímicas coloridas para carbohidratos, azúcares reductores y proteínas. La prueba de Molisch fue empleada para detección de carbohidratos, mientras que el test de Benedict fue empleado para detectar la presencia de azúcares reductores liberados por el proceso de extracción ácida y la prueba de Biuret fue utilizada para la identificación de proteínas en el extracto. La prueba de Molisch fue positiva para carbohidratos en el extracto al formarse un anillo color morado en el tubo de reacción, en tanto que la prueba de Benedict y Biuret resultaron negativas para la presencia de azúcares reductores y proteínas, respectivamente.

Una vez identificada la naturaleza química del extracto obtenido del kéfir de agua, se realizó una batería bioquímica para carbohidratos con la finalidad de distinguir entre aldosas o cetosas, monosacáridos u oligosacáridos y pentosas presentes en el extracto. Para ello se aplicaron las pruebas de Selliwanoff, Barfoed y Bial, respectivamente. Además, se incluyeron las pruebas de Molisch y Lugol para carbohidratos y Amilosa. En la tabla 7, se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas coloreadas realizadas al extracto obtenido del kéfir de agua.

Tabla 7. Batería bioquímica cualitativa aplicada al extracto derivado del kéfir de agua.

Muestra / resultado	Molisch	Biuret	Benedict	Selliwanoff	Barfoed	Bial	Lugol
Extracto kéfir de agua	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Prueba positiva*	Anillo morado	Color violeta	Precipitado rojo ladrillo	Color cereza	Precipitado naranja < 1 min	Color verde	Color azul

*Observaciones esperadas para una muestra positiva

En ella se observa que, las pruebas de Barfoed, Benedict, Bial, Lugol y Selliwanoff ofrecieron resultados negativos para la presencia de monosacáridos, azúcares reductores, pentosas, almidón y cetosas en el extracto polimérico derivado del kéfir. Las pruebas

cualitativas sugieren la presencia de un oligosacárido o polisacárido compuesto de aldohexosas de estructura no parecida a la amilosa en el almidón.

Azúcares totales

Para conocer el contenido de carbohidratos totales en el extracto polimérico derivado del grano de Kéfir de agua, se aplicó el método espectrofotométrico de Antrona empleando soluciones de glucosa como estándar. El extracto obtenido presentó un contenido de 0.521 ± 0.50 gramos de carbohidrato por gramo.

Azúcares reductores

Si bien la prueba colorida de Benedict indicó la ausencia de carbohidratos reductores, se realizó una determinación cuantitativa mediante espectrofotometría por el método de DNS que involucra el uso de glucosa como estándar. Tras aplicar la metodología indicada, no se observó la reducción del Ácido dinitrosalicílico por la presencia de azúcares reductores en el extracto derivado del grano de kéfir de agua. El resultado fue reportado como “no detectado”.

Proteínas Totales.

Al extracto obtenido a partir del grano de túbico, se le cuantificó el contenido de proteína por el método de Bradford, empleando albumina sérica bovina como solución patrón. Al igual que la prueba cualitativa Biuret, la técnica espectrofotométrica no determinó contenido proteico.

Potencial de Hidrógeno.

El potencial de Hidrógeno del extracto obtenido fue medido de acuerdo al método 943.02 de la AOAC empleando un potenciómetro Corning, pH Meter 430 calibrado a dos puntos y con una eficiencia electromotriz de 0.98. Se reportó el promedio de cinco repeticiones. La solución del extracto al 10 % P/V , mostró un pH promedio de 7.14 ± 0.08 .

Contenido de humedad.

El % de humedad del biopolímero recuperado del grano de túbico se determinó por gravimetría empleando el método 925.10 de la AOAC. El ensayo se realizó por quintuplicado y se reportó el promedio. Se determinó un contenido de 2.50 ± 0.033 g agua retenida por cada 100g de extracto polimérico.

Contenido de cenizas.

El contenido total de minerales en el extracto polimérico conocido como “cenizas” fue medido mediante gravimetría aplicando el método 942.05 de la AOAC. Para ello, 2 gramos de muestra fueron colocados en crisoles previamente llevados a peso constante mufla a 600°C durante dos horas. Se reportó el promedio de cinco determinaciones. La prueba arrojó un contenido de minerales de 6.07 ± 0.10 g/100g de extracto.

Índice de Solubilidad en Agua e Índice de Absorción de agua.

Por otro lado, también se llevó a cabo la evaluación de algunos parámetros físicos para el extracto polimérico del kéfir de agua como son: el grado de solubilidad en agua y de absorción de agua. La evaluación se llevó a cabo mediante el método descrito por Anderson y colaboradores (1969) y la media de 5 ensayos fue reportada. Se observó que, el extracto obtenido bajo condiciones ácidas y neutralizado generó suspensiones al mezclarse en agua destilada, además se registró una solubilidad de 0.87 ± 0.01 g/g de extracto y que él mismo tiene la propiedad de absorber agua hasta en un 0.26 ± 0.01 g/g.

El resumen de la caracterización fisicoquímica para el extracto derivado del kéfir de agua, así como la estadística descriptiva, se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. Obtención y Caracterización fisicoquímica del extracto polimérico del grano de kéfir de agua.

Parámetro	n*	Resultado	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
% Rendimiento del extracto obtenido	6	152.80 g/Kg <i>Kef</i>	10.32	6.76
Azúcares totales	5	0.521 g/g	0.05	4.47
Azúcares reductores	5	ND*	-	-
Proteínas totales	5	ND*	-	-
pH	6	7.14	0.08	1.14
% de Humedad	5	2.50	0.03	1.32
% de Cenizas	5	6.07	0.10	1.63
Índice de Solubilidad en agua	5	0.87 g/g	0.01	1.41
Índice de Absorción de agua	5	0.26 g/g	0.01	4.27

n*= Numero de repeticiones; ND= No detectado.

8.4 Producción de microcápsulas mediante secado por aspersión

A partir del extracto polimérico del grano de kéfir de agua y en combinación con otros polímeros naturales como almidón modificado y pectina en proporción 1:1 se prepararon 250 mL de soluciones acuosas a una concentración de 0.10 g/mL y se sometieron al proceso de secado por aspersión bajo las siguientes condiciones de operación: temperatura de entrada de 160°C, temperatura de salida 100°C, flujo de aire igual a 0.64 m³/min, presión de aspersión de 0.10 MPa, velocidad de alimentación de 2.1 mL/min. Al final del proceso de secado se obtuvieron 19.61 g de microcapsulas de color blanco de apariencia granular a partir de la solución del extracto de kéfir mientras que, para la mezcla de extracto kéfir almidón modificado una masa de 18.18 g de microcapsulas color blanco amarillo fueron obtenidas y para la mezcla de extracto kéfir pectina se recuperaron 17.16 g de un sólido granuloso de color naranja. Todas las microcapsulas fueron obtenidas en un tiempo de aproximado de 120 minutos. El rendimiento promedio de microcapsulas obtenidas bajo las condiciones de secado descritas fue de 72.72 ± 4.92 % con una productividad de 0.153 ± 0.01 g/min.

En la figura 7 se presenta el porcentaje de rendimiento obtenido para las microcápsulas a base del extracto polimérico del grano de kéfir de agua y en combinación con otros biopolímeros, así como los biopolímeros control.

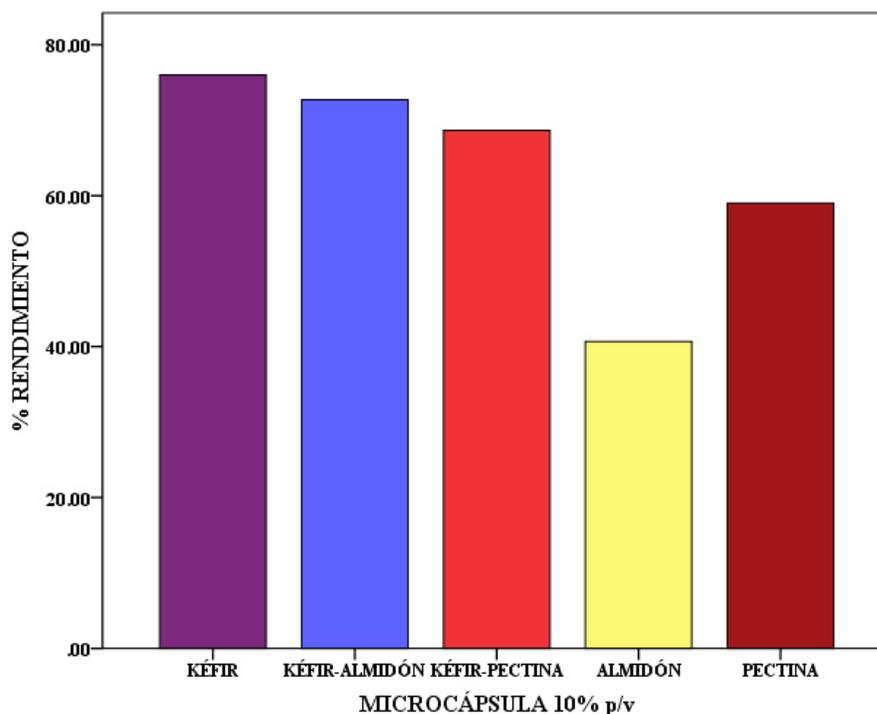


Figura 7. Obtención de microcapsulas a partir del extracto polimérico del kéfir de agua y otros biopolímeros mediante secado por aspersión: T.E 160°C, T.S 100°C, aire igual a 0.64 m³/min, presión de aspersión de 0.10 MPa, velocidad de alimentación de 2.1 mL/min.

8.5 Evaluación de las microcápsulas a base de extracto de kéfir solo o en combinación con otros biopolímeros como posibles agentes encapsulantes.

Para evaluar la suspensibilidad de las microcápsulas, se reconstituyeron en agua al 1% p/v, se homogenizaron y se dejaron reposar por ocho horas en una bureta de 125 mL, tomando muestras a diferentes horas, las cuales se colocaron en una estufa a 70°C por 24 horas. y se midió la masa precipitada. Se reportó el % de masa en suspendida con respecto al tiempo.

El % de masa de las microcápsulas en suspensión a las 8 horas se ubicó en un rango comprendido entre 93.69 ± 0.24 % para la microcápsulas a base de kéfir-pectina hasta 94.78 ± 0.021 % para las microcapsulas de almidón modificado Capsul®. La figura 8

muestra el comportamiento del % de la masa de las microcápsulas suspendidas con respecto al tiempo.

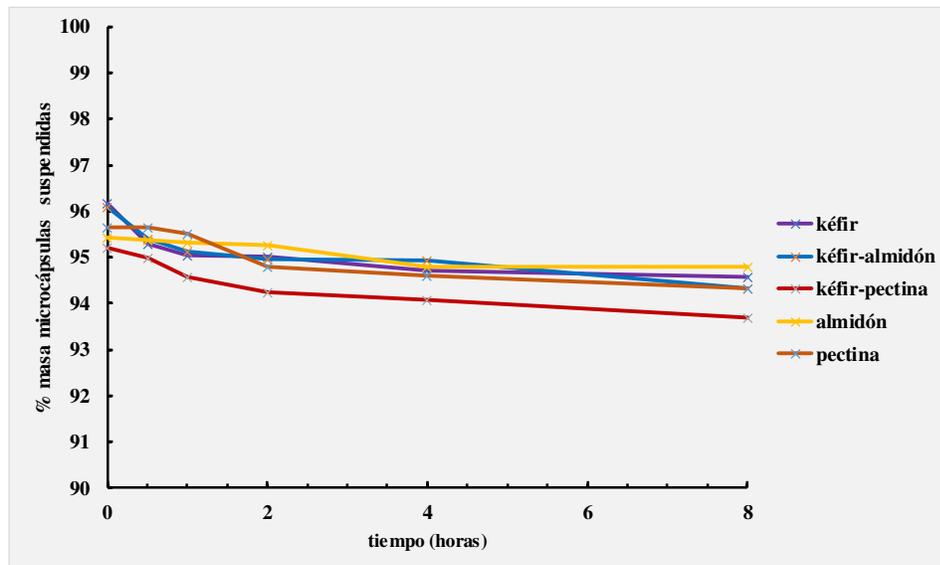


Figura 8. Susceptibilidad de las microcápsulas en porcentaje de masa suspendida respecto al tiempo.

Al aplicar un análisis estadístico para averiguar el tipo de distribución al que se ajustan los datos correspondientes al % de masa suspendida a las ocho horas, la prueba de Kolmogorov Smirnov informó que para las cinco muestras de microcápsulas analizadas, sus porcentajes de masa suspendida se ajustan a una distribución normal. Al comparar la masa suspendida promedio de las cinco muestras de microcápsulas aplicando un análisis de varianza unifactorial, la prueba mostró que, los cinco soportes poliméricos mantienen igual % de masa en suspensión tras ocho horas de ensayo ($F=3.866$, $p<0.05$), ver figura 9.

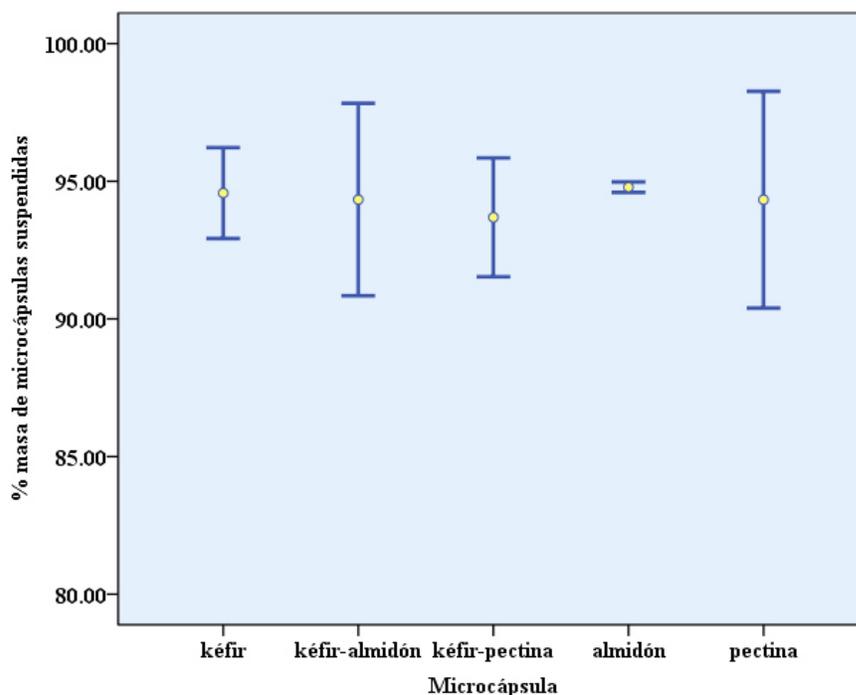


Figura 9. Suspensibilidad de las microcápsulas en porcentaje de masa suspendida tras ocho horas de reposo. ($F=3.866$, $p<0.05$).

La propiedad adherente de las microcápsulas se evaluó en láminas de vidrio para microscopía, empleando agua como solvente de lavado a flujo continuo, método descrito por McGuire y Shasha, 1992 con algunas modificaciones. El resultado se expresó como el % de masa perdida o lavada por el solvente. Los % de masa perdida, se ubicaron entre 83.64 para la microcapsulas de pectina y 98.90 para las microcapsulas de almidón modificado Capsul®. Los registros exhibieron una reproducibilidad aceptable como lo señalan las cifras de desviación estándar inferiores a 6.70 y coeficiente de variación menores a 3.82. Al aplicar un análisis estadístico para averiguar el tipo de distribución al que se ajustan los datos correspondientes al % de masa lavada por el solvente, la prueba de Kolmogorov Smirnov señaló que para las cinco muestras de microcápsulas analizadas, sus porcentajes de masa perdida mostraron una distribución normal. Al comparar la masa perdida promedio de las cinco muestras aplicando un análisis de varianza (ANOVA), la prueba mostró que todas las microcápsulas son estadísticamente diferentes entre sí ($F=20.828$, $p<0.05$). La prueba de Tukey reveló la existencia de 3 grupos, el primero integrado por las microcápsulas a base de pectina; el segundo formado por las microcapsulas compuestas de polímero de kéfir, kéfir-almidón y kéfir-pectina cuyas cifras

de masa perdida son estadísticamente similares, mientras que las microcapsulas restantes a base de almidón y kéfir-almidón formaron un grupo, dado que sus valores de % masa perdida son estadísticamente diferentes al resto (figura 10).

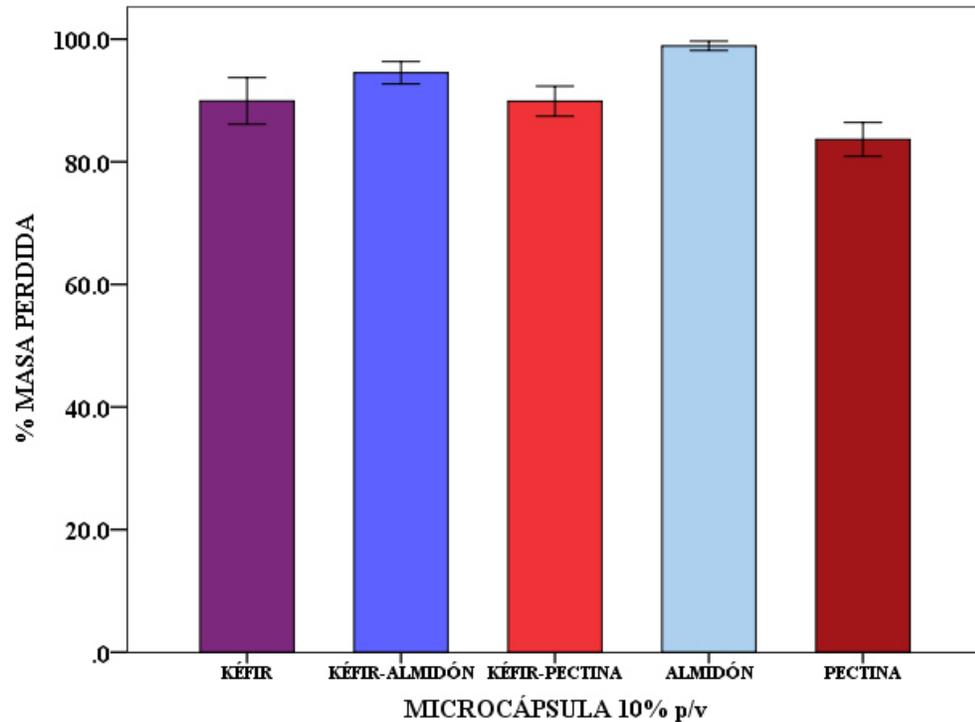


Figura 10. Evaluación de la propiedad adherente de las microcapsulas (% de masa perdida o lavada). (F=20.828, p<0.05).

La factibilidad de aspersión de las microcápsulas en solución al 10% p/v fue evaluada empleando un frasco aspersor de vidrio boro silicato (SIM®) con apertura de salida de 0.5 mm de diámetro y a una presión de 5 psi. El resultado se reportó como factible o no factible de aspersión. En este estudio, solo las soluciones de microcápsulas a base de extracto polimérico de kéfir de agua, la combinación 1:1 de kéfir-almidón, así como las microcápsulas de almidón, mostraron factibilidad de aspersión, al atravesar fácilmente las dimensiones de la boquilla del aspersor, tabla 9.

Tabla 9. Factibilidad de aspersión de las microcápsulas.

Microcápsulas a base de:	Resultado*
Extracto polimérico de Kéfir de agua.	Factible de asperjar
Extracto polimérico de Kéfir – Almidón.	Factible de asperjar
Extracto polimérico de Kéfir – Pectina.	No Factible de asperjar
Almidón	Factible de asperjar
Pectina	No Factible de asperjar

*aspersor SMI®, con boquilla de 0.5 mm, trabajando a 5 psi.

En cuanto a la preferencia alimentaria de *T. ni* y *S. exigua* por las microcápsulas a base Kéfir solo o en combinación con otros polímeros, se realizó un bioensayo mediante el método de dos alternativas. Un total de 15 combinaciones de microcápsulas fueron evaluadas y los registros obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico. La prueba de Kolmogorov Smirnov indicó que el número de larvas sobre las microcapsulas sigue una distribución normal para los dos bioensayos. El análisis de varianza unifactorial señaló que, existe una alta diferencia significativa en el No. de larvas promedio de *T.ni* sobre las microcápsulas ($F=17.489$, $p < 0.01$). La prueba de Tukey reveló la existencia de dos grupos, el primero formado por el tratamiento control estadísticamente diferente al resto mientras que, el segundo grupo lo conforman el resto de los tratamientos cuyos números de larvas promedio no son significativamente diferentes. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Preferencia alimentaria de *T. ni* sobre las microcápsulas a base de kéfir de agua solo o en combinación con otros biopolímeros.

Alimento	Media No. de Larvas \pm DS*	Preferencia alimentaria
CONTROL (Lechuga)	8.44 \pm 1.23 ^a	1°
Extracto de Kéfir de agua	4.80 \pm 2.02 ^b	2°
Extracto de Kéfir y Almidón	4.16 \pm 2.04 ^b	2°
Extracto de Kéfir y Pectina	3.96 \pm 1.97 ^b	2°
Pectina	4.48 \pm 2.38 ^b	2°
Almidón	4.24 \pm 2.37 ^b	2°

*n= 50 larvas, N= 750 larvas. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente, (P<0.05).

Para el bioensayo realizado con *S. exigua*, la prueba de ANOVA indicó una alta diferencia significativa en el No. de larvas promedio sobre las microcápsulas (F=4.374, p< 0.01). La prueba de Tuckey reveló la existencia de dos grupos, el primero integrado por los tratamientos Pectina, Kéfir-Pectina y Kéfir-Almidón cuyo número de larvas indica que no son estadísticamente diferentes entre sí, mientras que, el segundo grupo lo conforman los tratamientos Kéfir-Pectina, Kéfir-Almidón, Almidón, Kéfir y Control siendo todos estadísticamente diferentes a pectina, pero no entre sí. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Preferencia alimentaria de *S. exigua* sobre las microcápsulas a base de Kéfir de agua solo o en combinación con otros biopolímeros.

Alimento	Media No. de Larvas \pm DS*	Preferencia alimentaria
CONTROL (hoja de Maíz)	4.60 \pm 2.00 ^b	2°
Extracto de Kéfir de agua	4.20 \pm 1.00 ^b	2°
Extracto de Kéfir y Almidón	4.96 \pm 1.43 ^{a,b}	1°, 2°
Extracto de Kéfir y Pectina	5.32 \pm 1.63 ^{a,b}	1°, 2°
Pectina	6.08 \pm 1.75 ^a	1°, 2°
Almidón	4.72 \pm 1.40 ^b	2°

*n= 50 larvas, N= 750 larvas. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente, (P<0.05).

8.6 Elaboración de formulados asperjables a base de extracto de kéfir de agua solo o combinado con otros biopolímeros y complejo spora-cristal de *B. thuringiensis*.

Una vez evaluadas los soportes poliméricos (microcápsulas) a base de Kéfir de agua solo o combinado con otros biopolímeros, se eligió el extracto de Kéfir y la combinación de Kéfir-Almidón como posibles agentes encapsulantes para el desarrollo de formulados con *B. thuringiensis* como principio activo debido a que presentaron las mejores características de suspensibilidad, propiedad adherente, factibilidad de aspersion y preferencia alimentaria. Para ello, se determinó la actividad toxica frente a *T.ni* y *S. exigua* realizando primero un recuento de esporas del complejo spora-cristal de la cepa BtGM10 obtenido mediante fermentación en medio melaza y recuperado por el método de Dulmage (1970). A partir de ese dato y el perfil proteico (Palacios, 2014) se prepararon dosis a 30 y 300 ng de proteína de Bt/cm² de dieta artificial. Las dosis fueron evaluadas contra *T.ni* y *S. exigua* y se registró el número de larvas muertas a los 5 días, el resultado se expresó como % de mortalidad a la dosis más baja (Lambert y colaboradores 1995). Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Prueba preliminar de actividad tóxica del complejo espora cristal de *B. thuringiensis* contra dos lepidópteros.

Cepa	UFC \pm DS	Toxicidad (No larvas muertas \pm DS) *					
		<i>T. ni</i>			<i>S. exigua</i>		
		300 ^c	30 ^c	% M ^d	300 ^c	30 ^c	% M ^d
GM10 ^a	15 \pm 0.56 ^b	12.00 \pm 0.00	12.00 \pm 0.00	100	12.00 \pm 0.00	12.00 \pm 0.00	100

*n= 24, N= 144; ^a Cepa productora de δ endotoxinas con peso molecular de 159.96 kDa en concentración igual a 25 μ g/mL de biomasa; ^b UFC expresados 10⁹ esporas por mL; ^c 30 ng de proteína de BtGM10/cm²; ^d mortalidad expresada en la dosis de 30 ng de proteína de BtGM10/cm².

En ella se observa que, el bioensayo preliminar para la evaluación de la actividad tóxica de *B. thuringiensis* a una dosis baja de 30 ng /cm², la cepa GM10 presentó mortalidad del 100 % para los dos insectos blanco. Luego, se determinó la concentración letal media, así como el tiempo letal medio de la cepa GM10 para los dos lepidópteros empleados. Para el bioensayo se evaluaron siete dosis menores a 30 ng/cm² de dieta artificial durante cinco días y los resultados se expresaron como % de mortalidad. Los registros obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico. La prueba de Kolmogorov Smirnov indicó que el % de mortalidad sigue una distribución normal para los dos bioensayos. La prueba de varianza unifactorial señaló que, existe una alta diferencia significativa en el % mortalidad promedio de la cepa GM10 frente a *T. ni* (F=44.146, p< 0.01). La prueba de Tukey reveló la existencia de tres grupos, el primero formado por el tratamiento control estadísticamente diferente al resto mientras que, el segundo grupo lo conforman las dosis a 0.01, 0.03 y 0.1 ng/cm² cuyos % de mortalidad promedio no son significativamente diferentes, mientras que el tercer grupo lo integran los tratamientos de 0.1 a 30 ng de proteína/cm² de dieta artificial. En la figura 11, se observa que el 50 % de la población de *T. ni* muere a una concentración de 0.01 ng de proteína de BtGM10.

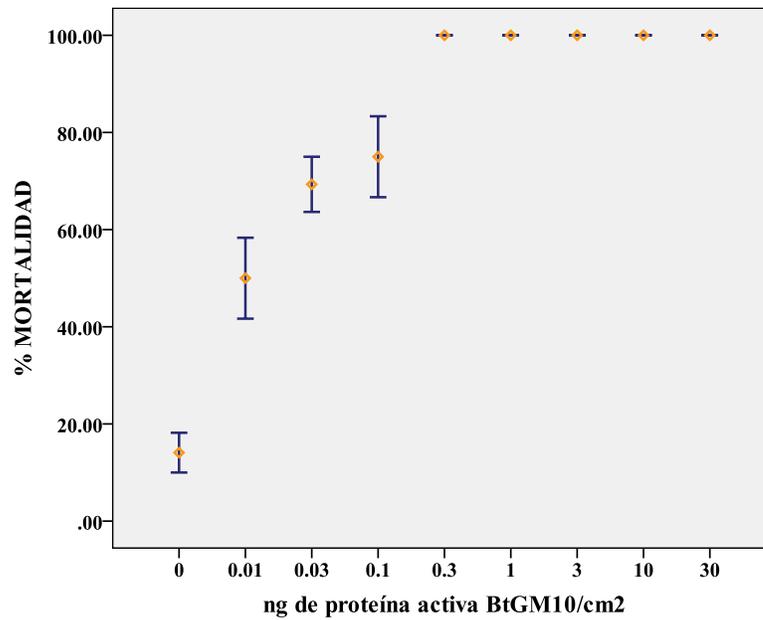


Figura 11. Bioensayo para determinar la CL₅₀ de la cepa BtGM10 frente a *T. ni* a las 120 horas. (F=44.146, p< 0.01), n= 24 larvas, N= 216 larvas.

Para el bioensayo realizado con *S. exigua*, la prueba de ANOVA señaló que existe una alta diferencia significativa en el % de mortalidad promedio generado por las dosis de BtGM10 (F= 34.557, p< 0.01). La prueba de Tukey reveló la existencia de cuatro grupos, el primero formado por los tratamientos menores a 0.1 ng de proteína/cm²; el segundo grupo lo conforman las dosis a 0.01, 0.03 y 0.1 ng/cm² cuyos % de mortalidad promedio no son significativamente diferentes, el tercer grupo lo integran los tratamientos de 0.1 y 0.3 ng de proteína/cm² y un cuarto grupo conformado por las dosis mayores a 0.3 ng de proteína/cm² de dieta artificial. En la figura 12, se observa que el 50 % de la población de *S. exigua* muere a una concentración de 0.10 ng de proteína de BtGM10.

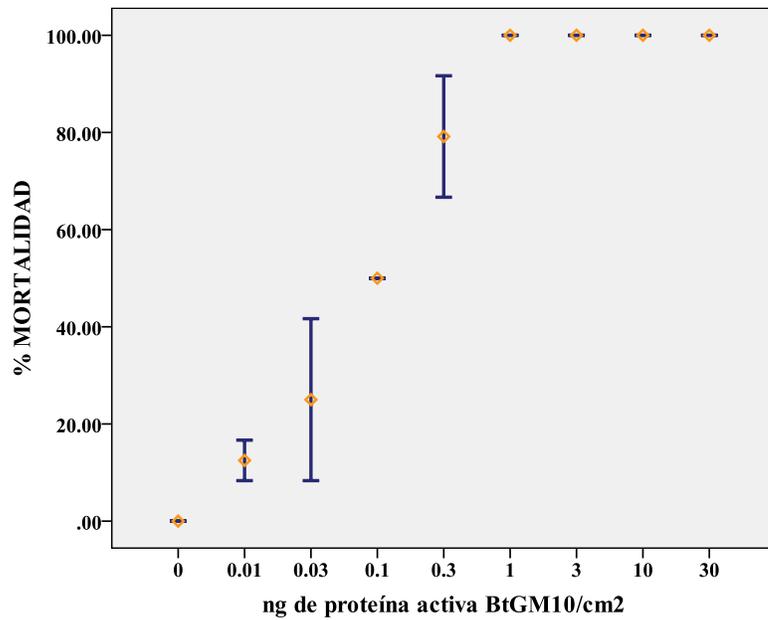


Figura 12. Bioensayo para determinar la CL₅₀ de la cepa BtGM10 frente a *S. exigua* a las 120 horas. (F=34.557, p< 0.01). n= 24 larvas, N= 216 larvas.

El tiempo letal medio en el cual cada uno de los insectos diana pereció se muestra en la figura 13. En ella se observa que, *S. exigua* mostró mayor sensibilidad al complejo espora cristal (0.10 ngBt/cm²) a las 48 horas, alcanzando el 50 % de mortalidad a las 96 horas. Con respecto a *T. ni* necesita a pesar que mostró ser sensible a concentraciones menores del complejo espora cristal de la cepa BTGM10 (0.01 ngBt/cm²) requirió mayor tiempo para que la población muriera en un 50 %.

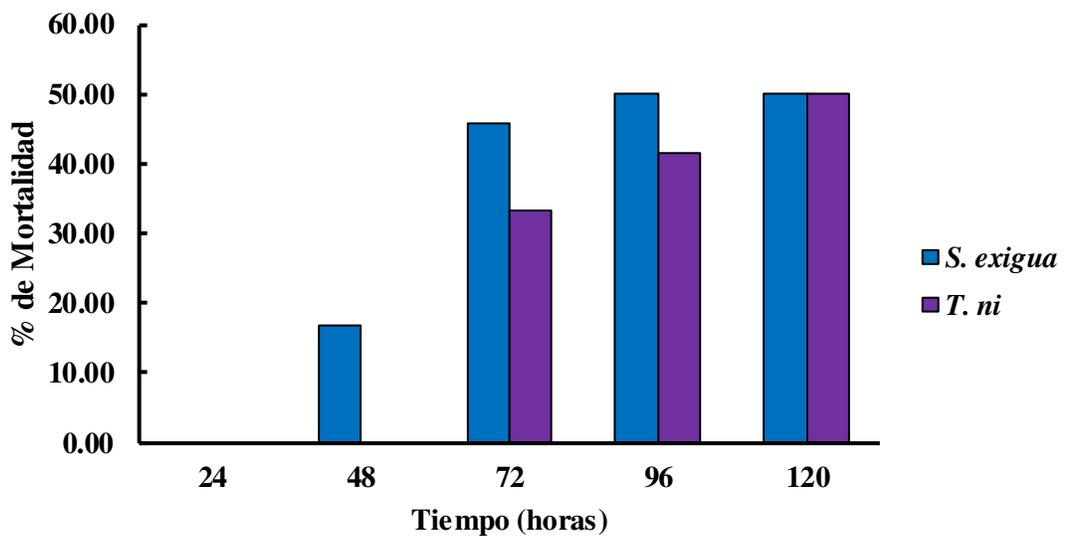


Figura 13. Tiempo letal medio para las CL₅₀ del complejo espora cristal de la cepa BtGM10.

Una vez conocida la actividad tóxica del principio activo Bt-GM10 se prepararon dos formulados empleando como agente encapsulante el extracto polimérico del grano de kéfir de agua solo y en combinación con almidón mediante secado por aspersión. Los formulados se prepararon a una concentración de 10 % p/p de principio activo bajo las siguientes condiciones de secado: temperatura de entrada de 160°C, temperatura de salida 100°C, flujo de aire igual a 0.64 m³/min, presión de aspersión de 0.10 MPa. Luego, para comprobar la viabilidad de la cepa BtGM10 después del proceso de formulación, se realizó una cuenta de esporas encontrando que, no hubo pérdida total de la viabilidad de la cepa BtGM10 durante el secado por aspersión. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Determinación de la viabilidad de la cepa BtGM10 en los formulados, después del proceso de secado por aspersión.

Agente encapsulante	Principio activo 10%	UFC± DE*
Extracto de Kéfir de agua	BtGM10	4.0 ± 2.5 ^a
Extracto de Kéfir de agua-Almidón Capsul® 1:1	BtGM10	3.0 ± 1.5 ^a

*n= 2. ^a expresado como 10⁸ esporas por gramo de formulado asperjable.

8.7 Bioensayo de retención de la actividad tóxica de los formulados asperjables de *B. thuringiensis* GM-10 al 10% elaborados.

Con los datos obtenidos de UFC y la concentración de proteína activa de la cepa Bt-GM10 se calculó, la masa de formulado necesaria a reconstituir en agua estéril para incorporarla a la dieta artificial de *S. exigua* y *T. ni* con la finalidad de evaluar la retención de la actividad tóxica. La CL50 y TL50 de los formulados fue determinada midiendo el % de mortalidad durante cinco días. Ambos formulados elaborados, presentaron actividad tóxica para cada uno de los insectos ensayados. El análisis estadístico aplicado: Kolmogorov Smirnov señaló que, el % de mortalidad de cada uno de los formulados sigue una distribución normal y que existe diferencia significativa entre los porcentajes de mortalidad de cada formulado. El análisis estadístico detallado de los registros obtenidos se muestra en la tabla 14 y 15.

Tabla 14. Porcentaje de mortalidad en *S. exigua* y *T. ni* tratadas con formulado asperjable a base de extracto de Kéfir y BtGM10 al 10%.

Formulado K-BtGM10 10% p/p (ng/Bt cm ²)	% de Mortalidad ± DS*	
	<i>S. exigua</i> ^A	<i>T. ni</i> ^B
0.01	0.00 ± 0.00 ^a	4.26 ± 5.89 ^a
0.03	0.00 ± 0.00 ^a	8.34 ± 11.78 ^a
0.1	12.50 ± 5.89 ^a	12.50 ± 5.89 ^a
0.3	41.66 ± 11.78^b	62.50 ± 5.89^b
1.0	70.83 ± 5.89^c	58.34 ± 11.78 ^b
3.0	75.00 ± 11.78 ^c	100 ± 0.00 ^c
10.0	100 ± 0.00 ^d	100 ± 0.00 ^c
30.0	100 ± 0.00 ^d	100 ± 0.00 ^c

* n= 24 larvas, N= 216 larvas. ^A(F= 95.63, p<0.01); ^B(F= 91.068, p<0.01). Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05).

Tabla 15. Porcentaje de mortalidad en *S. exigua* y *T. ni* tratadas con formulado asperjable a base de extracto de Kéfir/Almidón y BtGM10 al 10%.

Formulado KA- BtGM10 10% p/p (ng/Bt cm ²)	% de Mortalidad ± DS*	
	<i>S. exigua</i> ^A	<i>T. ni</i> ^B
0.01	8.33 ± 11.78 ^a	4.16 ± 5.89 ^a
0.03	12.50 ± 5.89 ^a	8.33 ± 0.00 ^{ab}
0.1	20.83 ± 5.89 ^a	8.34 ± 11.78 ^{ab}
0.3	20.83 ± 5.89 ^a	20.83 ± 5.89 ^{ab}
1.0	79.16 ± 5.89^b	29.16 ± 5.89 ^{bc}
3.0	95.84 ± 5.89 ^b	45.83 ± 5.89^c
10.0	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00 ^d
30.0	100 ± 0.00 ^b	100 ± 0.00 ^d

* n= 24 larvas, N= 216 larvas. ^A(F= 109.998, p<0.01); ^B(F= 100.459, p<0.01). Valores seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes (P<0.05).

El formulado a base de extracto polimérico de kéfir de agua (K-BtGM10) presentó una mortalidad del 50 % a concentraciones mayores a 0.3 y 1 ng/Bt cm² para *T. ni* y *S. exigua*, respectivamente; mientras que, el formulado a base de extracto polimérico de kéfir de agua en combinación con almidón (KA-BtGM10) sostuvo una mortalidad de más del 50 % de las larvas neonatas a concentraciones superiores a 1 ng/Bt cm² para *S. exigua* y entre 3 y 10 ng/Bt cm² para *T. ni*.

Con respecto al tiempo letal medio de cada uno de los formulados frente a los dos insectos diana se encontró que, a las 48 horas de exposición al formulado K-BtGM10, el 50 % de la población murió, no así para *T. ni*, quien presentó un tiempo letal medio por arriba de las 72 horas; En contraste, el formulado KA-BtGM10 permitió que más del 50 % de la población de *S. exigua* muriera al cabo de 24 horas, sin embargo, *T. ni* alcanzó un tiempo letal medio hacia las 120 horas de ensayo. En las figuras 14 y 15 se muestra el tiempo letal medio a las CL₅₀ de los formulados K-BtGM10 y KA-BtGM10, respectivamente.

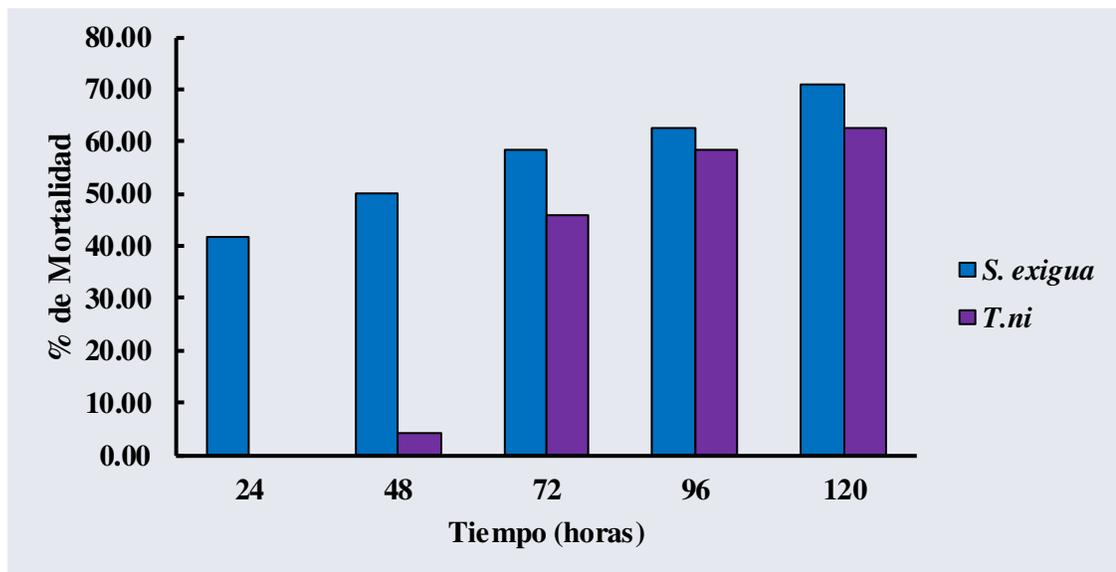


Figura 14. Tiempo letal medio para las CL₅₀ del formulado K-BtGM10.

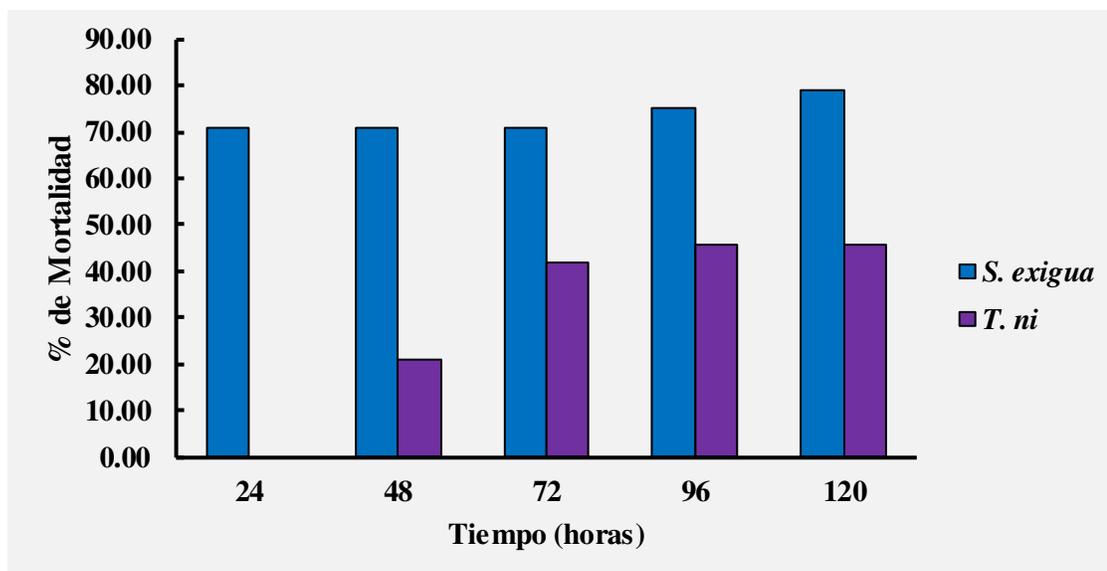


Figura 15. Tiempo letal medio para las CL_{50} del formulado KA-BtGM10.

9. DISCUSIÓN

En los últimos años se ha incrementado la obtención de exopolímeros de naturaleza carbohidrato a partir de procesos fermentativos con bacterias productoras de ácido láctico (BAL). Por su versátil aplicabilidad en la industria alimentaria, farmacéutica y biotecnológica, los exopolisacáridos (EPS) son ampliamente demandados para la producción de agentes espesantes, gelificantes, estabilizantes; cubiertas protectoras para fármacos y películas inteligentes, respectivamente. Un ejemplo de bioproceso recientemente introducido en la industria alimenticia, para la producción de EPS es el sustentado por el grano de Kéfir de leche (Zajšek et al. 2013). El grano de kéfir de leche, consiste en un consorcio microbiano formado principalmente por bacterias de los genero *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus spp.* y levaduras de los géneros: *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* y *Torulopsis*, que viven en asociación simbiótica en el seno de una matriz de naturaleza glucoproteica (Seher 2015). En él, se ha reportado a *Lacotobacillus kefiranofaciens* como principal organismo productor de un glucogalactano soluble llamado kefirian (Zajšek et al. 2013). Actualmente, el grano de kéfir de leche se ha logrado producir a partir de la fermentación de leche comercial pasteurizada e incluso, en algún momento de su desarrollo, pasó a cultivarse en agua azucarada, dando origen al Kéfir de agua o Kéfir de azúcar (Pidoux 1989) constituyendo un bioproceso aún más rentable. En esta investigación se trabajó con el grano de kéfir de agua para la recuperación de la matriz polimérica extracelular mediante hidrólisis ácida y precipitación etanólica y su consecuente evaluación como agente encapsulante (solo y en combinación con otros biopolímeros) del complejo espora cristal *B. thuringiensis*. Los reportes en la literatura señalan diferencias en la composición bioquímica y microbiológica entre el grano de kéfir de leche y su versión cultivable en agua azucarada. Se describe al grano de kéfir de agua o tibico como una asociación simbiótica entre bacterias del ácido láctico, bacterias acetogénicas y levaduras; embebidas en una matriz de polisacárido. En contraste con los granos de Kéfir de leche, los tibicos de agua, son de un color blanco-amarillo, casi translucidos, de aspecto gomoso y de forma irregular, semejante a pequeños trozos de coliflor con un diámetro variable entre 3 y 35 mm (Seher 2015). En cuanto a la composición microbiológica, *Lactobacillus hilgardii* ha sido reportado como el

organismo responsable de la producción de un $\alpha(1\rightarrow6)$ glucano insoluble (Pidoux 1989; Gulitz et al. 2011).

Estudios demuestran que, los granos de leche pueden emplear distintos carbohidratos como fuente de carbono bajo condiciones anaeróbicas. Sin embargo, la producción de biomasa está sujeta a las condiciones de cultivo. En el año 2013, Zajšek y su equipo de trabajo contrastaron la producción del grano de kéfir de leche, enriqueciendo el medio de cultivo a base de leche, con diferentes fuentes de carbono como son: glucosa, fructosa, lactosa y sacarosa, encontrando a las 24 horas de incubación a 25°C un incremento en la biomasa de hasta 12.36g/L con respecto al medio control (7.14 g/L) cuando se añadió lactosa, seguido de glucosa, sacarosa y fructosa con un rendimiento final de 11.35 g/L, 8.83 g/L y 7.62 g/L, respectivamente. En este estudio, se encontró un rendimiento neto de 182.30 ± 6.5 g/L peso húmedo en un medio condicionado con piloncillo al 10% p/v a 27°C tras 72 horas de incubación, valor muy superior a lo reportado incluso para las 24 horas de incubación. La Comisión Veracruzana de Comercialización Agropecuaria, 2008 informó que, el piloncillo es un producto nutricional completo constituido principalmente por sacarosa en un 72-78 % y en menor porcentaje, por monosacáridos como fructosa y glucosa (1.5-7%), además de proteínas, vitaminas y minerales.

En cuanto a la producción del polisacárido kefirian, principal componente de la matriz extracelular del grano de kéfir de leche, Zajšek y colaboradores reportaron un rendimiento entre 30 y 45 g/kg entre 0 y 70 h cuando los granos fueron cultivados en leche de vaca ultra pasteurizada a 30°C (Zajšek et al. 2011). En contraste, en este estudio se obtuvieron 152.80 ± 10.32 g/Kg de extracto sólido extracelular a partir de los tibicos cultivados en medio a base de piloncillo e incubados a 27°C. Cabe mencionar que los procesos de extracción difieren solo en la disolución del grano de kéfir y en la eliminación del contenido celular.

Con respecto a la naturaleza química del extracto obtenido, las pruebas bioquímicas coloridas Barfoed y Benedict indicaron la existencia de un polímero resiliente al proceso de extracción ácida al ofrecer resultados negativos a las pruebas. Mientas que, las prueba

de Molisch positiva, Selliwanoff negativa y Bial negativo señalan que, dicho extracto está formado por aldohexosas (Plummer, 1978). Numerosas investigaciones sustentan diferencias en la composición química y microbiológica, entre el grano de kéfir de agua y el kéfir lácteo. La Riviére y Kooiman, caracterizaron el homogenizado extracelular del grano de kéfir de leche peso seco y encontraron que el 23% de masa corresponde a un polisacárido soluble en agua fría, 13 % de proteínas, 17 % de moléculas de naturaleza no precisa y el resto de masa celular (La Riviére y Kooiman, 1967). Waldherr y colaboradores, realizaron un estudio sobre las enzimas implícitas en la formación de la matriz polimérica del grano de kéfir de agua a partir del cultivo de *Lactobacillus hilgardii* in vitro, la producción de EPS fue comparado y encontraron que, ambas sustancias mostraron una consistencia similar parecida a goma de jalea, de carácter hidrofóbica (Waldeherr et al. 2010). Los resultados de esta investigación son concordantes a lo descrito en la literatura en cuanto a composición química. Sin embargo, difieren en el carácter hidrofóbico, siendo el polímero obtenido bajo hidrólisis ácida, un 87 % más soluble en agua y con la propiedad de absorber agua hasta en un 26 % por lo que constituye un posible candidato como soporte inerte para el desarrollo de formulaciones en control biológico.

Diversas matrices poliméricas de naturaleza carbohidrato, proteína y poliésteres han sido empleados en el desarrollo de formulaciones asperjables mediante secado por aspersión. En cuanto a los agentes tipo carbohidrato, el almidón, la pectina, quitina, alginato, lignina y harina de maíz se han promocionado como excelentes soportes inertes, confiriéndole al principio activo protección, además de otorgar al formulado adherencia y palatabilidad, atributos que facilitan su efectividad (Dunkle y Shasha 1988; Bartelt et al. 1990; McGuire et al. 1996; Morales et al. 1998, 2000; Behle et al. 2003). Siendo el extracto polimérico del grano de kéfir de agua de naturaleza carbohidrato fue sometido solo y en combinación con otros biopolímeros al proceso de secado por aspersión obteniendo hasta un 72 ± 4.92 % de rendimiento de microcápsulas.

Cuando se evaluó el grado de suspensibilidad de las microcapsulas elaboradas a partir del extracto polimérico del kéfir solo y en combinación con almidón y pectina, se observó

que todas las microcápsulas se mantienen en más de un 90 % en suspensión durante un periodo de ocho horas, siendo las microcápsulas a base de kéfir-pectina (93.69 %) las que precipitaron más rápido, seguidas de las microcápsulas de kéfir-almidón y pectina (94.33%). En tanto que, las microcápsulas a base de extracto de kéfir y las microcapsulas de almidón, presentaron los mayores porcentajes de masa suspendida con un 94.57 % y 94.78 %. Los resultados señalan que las microcápsulas a base del extracto de kéfir de agua son más ligeras, indicando que el polímero es de un peso molecular menor al de la pectina. Sin embargo, quizá la estructura y forma del polímero tenga un papel importante en la suspensión.

Con respecto a la propiedad adherente de las microcápsulas a base del extracto polisacárido del kéfir de agua solo y en combinación con almidón o pectina presentaron un 10 % de adherencia a la superficie de un portaobjetos, en tanto que las microcápsulas de pectina mostraron un 16 % de masa adherida y las microcapsulas de almidón fueron casi totalmente lavadas por el solvente agua. McGuire y Shasha reportaron que, los formulados granulados a base de almidón no presentan adherencia en portaobjetos; Sin embargo, el empleo de solventes orgánicos como el 2 propanol, incrementa la adherencia y la resistencia al arrastre por agua (McGuire y Shasha 1992).

Cuando se evaluó la factibilidad de aspersion de las microcapsulas reconstituidas en agua, se observó que solo las microcápsulas a base de Kéfir, Kéfir-almidón y Almidón atravesaron sin dificultad la boquilla de 0.5 mm de diámetro de un aspersor marca SMI a una presión de 5 psi. Los resultados concuerdan a los reportados por Muñiz y colaboradores para formulados desarrollados a base de *B. thuringiensis* y polímeros naturales como almidón y gelatina a diferentes proporciones (Muñiz et al. 2007) y los observados por Palacios para formulados desarrollados a base de almidón modificado, gomas y el complejo espora cristal de *B. thuringiensis* (Palacios 2015).

Al analizar la preferencia alimentaria de *T. ni* y *S. exigua* por los soportes a base de extracto de kéfir solo, o en combinación con Almidón o Pectina en proporción 1:1, se observó que todos presentan igual nivel de preferencia lo que sugiere que el extracto de

kéfir de agua posee propiedad fagoestimulante igual a los biopolímeros vegetales, almidón y pectina. En el caso de *T. ni*, la lechuga presentó mayor preferencia que los soportes (8.44 ± 1.23 larvas). Sin embargo, como segunda opción prefiere de igual manera el exopolisacárido de kéfir de agua solo o en combinación con otros carbohidratos. En el año 2009, Rosas y colaboradores evaluaron el efecto de la matriz encapsulante en la palatabilidad de formulaciones a base de *B. thuringiensis* empleando *S. exigua* como insecto diana, los resultados señalaron que los formulados a base de biopolímeros de naturaleza carbohidrato como almidón modificado y mazorca de maíz seca, son del agrado de las larvas neonatas de *S. exigua*.

S. exigua y *T. ni* son lepidópteros noctuidos, cuyas larvas constituyen un serio problema para los horticultores, los daños por estas plagas comprenden un sinnúmero de cultivos agrícolas. Sin embargo, uno de los principales enemigos naturales ampliamente utilizado en el control biológico de estas larvas de lepidópteros es *B. Thuringiensis* (Ruiz et al. 2013).

B. thuringiensis GM10 se caracteriza por ser cepa productora de δ endotoxinas de forma bipiamidal de $5.70 \pm 0.21 \mu\text{m}$ con peso molecular de 159.96 kDa, ha presentado actividad toxica contra los lepidópteros *Diatraea saccharalis* e *Hyphantria cunea* a nivel laboratorio (De Luna 2002; Rosas 2002; Palacios, 2015). En este ensayo, se observó que el complejo espora cristal de la cepa BtGM10 presentó actividad tóxica con un 100 % de mortalidad a concentraciones superiores a 30 ng de BtGM10/cm² de dieta artificial contra larvas lepidópteras de *S. exigua* y *T. ni*, determinándose una CL50 de 0.01 ng de BtGM10/cm² para *T. ni* y de 0.10 ng de BtGM10/cm² para *S. exigua* y en un tiempo letal promedio de 120 horas y 96 horas, respectivamente. En contraste, Palacios reportó una CL50 para el complejo espora cristal BtGM10 menor a los observados en este estudio (0.007 ng/cm²) contra larvas del lepidóptero *Hyphantria cunea* con un TL50 de 80 horas (Palacios 2015).

Teniendo caracterizada la actividad toxica de cepa de *Bacillus thuringiensis* GM10 así como la evaluación del extracto polimerico del kéfir de agua solo y en combinación con otros biopolímeros, se decidió elaborar formulados asperjables al 10 % del principio

activo, en donde el agente encapsulante fue el extracto de kéfir de agua solo y en combinación con almidón modificado.

En el secado por aspersión, el ingrediente activo diluido en el agente encapsulante es atomizado y secado con aire caliente en fracción de segundos. Sin embargo, los materiales termosensibles se ven favorecidos ya que son protegidos de las altas temperaturas por enfriamiento evaporativo inmediato. Aun así, la viabilidad del principio activo y la calidad del formulado depende de las condiciones físicas de secado, así como de la naturaleza química del agente acarreador (Martínez, 2009). Al comprobar la viabilidad del principio activo BtGM10 después del proceso de secado por aspersión se realizó una cuenta de esporas de los formulados elaborados encontrándose en promedio 3.5×10^8 UFC, lo que representa un 23 % de esporas viables, a saber, si el resto de esporas quedó protegido por el material encapsulante o pereció durante el proceso. En el año 2005, Alamilla y colaboradores observaron los cambios morfológicos y la calidad de microcápsulas obtenidas durante el secado por aspersión concluyendo que, las microcapsulas elaboradas a base dextrinas a temperaturas intermedias de secado ($170^\circ/145^\circ$) son completas, menos frágiles y de superficies lisas que las obtenidas a temperaturas altas; En contraste, las microcápsulas obtenidas a temperaturas bajas ($110^\circ/70^\circ$) se presentan como cuerpos rugosos y colapsados (Alamilla et al. 2005); lo que podría repercutir en la no producción de formulados o en la mala calidad de estos, al exponer en un tiempo relativamente corto al principio activo. En este estudio, las temperaturas de secado fueron $160^\circ/100^\circ$, acordes al proveedor según la naturaleza química del agente encapsulante. En el año 2002, Rosas elaboró formulados asperjables a base de gelatina como agente encapsulante y *B. thuringiensis* como principio activo a temperaturas intermedias bajas ($145^\circ/90^\circ$), observándose al microscopio de barrido electrónico como gránulos ligeramente enjutados de tamaño variable entre 15 a 45 μm similares a los descritos por Alamilla y colaboradores (2005) para microcapsulas obtenidas a temperaturas bajas.

Por otra parte, Tamez y su grupo de trabajo, reportaron una mayor protección al principio activo con el formulado a base de harina de maíz nixtamalizada y otros aditivos cuando la encapsulación se realizó mediante secado por aspersión en contraste con la elaborada de manera granular (Tamez et al. 1999).

Con respecto a la retención de la actividad tóxica de los formulados K-BtGM10 y KA-BtGM10 elaborados, conservaron su actividad tóxica para los dos lepidópteros ensayados. La actividad insecticida (CL50) se mantuvo a concentraciones de proteína activa de BtGM10 superiores a 0.30 ng para *S. exigua* y *T. ni* cuando se ensayó el formulado K-BtGM10 y de 1.0 ng y 3.0 ng de proteína activa para *S. exigua* y *T. ni*, respectivamente, cuando se utilizó el formulado KA-BtGM10. Esto debido al ajuste de las dosis al preparar los formulados a base de BtGM10 al 10 %. Sin embargo, fue notable que el tiempo letal medio del principio activo BtGM10 en formulación disminuyó para los dos insectos blanco. Morales y colaboradores sustentan que, la palatabilidad del insecto por los formulados es un factor importante cuando se emplean biopolímeros como agentes encapsulantes de entomopatógenos (Morales et al. 1998). En este caso inferimos que, la naturaleza carbohidrato del extracto de kéfir de agua solo y en combinación con almidón contribuyeron al consumo de la dieta artificial Shorey en un menor tiempo y con ello promover la ingestión de la δ endotoxina de *B. thuringiensis*.

Por otro lado, la estabilidad de los formulados esta en función de los diferentes soportes, aditivos, métodos y condiciones de encapsulación. (Alamilla, 2005; Yáñez, et al. 2005; Chen et al. 2013; Muñoz et al. 2012; Vemmer y Patel 2013). A pesar de que, los polímeros empleado en este estudio son polisacáridos, tienen estructura química y forma diferente de tal manera que, formulados a base de una mezcla de agentes encapsulantes pueden tener mayor palatabilidad y una mayor estabilidad debido a la compleja pared de la microcápsula que puede tener lugar al momento de la evaporación del agua durante el secado por aspersión.

McGuire y su grupo de trabajo realizaron un formulado a base de *B. thuringiensis* empleando almidón como agente acarreador observando mayor residualidad tóxica aún en temporadas de lluvia (McGuire 1994).

Por otro lado, Palacios elaboró formulados con *B. thuringiensis* empleando como soporte una mezcla de almidón modificado y gelatina además de gomas de naturaleza carbohidrato como adherentes encontrando que, los formulados con goma xantana, aumentan su

persistencia en invernadero aun en presencia de lluvia, mientras que los formulados con goma guar presentaron mayor actividad toxica al cabo de 24 horas al ser del agrado de *H. cunea*. (Palacios, 2015).

10. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados en el presente trabajo se concluye que:

1. El rendimiento promedio de producción del grano de kéfir de agua es de 182.30 ± 6.5 g L⁻¹ con una productividad de 2.53 ± 0.09 g L⁻¹ h⁻¹ en medio condicionado con piloncillo al 10% p/v a 27°C tras 72 h. de incubación.
2. La hidrólisis ácida y precipitación alcohólica permitieron la obtención de 152.80 ± 10.32 g Kg⁻¹ de extracto extracelular sólido de color blanco nacarado que consiste principalmente de un polímero de naturaleza carbohidrato, no asociado a proteínas ni lípidos, de carácter hidrofílico y que incluye moléculas de bajo peso molecular de identidad no precisa.
3. Fue posible obtener microcápsulas a base del extracto polimérico de kéfir de agua solo y en combinación con almidón y pectina (1:1) al 10 % mediante secado por aspersión con un rendimiento promedio de 72.72 ± 4.92 %. Al evaluar las microcápsulas elaboradas como posibles agentes encapsulantes se encontró que: la suspensibilidad de todas las microcápsulas se mantuvo por arriba del 90 % por un periodo de ocho horas; no hay diferencia significativa en el % de masa adherida a portaobjeto; solo las microcápsulas a base de extracto polimérico de kéfir de agua solo y en combinación con almidón al 10%, presentaron factibilidad de aspersión. Además, las microcapsulas a base de kéfir de agua solo o en combinación con los otros biopolimeros, presentan la misma preferencia alimentaria para *S. exigua* y *T. ni*.
4. Se elaboraron dos formulados a base del complejo espora cristal de *B. thuringiensis* GM10 al 10 % empleando como agente encapsulante el exopolisacárido del kéfir de agua solo y en combinación con almidón modificado en proporción 1:1 mediante secado por aspersión encontrando que, ambos formulados fueron del agrado de *S. exigua* y *T. ni* y mantuvieron la actividad toxica contra las larvas neonatas de ambos lepidópteros.

5. El exopolisacárido del kéfir de agua solo o en combinación con otros biopolímeros constituye una alternativa como agente encapsulante para el desarrollo de formulaciones con entomopatógenos para el control efectivo de plagas.

11. PERSPECTIVAS

1. Incluir un método de purificación del extracto polimérico extracelular a fin de eliminar moléculas y iones de bajo peso molecular.
2. Conocer la composición de carbohidratos y peso molecular del extracto polimérico extracelular obtenido.
3. Caracterizar mediante microscopia electrónica las microcápsulas a base de extracto de kéfir de agua desarrolladas a las condiciones de secado.
4. Medir la propiedad adherente de las microcapsulas obtenidas en un modelo *in vivo*.
5. Evaluar la adherencia, suspensibilidad, factibilidad de aspersion y preferencia alimenticia de los formulados dearrollados.
6. Desarrollar y evaluar formulados a base de exopolisacárido de kéfir de agua solo o en combinación con otros biopolímeros que incluyan aditivos y sean para insectos específicos.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alamilla BL, Chanona PJ, Jiménez AA and Gutiérrez LG. 2005. Description of morphological changes of particles along spray drying. *Journal of Food Engineering* 67: 179–184.
2. Aizawa K. 2001. Shigetane Ishiwata: His discovery of sotto-kin (*Bacillus thuringiensis*) in 1901 and subsequent investigations in Japan. Proceedings of a Centennial Symposium Commemorating Ishiwata's Discovery of *Bacillus thuringiensis*. Kurume, Japan. pp. 1-14.
3. Anderson R, Conway HF, Pheiser VF and Griffin EL. 1969. Gelatinisation of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today*. 14: 4-12.
4. Aronson A., Beckman W and Dunn P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50: 1-24.
5. Association of Official Analytical Chemists. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International.
6. Barberá C. 1976. Pesticidas Agrícolas. Ediciones Omega S.A., 9 - 46.
7. Bartelt RJ, McGuire MR and Black OA. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Entomol.* 19 182-189.
8. Behle RW, Tamez GP and McGuire MR. 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcipera* nucleopolyhedrosisvirus (AsMNPV) in spray-dried lignin based formulations. *J. Econ. Entomol.* 96: 1066-1075.

9. Caballero P. y Ferré J. 2001. Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. Phytoma: España, pp. 1 – 318.
10. Caballero P. y Iriarte J. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*, en Bioinsecticidad: Fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. Phytoma: España, pp. 16-44.
11. Chen Kun-Nan, Chen Chao-Ying, Lin Yu-Chun and Chen Ming-Jun. 2013. Formulation of a Novel Antagonistic Bacterium Based Biopesticide for Fungal Disease Control Using Microencapsulation Techniques. Journal of Agricultural Science. 5(3):153-163.
12. Comisión Veracruzana de comercialización agropecuaria. 2008. Monografía del piloncillo. Gobierno del estado de Veracruz. México. pp. 1-11.
13. Couch TL. 1978. Formulations of Microbial Insecticides. Conventional Formulations. Misc. Publ. Entomol. Soc. A.m. 10 (5): 3-10.
14. De Luna SE. 2002. Desarrollo de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* a partir de gelatina y/o pectina y evaluación tóxica contra el barrenador del tallo de la caña de azúcar "*Diatraea saccharalis fabricius*". Tesis de Maestría. UANL.
15. De Oliveira Leite AM, Lemos Miguel MA, Peixoto RS, Rosado AS, Silva JT and Flosi Paschoalin VM. 2013. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: A natural probiotic beverage. Brazilian Journal of Microbiology. 44: 341–349.
16. Dulmage HT, Correa JA and Martinez AJ. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 15:15-20.

17. Dunkle HL and Shasha BS. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol* 17: 120-126.
18. Evans J. 2004. Shifting Perceptions on Biopesticides. PJB Publications. pp. 18-21.
19. Frankenhuyzen KV. 1993. The Challenge of *Bacillus thuringiensis* . in: “*Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice”. Entwistle P.F. et. al. (eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto. Singapore.: 1 - 23.
20. Galán WJL, Pereira AB y Luna OHA. 2006. Bacterias Entomopatógenas. En: *Biotecnología financiera aplicada a bioplaguicidas*, García C and Medrano R (eds). México, pp. 43-63.
21. Gan-Mor S. and Matthews. 2003. Recent Developments in Sprayers for Applications of Biopesticides: an Overview. *Biosystems Engineering*. 84(2): 119-125.
22. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A. and Saurel R. 2007. Applications of Spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An Overview. *Food Research International*. 40: 1107-1121.
23. Gillespie RL, McGuire MR and Shasha BS. 1994. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (*Lepidoptera:Pyralidae*). *J. Econ. Entomol*. 87: 452-457.
24. Gulitz A, Stadie J, Wenning M, Ehrmanna MA and Vogel RF. 2011. The microbial diversity of water kéfir. *International Journal of Food Microbiology*. 151: 284–288.

25. Gutiérrez A, Robles A, Santillán C, Ortiz M y Cambero OJ. 2013. Control Biológico como herramienta sustentable En el manejo de plagas y su uso en el Estado de Nayarit, México. *Revista Bio ciencias*. 2(3):102-112.
26. Hall FR and Barry JW. 1995. Biorational Pest Control Agents. Formulation and Delivery. American Chemical Society: Washington, D.C. pp. 1- 305.
27. La Rivière J and Kooiman P. 1967. Kefiran, a Novel Polisaccharide produced in the Kefir Grains by *Lactobacillus brevis*. *Archiv für Mikrobiologie*, 59: 269–278.
28. Leng P, Zhang Z, Pan G and Zhao M. 2011. Applications and developments trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*. 10(86): 19864-19873.
29. Martínez LA. 2009. Dimensionamiento y simulación de un secador por aspersion de nivel piloto. Tesis de Maestría. IPN.
30. Marsh AJ, O’Sullivan O, Hill C, Ross RP, Cotter PD. 2013. Sequencing-Based Analysis of the Bacterial and Fungal Composition of Kefir Grains and Milks from Multiple Sources. *PLoS ONE* 8(7): 1-11.
31. McGuire MR and Shasha BS. 1992. Adherent Starch Granules for Encapsulation of Insect Control Agents. *J. Econ. Entomol.* 85(4): 1425-1433.
32. McGuire MR, Shasha BS, Eastman CE, Oloumi-Sadeghi H. 1996. Starch and four-based sprayable formulations: effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89: 863-869.
33. Menlinck R. 2011. Biopesticides: performance, promotion and politics. In: *The rise of biopesticides*, R. Milnick (ed). Valent BioSciences Corporation, pp. 4 – 7.

34. Morales RLH, McGuire MR and Galán WLJ. 1998. Utilization of several biopolymers of granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 91: 1109-1113.
35. Morales RLH, McGuire MR, Galán WLJ and Castro FR. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. Southwest. Entomol. 25: 59-67.
36. Muñoz Celaya AL, Ortiz-García M, Vernon Carter EJ, Jauregui-Rincón J, Galindo E, Serrano-Carreón L. 2012. Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. Carbohydrate Polymers. 88(4): 1141-1148.
37. Muñiz VH, Morales RH, Palacios CL, Quintero ZI, Salcedo MS y Galán WLJ. 2007. Recuperación del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* utilizando polímeros naturales. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Michoacán, México, junio 25 -29.
38. Nava PE, García GC, Camacho BJR y Vázquez ME. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. Revista Ra Ximhai. 8(3): 17-29.
39. Navon A. 2000. *Bacillus thuringiensis* Insecticides in crop protection reality and prospects. Crop Protection 19: 669-676.
40. Palacios Cortez LL 2015. Desarrollo y Evaluación de Formulados Asperjables de *Bacillus thuringiensis* para el Control del Gusano de Bolsa del Nogal *Hyphantria cunea* (Drury). Tesis Doctorado FCB-UANL.

41. Pidoux M. 1989. The microbial flora of sugary kefir grain (the gingerbeer plant): biosynthesis of the grain from *Lactobacillus hilgardii* producing a polysaccharide gel. MIRCEN Journal. 5: 223–238.
42. Plummer, D.T. 1978. An Introduction to Practical Biochemistry. Inglaterra. McGraw-Hill Book Company.
43. Rivero NE. 2012. Evaluación de los efectos en la salud por la exposición a plaguicidas en niños de San Luis Potosí. Tesis Doctorado Facultad de Medicina-UASLP.
44. Rosas GNM. 2002. Elaboración de formulados de *Bacillus thuringiensis* var. *kursiaki* y determinación de la actividad tóxica contra larvas de *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) en laboratorio y campo. Tesis doctoral, UANL.
45. Rosas GN y De Luna E. 2006. Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. Rev. Int. Contam. Ambient. 22(3): 135-142.
46. Rosas GN. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. Rev. Colomb. Biotecnol, 10(1): 49 -63.
47. Rosas GNM. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. Rec. Pat. Biotech. 3: 28-36.
48. Ruiz JA, Bravo E, Ramírez G, Báez AD, Álvarez M, Ramos JL, Nava U y Byerly KF. 2013. Plagas de importancia económica en México: Aspectos de su biología y ecología. Prometeo Editores: Guadalajara, pp. 1- 5; 347 y 384.

49. SAGARPA. 2015. Atlas Agroalimentario. Servicios de Información Agroalimentaria y Pesquera: México, pp.10 – 15.
50. Sawicka EM and Couch TL. 1983. Formulations of entomopathogens, pesticide formulations and application systems. In: Kaneko T and Akesson N. (eds). Third Symposium, ASTM STP, American Society for Testing and Materials, Philadelphia: 5 - 11.
51. Seher A. 2015. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. *CyTA -Journal of Food*. 13(3): 340-345.
52. Stadie J, Gulitz A, Ehrmanna MA and Vogel RF. 2013. Metabolic activity and symbiotic interactions of lactic acid bacteria and yeasts isolated from water kefir. *Food Microbiology*. 35:92-98.
53. Tamez GP, McGuire MR, Medrano RH., Galán WL, Shasha, BS and Vega FE. 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89: 1424-1430.
54. Tamez GP, Castro FR, Medrano RH, McGuire MR, Galán WLJ and Luna OHA. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* for activity against noctuid larvae using granular formulations (*Lepidoptera*). *J. Econ. Entomol.* 91: 86-93.
55. Tamez GP, García GC, Medrano RH, Galán WLJ and Sandoval CC. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist*. 24: 37-48.
56. Tamez GP, McGuire MR, Behle RW, Shasha BS and Galán WLJ. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93: 219-225.

57. Tratnik, L., Bozanic, R., Herceg, Z., and Drgalic, I. 2006. The quality of plain and supplemented kefir from goat's and cow's milk. *International Journal of Dairy Technology*. 59: 40–46.
58. Vemmer M. and Patel AV. 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control* 67: 380-389.
59. Waldherr FW, Doll VM, Meißner, D and Vogel RF. 2010. Identification and characterization of a glucan-producing enzyme from *Lactobacillus hilgardii* TMW 1.828 involved granule formation of water kefir. *Food Microbiology* 27(5): 672–678.
60. Yáñez FJ, Salazar JMA, Chaires ML, Jiménez HJ, Márquez RM y Ramos RE. 2005. Aplicaciones biotecnológicas de la micro encapsulación. *Mundo alimentario*, pp. 24-29.
61. Zajšek K, Kolar M and Goršek A. 2011. Characterisation of the exopolysaccharide kefirin produced by lactic acid bacteria entrapped within natural kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*. 64(4): 544–548.
62. Zajšek K, Goršek A. and Kolar M. 2013. Cultivating conditions effects on kefirin production by the mixed culture of lactic acid bacteria imbedded within kefir grains. *Food Chemistry*. 139: 970–977.

13. RESUMEN BIOGRÁFICO

Mario Alberto Hernández Torres

Candidato para el Grado de

Maestro en Ciencias con orientación en Microbiología

Tesis: CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE UN POLÍMERO OBTENIDO A PARTIR DE TIBICOS (KÉFIR DE AGUA) Y SU EVALUACIÓN COMO AGENTE ENCAPSULANTE DE *Bacillus thuringiensis*

Campo de Estudio: Biotecnología

Datos Personales: nacido en San Nicolás de los Garza, Nuevo León, hijo de Roberto Hernández Valero y María Elena Torres Zapata.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, como Técnico Laboratorista Clínico en el año 2003, Primer lugar de generación de TLC 2000-2003; Grado obtenido de Químico Bacteriólogo Parasitólogo en el año 2012; Primer Lugar de Generación de la licenciatura, promoción 2008-2012; Mérito Académico 2011-2012.

Experiencia Profesional: Docente en la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL desde el año 2014 a la actualidad. Investigador en el Departamento de Química.