

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**NANOFORMULADOS DE EXTRACTOS DE *Chlorella vulgaris*
EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU APLICACIÓN AGRÍCOLA
EN EL CONTROL DE *Fusarium sp***

POR

Q.B.P. MIGUEL EDUARDO LÓPEZ ARELLANES

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN MANEJO Y APROVECHAMIENTO
INTEGRAL DE RECURSOS BIÓTICOS**

2022



NANOFORMULADOS DE EXTRACTOS
DE *Chlorella vulgaris*
EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU
APLICACIÓN AGRÍCOLA
EN EL CONTROL DE *Fusarium* sp



Comité de Tesis

Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez

Presidente

Dra. Alejandra Rocha Estrada

Secretaria

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Vocal

Dr. José Ezequiel Viveros Valdez

Vocal

Dr. Mizael Ortiz Martínez

Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Nino

Subdirectora de Posgrado

SUBDIRECCIÓN
DE POSGRADO



NANOFORMULADOS DE EXTRACTOS

DE *Chlorella vulgaris*

EN NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA SU

APLICACIÓN AGRÍCOLA

EN EL CONTROL DE *Fusarium* sp

Dirección de Tesis

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'S. Galindo', written over a horizontal line.

Dr. Sergio A. Galindo Rodríguez

Director

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'R. Álvarez', written over a horizontal line.

Dra. Rocío Álvarez Román

Directora externa (Facultad de Medicina, UANL)



DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material en esta Tesis esta protegido, el uso de imágenes, fragmentos de video, y demas material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionado al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS



A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su inversión y esfuerzo en la creación de programas de licenciatura y posgrado en ciencias a través de las diferentes Facultades, Institutos y Centros de Investigación en los que podemos seguir aspirando a superarnos profesionalmente.



A la Facultad de Ciencias Biológicas por formarme y educarme en el área de las Ciencias Biológicas a nivel de pregrado y posgrado, a cada uno de sus profesores investigadores que dirigen los diversos y diferentes laboratorios en los que pude crecer profesionalmente.



Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero para mis estudios de posgrado (no. de beca 1064202).

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Sergio Arturo Galindo Rodríguez por aceptar dirigir esta investigación, por su confianza, disponibilidad y paciencia en aclararme y resolverme cualquier duda, sus valiosas enseñanzas, conocimiento y astucia para lograr los objetivos planteados y por acompañarme en cada etapa de la investigación hasta el final sin importar las complicaciones que hubo en el transcurso, gracias por todo.

Al Dr. David Mizael Ortiz Martínez por estar al pendiente de los avances, su disponibilidad y paciencia en aclararme y recordarme la manera correcta de trabajar y por su valiosa ayuda en la última etapa experimental de la investigación.

Al Dr. Sergio Moreno Limon (†) por haber aceptado formar parte de la investigación y brindarme el material biológico requerido y haber estado al pendiente de los avances de la investigación (*Que desanse en paz*).

A los miembros del comité a la Dra. Alejandra Rocha, al Dr. Ezequiel Viveros y la Dra. Rocío Alvarez por aceptar formar parte de la investigación y haber estado al pendiente y presentes en los seminarios en los que se presentó la investigación.

Al Dr. Michel Stéphane Heya, gracias por tu amistad, acompañamiento, pláticas y risas como también haber compartido tu conocimiento y brindarme todo el material que estuviera a tu alcance para ayudarme en las etapas de la investigación que lo requerían.

A la Odontóloga Karina Briceño Cardona, gracias por ser mi amiga y complice desde el inicio, por las pláticas y risas que aunque fue breve los momentos compartidos fueron muy divertidos.

A los demás integrantes del “Nanolab” a la M.C Nancy Espinoza por su accesibilidad para aclarar dudas y por su ejemplo de trabajo de la misma forma que la Q.B.P Anahí Zamora, al M.C Romario García por las pláticas y experiencias compartidas en la carrera y por último, a los próximos Q.B.P Valentín Moreno y Sofía Cruz por su amabilidad, disponibilidad y breves momentos amenos.

DEDICATORIA

A mi papá Miguel Tadeo López Acuña por toda la confianza que ha depositado en mi desde que emprendí este camino, por su guía, comprensión y siempre acertados consejos. A mi mamá Teresa Magdalena Arellanes Ayala por siempre escucharme sin importar la hora que sea y por compartir mi entusiasmo cuando le platico mis planes a futuro.

Y les dijo: Vayan por todo el mundo y anuncien la Buena Nueva a toda la creación. Ellos, por su parte, salieron a predicar en todos los lugares.

El Señor actuaba con ellos y confirmaba el mensaje con los milagros que los acompañaban

Marcos 15.20

ÍNDICE

	Pág.
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
II.1 <i>Fusarium spp</i>	3
II.2 Hábitat	3
II.3 Características macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium spp</i>	4
II.4 Daños en cultivos agrícolas por <i>Fusarium spp</i>	7
II.4.1 Desarrollo de infección por <i>Fusarium spp</i>	7
II.4.2 Síntomas ocasionados por <i>Fusarium spp</i>	11
II.4.3 Daños en cultivos de importancia agrícola en México	12
II.5 Estrategias para el control de <i>Fusarium spp</i>	13
II.5.1 Limitaciones en el uso de fungicidas sintéticos	14
II.5.2 Perspectivas para el control de <i>Fusarium spp</i>	14
II.6 Compuestos bioactivos obtenidos a partir de microalgas	15
II.6.1 Condiciones de cultivo que estimulan la síntesis de compuestos bioactivos	15
II.6.2 Modo de acción de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana	17
II.6.3 <i>Chlorella vulgaris</i>	18
II.6.4 Ventajas del cultivo de <i>C. vulgaris</i>	19
II.6.5 Compuestos bioactivos	20
II.6.5.1 Condiciones de cultivo para la síntesis de compuestos bioactivos	21
II.6.5.2 Aplicaciones de compuestos bioactivos con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos	23
II.7 Nanotecnología en el sector agrícola	24
II.7.1 Nanopartículas poliméricas	25

II.7.2 Compuestos bioactivos encapsulados en nanopartículas poliméricas	26
III JUSTIFICACIÓN	30
IV HIPÓTESIS	31
V OBJETIVO GENERAL	32
VI OBJETIVOS ESPECÍFICOS	
VII MATERIALES Y MÉTODOS	34
VII.1 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	34
VII.2 Determinación de contenido total de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu	37
VII.3 Obtención de extractos a partir de biomasa de <i>C. vulgaris</i>	39
VII.4 Caracterización del extracto de la biomasa de <i>C. vulgaris</i>	40
VII.5 Pruebas de solubilidad del extracto de <i>C. vulgaris</i>	40
VII.6 Preparación de nanopartículas poliméricas con extracto de <i>C. vulgaris</i>	41
VII.7 Caracterización fisicoquímica de las NP-Ex y NP-BCO	41
VII.8 Análisis por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) de las NP-Ex y NP-BCO	42
VII.9 Cuantificación del extracto en las nanopartículas por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)	42
VII.10 Preparación de la suspensión de conidios de <i>Fusarium sp</i>	43
VII.11 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos y nanoencapsulados de <i>C. vulgaris</i> contra <i>F. solani</i>	43
VII.12 Análisis estadístico	45
VIII RESULTADOS	46
VIII.1 Cultivo de <i>Chlorella vulgaris</i>	46
VIII.2 Determinación de contenido total de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu	47

VIII.3 Obtención y caracterización fitoquímica del extracto metanólico de la biomasa de <i>C. vulgaris</i>	49
VIII.4 Preparación y caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas con y sin extracto de <i>C. vulgaris</i>	49
VIII.5 Análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-FT) de la formulación de NP-Ex	50
VIII.6 Obtención del porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación del extracto en nanopartículas poliméricas (NP-Ex)	50
VIII.7 Identificación de <i>Fusarium</i> sp y ajuste de solución de conidios	53
VIII.8 Determinación de la concentración inhibitoria de los extractos crudos y nanoencapsulados de <i>C. vulgaris</i> contra <i>F. solani</i>	54
IX DISCUSIÓN	55
IX.1 Obtención de la biomasa de <i>C. vulgaris</i> y caracterización fitoquímica de su extracto metanólico	55
IX.2 Nanoencapsulación del extracto de <i>C. vulgaris</i> en NPs y su caracterización fisicoquímica	57
IX.3 Determinación de la concentración inhibitoria de los extractos crudos y nanoencapsulados de <i>C. vulgaris</i> contra <i>Fusarium solani</i>	60
X CONCLUSIONES	62
XI PERSPECTIVAS	63
XII BIBLIOGRAFÍA	64
XIII ANEXOS	74
XIII.1 Anexo I	74
XIII.2 Anexo II	75

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
I	Descripción de <i>Fusarium</i> spp causantes de enfermedad y síntomas en plantas de cultivo en varios estados de México.	13
II	Compuestos del medio de cultivo 3N-BBM+V.	34
III	Información técnica del fertilizante ULTRASOL® MULTIPROPOSITO NPK (18-18-18).	36
IV	Condiciones físicas del cultivo madre de <i>C. vulgaris</i> (CM_{cv}).	37
V	Ensayos fitoquímicos para la caracterización de compuestos bioactivos presentes en el extracto de <i>C. vulgaris</i> .	40
VI	Sistemas utilizados en el bioensayo para determinar la actividad antifúngica.	45
VII	Parámetros de desarrollo de biomasa, celular y velocidad de crecimiento de <i>C. vulgaris</i> durante 13 días de 17 días del cultivo.	47
VIII	Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de <i>C. vulgaris</i> .	49
IX	Solubilidad del extracto en disolventes con diferente grado de polaridad.	49
X	Características fisicoquímicas de las NP-Ex y NP-BCO obtenidas por nanoprecipitación.	50
XI	Actividad antifúngica del extracto metanólico de <i>C. vulgaris</i> y las nanoformulaciones por técnica de microdilución en microplaca contra <i>Fusarium solani</i> .	54

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
1	Micrografías por microscopía electrónica de barrido mostrando la morfología de a) macroconidios y b) microconidios de <i>F. solani</i> .	5
2	Componentes de pared y membrana celular de conidióforos de <i>Fusarium</i> spp.	6
3	Micelios de a) <i>F. solani</i> , b) <i>F. verticillioides</i> y c) <i>F. oxysporum</i> .	7
4	Micrografía por microscopía electrónica de barrido que muestra A) colonización de raíces por <i>Fusarium</i> sp, B) Penetración de raíz, C) colonización en la parte lateral de la raíz, M) microconidios y F) conidióforos.	8
5	Cambios en la composición de la pared celular durante la penetración de raíz.	8
6	Factores de patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp.	9
7	Colonización de tejidos de la epidermis y córtex de raíz por <i>Fusarium</i> spp.	10
8	Síntomas de marchitamientos vasculares: a) tallo y raíz, b) decoloración de tejidos vasculares.	11
9	Pudriciones de tallo y raíz de cultivos de tomate causado por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> .	12
10	Principales rutas de las biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios.	16
11	Estructura celular de <i>C. vulgaris</i> (a) organelos (b) componentes de pared celular y organelos.	19
12	Perfiles cromatográficos obtenidos por CLAR para el extracto metanólico de <i>C. vulgaris</i> .	21

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
13	Procesos involucrados en la obtención de los bioproductos de microalgas.	24
14	Aplicaciones de la nanotecnología en el desarrollo de la agricultura mediante nanopartículas poliméricas.	26
15	Características estructurales de las nanopartículas poliméricas utilizadas en la agricultura.	26
16	Liberación de compuestos activos por la modificación del material polimérico en respuesta al pH y la temperatura.	27
17	Análisis por microscopía de epifluorescencia, en cepas de a) <i>B. cinerea</i> b) <i>A. carbonarius</i> y c) <i>A. niger</i> .	28
18	Cultivo inicial de <i>C. vulgaris</i> .	35
19	Representación esquemática del fotobiorreactor por columna de burbujeo.	36
20	Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de nanoprecipitación.	41
21	Distribución de los tratamientos en las microplacas.	44
22	Cultivos estándar de <i>C. vulgaris</i> (<i>CS_{cv}</i>) en los tres fotobiorreactores.	46
23	Desarrollo de biomasa de <i>C. vulgaris</i> monitoreado durante 13 días de cultivo.	47
24	Progresión en la producción de polifenoles totales en la biomasa de <i>C. vulgaris</i> durante 17 días de cultivo.	48
25	Espectrogramas FT-IR: A) Extracto metanólico de <i>C. vulgaris</i> , B) Polímero Eudragit S-100 y C) NP-Ex.	51
26	A) Fórmula estructural del Eudragit S-100, B) Espectrogramas FT-IR de las NP-BCO (azul) y NP-Ex (verde).	52

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
27	Espectrogramas por FT-IR de A) extracto metanólico de <i>C. vulgaris</i> y B) Eudragit S-100.	52
28	Espectrogramas obtenidos de la curva de calibración del extracto metanólico de <i>C. vulgaris</i> (300-1800 µg/mL) por espectroscopía FT-IR.	53
29	Morfología a) macroscópica y b) microscópica (100x) de <i>Fusarium solani</i> . Los macroconidios y microconidios teñidos con azul de lactofenol.	53

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
SEM	Microscopio electrónico de barrido
PBRs	Fotobiorreactores
CM_{Cv}	Cultivo madre <i>C. vulgaris</i>
CS_{Cv}	Cultivo estándar <i>C. vulgaris</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CI	Concentración inhibitoria
EAG	Equivalentes de ácido gálico
IP	Índice de polidispersidad
NPs	Nanopartículas poliméricas
NP-BCO	Nanopartículas poliméricas blanco
NP-Ex	Nanopartículas poliméricas cargadas con extracto
FT-IR	Espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
% E	Porcentaje de encapsulación
% EE	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
ζ	Potencial zeta
% I	Porcentaje de inhibición

RESUMEN

Los hongos *Fusarium* spp se encuentran entre los microorganismos fitopatógenos más amenazantes a la sanidad vegetal, tanto a nivel nacional como mundial, causando pudriciones de raíces y marchitamientos vasculares de los cultivos. En México, los cultivos afectados incluyen maíz, mango, tomate y pimientos en los estados de Sinaloa, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato. Por otro lado, debido a la problemática que ocasionan los fungicidas sintéticos en los suelos agrícolas, se ha optado por alternativas como la obtención de extractos a partir de microalgas (*e.g. Chlorella vulgaris*) para ser utilizados como productos fungicidas. Para hacer factible la aplicación de extractos, se ha considerado su encapsulación en nanopartículas poliméricas, a fin de mejorar su actividad biológica. En la presente investigación, primeramente, se realizó un cultivo por columna de burbujeo de *Chlorella vulgaris* en modo fototrófico durante 17 días, determinando una productividad de biomasa de 576 ± 0.09 mg/L/d, duplicación de biomasa/d 2 ± 0.3 , división celular/d 0.495 ± 0.07 y μ /d $= 0.343 \pm 0.05$, alcanzando un 12 ± 1.3 g biomasa_{humeda}/L y con 5 ± 0.6 μ g EAG/mg de biomasa seca al día final del cultivo. Posteriormente, se obtuvo el extracto metanólico a partir de la biomasa de *C. vulgaris*, detectando flavonoides y alcaloides presentes en el extracto. En seguida, se procedió a realizar una formulación en NP (Eudragit S-100) con el extracto metanólico de *C. vulgaris* obteniendo tamaños de 117 ± 2.7 nm, IP de 0.14 ± 0.03 y ζ de -7.8 ± 0.37 mV con % E de 34 ± 2.4 % y % EE = 56 ± 3.9 %. Finalmente se determinó una CMI de $>1000 \pm 15$ μ g/mL del extracto metanólico de *C. vulgaris* y una CMI de 1000 ± 9 μ g/mL de las NP-Ex contra conidios de *F. solani*. Por lo que, se concluye que *C. vulgaris* se adaptó a las condiciones de cultivo, generando una biomasa con la que se obtuvo el extracto que al ser encapsulado se favoreció su actividad antifúngica contra *F. solani*. La formulación obtenida podría ser útil para el control de hongos entomopatógenos como *F. solani*.

ABSTRACT

The *Fusarium* spp are the most important species of phytopathogenic fungi, which cause root rot and vascular wilt in vegetable crops. In Mexico, damages to important crops such as corn, mango, tomato, and peppers have been reported in the states of Sinaloa, Zacatecas, Aguascalientes, and Guanajuato. Due to the problems caused by chemical fungicides in agricultural soils, other alternatives have been chosen to control these phytopathogens, for example, the use of extracts obtained from the biomass of microalgae (e.g. *Chlorella vulgaris*). In addition, to make the application of these type of extracts viable, their encapsulation in polymeric nanoparticles has been considered. In the present study, firstly, a culture of *C. vulgaris* was performed using a bubble column in a photoautotrophic mode for 17 days. A biomass productivity of 576 ± 0.09 mg/L/d, a biomass doubling time of 2 ± 0.3 , a division per day of 0.495 ± 0.07 and a specific growth rate μ/d of 0.343 ± 0.05 were obtained for the culture. Also, a 12 ± 1.3 g wet biomass/L with a 5 ± 0.6 μ g GAE/mg of dry biomass were achieved at the final day of the culture. Subsequently, it was obtained a methanolic extract in which flavonoids and alkaloids were detected. Later, a formulation of methanolic extract loaded polymeric nanoparticles (PN-Ex) was obtained, which had a mean size of 117 ± 2.7 nm, a PDI of 0.14 ± 0.03 and a ζ of -7.8 ± 0.37 mV; additionally, the encapsulation percentage and the encapsulation efficiency percentage corresponded to 34 ± 2.4 % y 56 ± 3.9 %, respectively. Finally, a MIC $>1000 \pm 15$ μ g/mL of the methanolic extract of *C. vulgaris* and a MIC of 1000 ± 9 μ g/mL for PN-Ex against *Fusarium solani* conidia were determined. Therefore, it was concluded that *C. vulgaris* was adapted to growing conditions of culture, producing a biomass with which a methanolic extract was obtained. The encapsulation of extract into polymeric nanoparticles allowed to obtain a formulation which could be useful for the control of phytopathogenic fungi such as *F. solani*.

I INTRODUCCIÓN

En el periodo de 2015-2016 el PIB nacional fue del 2.3 %, del cual el 8.5 % correspondió al sector agroalimentario. Para el 2020, el PIB agroalimentario tuvo una tasa de crecimiento anual de 2.2 %, según datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Los datos mencionados contribuyen a visualizar la importancia del sector agroalimentario en México, donde se cultivan cerca de 270 productos agrícolas, entre los más destacados por su importancia en el consumo se encuentran el maíz, frijol, trigo, arroz, sorgo, cítricos, tomate y chile (Santillán-Mendoza *et al.* 2019; López-Orona *et al.* 2019). El desarrollo de los cultivos y producción de granos y frutos depende de la protección que tengan contra el ataque de fitopatógenos. En particular, más de 8000 especies de hongos enferman y dañan cultivos agrícolas (Summerell *et al.* 2010).

Entre los hongos fitopatógenos más importantes alrededor del planeta se encuentran las especies del género *Fusarium*, las cuales representan una gran amenaza en la sanidad vegetal y por ende en el desarrollo de los frutos y granos derivados de los cultivos (Nguvo y Gao 2019). En México, existen reportes de marchitamientos vasculares ocasionados por especies de *Fusarium* en diversos cultivos de maíz de los estados de Jalisco, Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes, en hortalizas como el ajo, y en cultivos de mango, pimientos y tomates en Sinaloa (Reyes-Velázquez *et al.* 2011; Delgado-Ortiz *et al.* 2016 ; Santillán-Mendoza *et al.* 2019; Vega-Gutiérrez *et al.* 2019).

Por otro lado, el uso de fungicidas sintéticos ocasiona efectos indeseados sobre el ecosistema agrícola, induciendo la generación de microorganismos resistentes, persistencia ambiental de residuos tóxicos y reducción de microorganismos benéficos en suelos (Izzeddin y Medina 2011). Por lo que, se requieren alternativas que sean compatibles con la agricultura sustentable como, por ejemplo, el control biológico con microorganismos y/o a partir de sus metabolitos. Microorganismos fotosintéticos como las microalgas del género *Chlorella* sintetizan compuestos bioactivos como fenoles, ácidos grasos, péptidos, polisacáridos, flavonoides, algunos de los cuales pueden presentar una potencial actividad antifúngica (Scaglioni *et al.* 2018).

En los últimos años, la nanotecnología ha contribuido al avance de la agricultura sustentable, al desarrollo vegetal y al control de fitopatógenos. Una de las estrategias nanotecnológicas consiste en el uso de polímeros naturales o sintéticos para la formación de nanopartículas, las cuales pueden servir como sistemas de liberación controlada de compuestos bioactivos (*e.g.* extractos antifúngicos), lo que puede llevar a aumentar su eficacia biológica, permitiendo así una mayor acción en el control de fitopatógenos (Pascoli *et al.* 2018; Shukla *et al.* 2019).

La presente investigación consistió, primeramente, en obtener un extracto metanólico a partir de la biomasa generada por la microalga Chlorophyta: *Chlorella vulgaris*. Posteriormente, para evaluar la presencia de compuestos bioactivos con potencial actividad antifúngica, se determinó *in vitro* la concentración inhibitoria del extracto contra conidios de *Fusarium* sp. En seguida, se incorporó el extracto en nanopartículas poliméricas y se determinó la concentración inhibitoria del extracto nanoencapsulado en el desarrollo de conidios de *Fusarium* sp.

II ANTECEDENTES

II.1 *Fusarium* spp

Fusarium es un género de hongos imperfectos, es decir, que perdieron la necesidad o la capacidad de producir su etapa sexual. Este hongo pertenece al filo Deuteromycota con más de 70 especies conocidas; su taxonomía es:

Filo: Deuteromycota

Clase: Hyphomycetes

Orden: Hyphales

Género: *Fusarium*

En el orden de los hyphales, los conidios se forman individualmente o en cadenas en las puntas de los conidióforos que parten del micelio; dichas características morfológicas son útiles para la identificación y taxonomía de *Fusarium* spp, que se basa en la identificación de esporas como clamidosporas, macroconidios y microconidios. *Fusarium* spp se encuentran entre los fitopatógenos más importantes que enferman las plantas de cultivo y de horticultura, ocasionando pérdidas económicas considerables.

Entre las especies mayormente documentadas se encuentran *F. graminearum*, *F. verticillioides* y *F. solani*, los cuales ocasionan daños a plantaciones e incluso también en humanos. Las especies *F. oxysporum* forman un complejo de linajes filogenéticos que son específicos hacia la planta hospedante, lo cual es debido a mutaciones o a la transferencia horizontal y/o recombinante de genes patogénicos, por lo que, diferentes plantas hospedantes son atacadas por razas específicas de *F. oxysporum*; así, el hongo que ataca al tomate se designa *F. oxysporum f. lycopersici*, al del plátano *F. oxysporum f. cubense*, y al del algodón *F. oxysporum f. vasinfectum* (Agrios 2004 ; Summerell *et al.* 2010 ; Shahnazi *et al.* 2012; Nguvo y Gao 2019 ;Vega-Gutiérrez *et al.* 2019).

II.2 Hábitat

Las especies de *Fusarium* son un género de hongos que habitan en suelos cálidos y arenosos, estableciéndose por tiempo indefinido, aunque su número poblacional varía en forma considerable dependiendo de la susceptibilidad a condiciones ambientales. Por ejemplo, temperaturas de 20 a 32 °C son óptimas para su desarrollo. Por otra parte, aunque el pH del suelo se considera un factor de estrés biótico, *Fusarium* spp son capaces de adaptarse y producir metabolitos secundarios.

Se determinó que, en respuesta al estrés ocasionado por valores alcalinos de pH, *Fusarium* spp pueden producir micotoxinas en concentraciones de 343 mg/L de ácido fusárico y fumonisinas B1 y B2 en concentraciones de 0.05 y 0.08 µg /mL, respectivamente (Agrios 2004; Li *et al.* 2012; Li *et al.* 2017; Lakshmipriya Perincherry 2019).

Fusarium spp son hongos saprófitos, por lo que, también se desarrollan en raíces y restos de plantas, como lo reportan Santillán-Mendoza *et al.* (2019) al haber aislado *Fusarium* spp a partir de tejidos con malformaciones de árboles de mago. Por su parte, Vega-Gutiérrez *et al.* (2019) aislaron *F. oxysporum* f. *lycopersici* de tejidos vasculares de plantaciones de tomate y Kurt *et al.* (2020) aislaron *F. solani* de tejidos de raíces y tallos de árboles de cítricos.

II.3 Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium* spp

Fusarium spp existen, principalmente, en su fase imperfecta, así que las características que deben determinarse para que el hongo pueda ser identificado son:

A) Estructuras microscópicas.

a) *La forma, tamaño y disposición de los conidios.* Las esporas asexuales se denominan conidios, cuya función es la reproducción, resistencia en ambientes adversos y diseminación. La germinación del conidio se divide en cuatro etapas, el despertar de la espora de la dormancia, hinchazón, establecimiento de polaridad celular y la formación de tubos germinativos. En cada una de las etapas anteriormente mencionadas se expresan genes implicados en la patogenicidad (*e.g.* proteínas quinasas dependientes de cAMP y MAPK), así como también quitinas, glucanos y glicoproteínas para la formación de pared celular y biosíntesis de lípidos (*e.g.* ergosterol) para la formación de la membrana celular.

Las especies *Fusarium* producen tres tipos de esporas asexuales: i) macroconidios (Figura 1a) que están constituidos de 3 a 5 células y los cuales se adelgazan y se encorvan hacia ambos extremos, ii) microconidios (Figura 1b), que tienen de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las

condiciones y iii) clamidosporas que están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y redondas (Summerell *et al.* 2010; Deng *et al.* 2015; Nguvo y Gao 2019; Stępień y Lalak-Kańczugowska 2021).

El tamaño de los microconidios y macroconidios varía entre especies siendo en *F. oxysporum* microconidios cilíndricos con forma de riñón 4-16 x 3.5-6 μm y macroconidios con forma de gancho de 116-40 x 5-7 μm , 3-4 septos. En *F. falciforme* los microconidios son de 9.6 a 14.9 x 4.0 a 6.3 μm y los macroconidios falciformes, hialinos de 29.5 a 50.3 x 5.0 a 8.1 μm ; en el caso de *F. solani* y *F. proliferatum* los microconidios son de 6-22 x 2-4.5 μm y los macroconidios de 23-54 x 4-5 μm (Shahnazi *et al.* 2012; Vega-Gutiérrez *et al.* 2019).

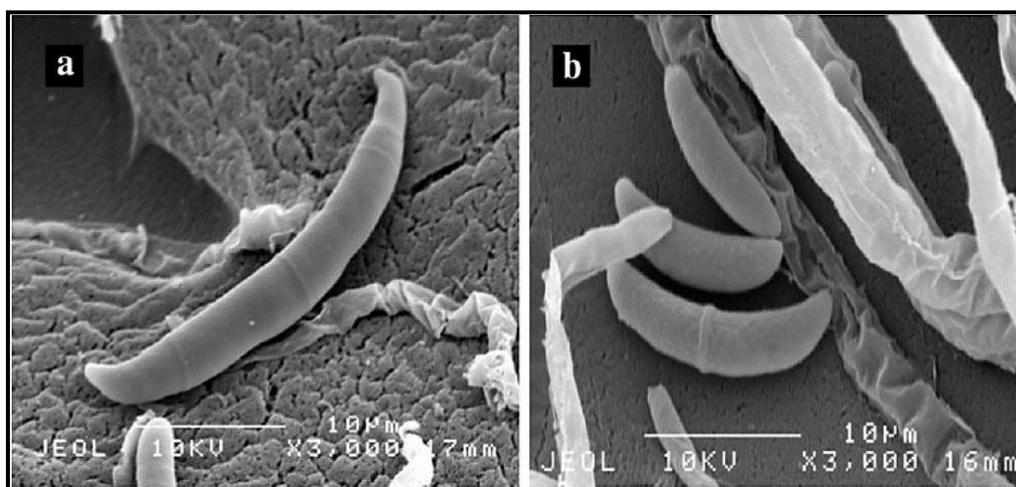


Figura 1. Micrografías por microscopía electrónica de barrido mostrando la morfología de a) macroconidios y b) microconidios de *F. solani*.

(Shahnazi *et al.* 2012)

b) *Pared y membrana celular.* La pared celular (Figura 2) es una matriz polimérica que envuelve a la célula del hongo (*i.e.* hifas, conidióforos y conidios) y está compuesta por una capa externa y otra interna. La capa interna está constituida por β -(1-3)-glucanos, β -(1-6)-glucanos y quitina. Por su parte, la capa externa se compone de glicoproteínas, manosa y melanina (Larson *et al.* 2011; Geoghegan *et al.* 2017; Kosuri *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020).

La membrana celular se compone de fosfolípidos (*i.e.* fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol) y ergosterol, implicados en la actividad enzimática, fluidez, integridad y el transporte de sustratos (Zhang *et al.* 2008; Kosuri *et al.* 2018; Wang *et al.* 2021).

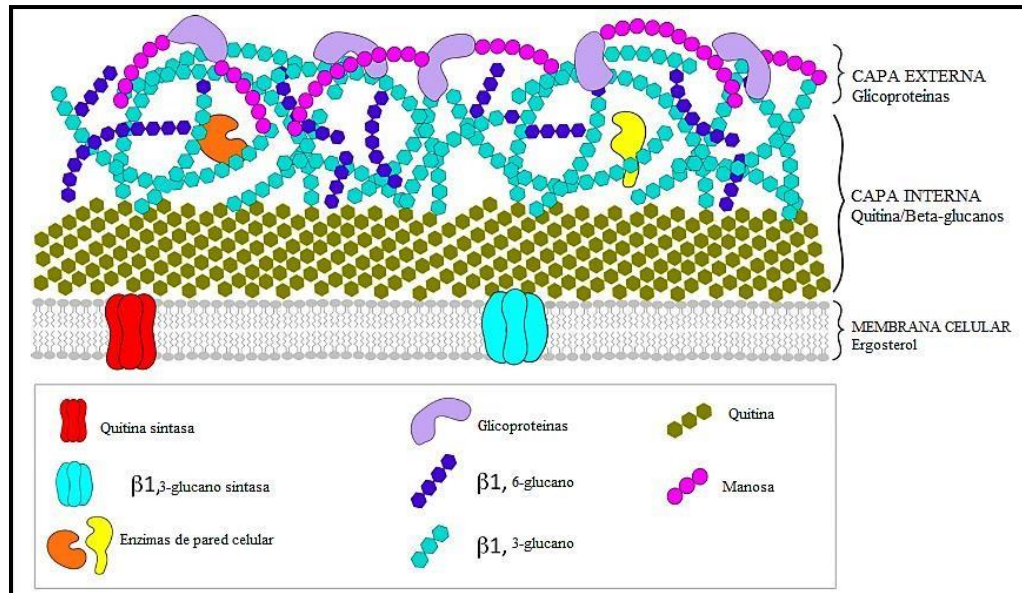


Figura 2 Componentes de la pared y la membrana celular de conidióforos de *Fusarium* spp.

(Geoghegan *et al.* 2017)

c) Esporodocio y conidióforos. Los conidióforos se ramifican a partir de las hifas y sostienen a los conidios en sus puntas, mientras que, los conidióforos se forman sobre un estroma micelial en forma de cojín. A la estructura completa se le denomina esporodocio, cuyos conidióforos se mantienen unidos en una estructura alargada y productora de esporas denominada sinema (Agrios, 2004).

B) Estructuras macroscópicas: micelio.

Los hongos imperfectos *Fusarium* spp producen un micelio variando en pigmentación entre especies, por ejemplo, *F. solani* (Figura 3a) muestra pigmentaciones rojas, rosadas, cafés o grises, dependiendo del sustrato en el que crece (Shahnazi *et al.* 2012). Por su parte, *F. verticillioides* (Figura 3b) muestra micelio con coloraciones blancas con amarillo y/o moradas (Delgado-

Ortiz *et al.* 2016); *F. oxysporum* (Figura 3c) presenta micelio cremoso de colores blanco algodonoso con una pigmentación en el centro de color amarillo.

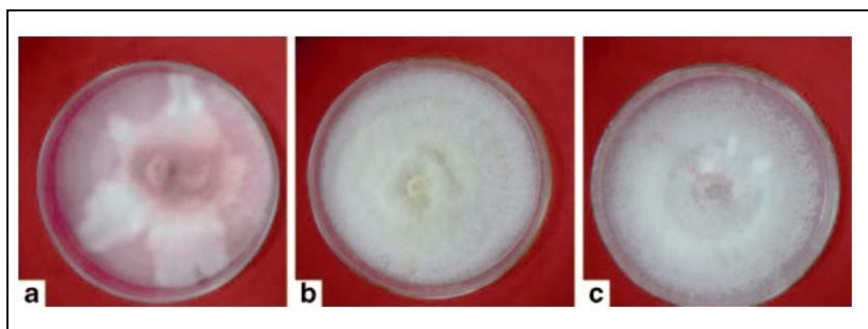


Figura 3 Micelios de a) *F. solani*, b) *F. verticillioides* y c) *F. oxysporum*.

(Geoghegan *et al.* 2017)

II.4 Daños en cultivos agrícolas por *Fusarium* spp

Fusarium spp se introducen en un terreno de cultivo mediante tres modos:

- a) Condiciones climatológicas: gotas de lluvia, viento y agua del suelo.
- b) Asociados al hospedero: semillas de algunas plantas, trasplantes y esquejes de plantas infectadas.
- c) Cosmopolita: irrigación y equipo agrícola.

Los microconidios pueden dispersarse en distancias continentales por los factores mencionados, estableciéndose en el suelo y restos de plantas en forma de clamidosporas, o bien en forma de micelio, permaneciendo por tiempo indefinido. No obstante, su número poblacional varía en forma considerable, dependiendo de la susceptibilidad y el tiempo de cultivo de la planta hospedante en el campo (Agrios, 2004; Summerell *et al.* 2010; Lakshmipriya Perincherry, 2019).

II.4.1 Desarrollo de infección por *Fusarium* spp

Fusarium spp infectan a las plantas a través de sus raíces (Figura 4), tan pronto como llega el micelio, los tubos germinales (conidióforos) penetran directamente en las puntas de las raíces o entran en estas últimas a través de las heridas, propagándose intercelularmente a través de la corteza de la raíz.

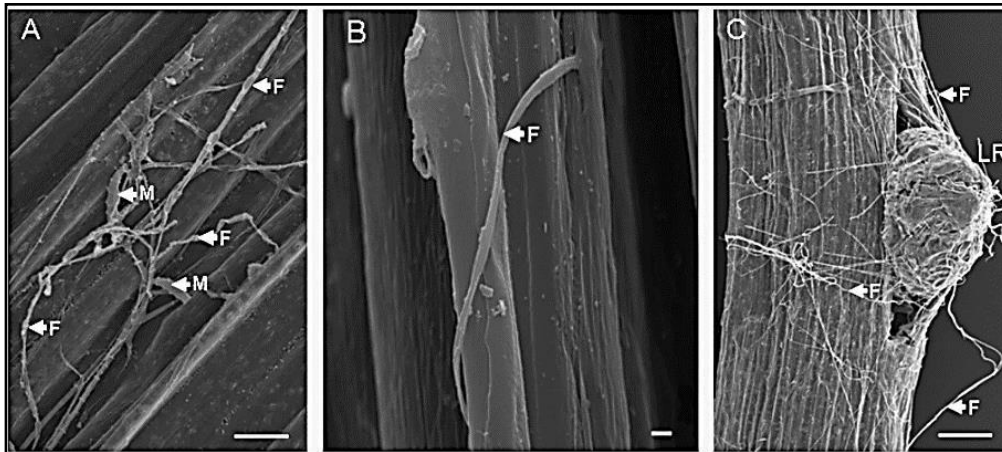


Figura 4 Micrografía por microscopía electrónica de barrido que muestra A) colonización de raíces por *Fusarium* spp, B) penetración de raíz, C) colonización en la parte lateral de la raíz; M) microconidios y F) conidióforos (Jaroszuk-Ściseł *et al.* 2008).

La penetración por parte de los conidióforos (Figura 5) es posible debido a la modificación de los componentes de la pared celular de los conidióforos, como la desacetilación de quitina a quitosano en la pared interna y reducción de β -glucanos mediante la síntesis de α -1,3-glucanos en la pared externa.

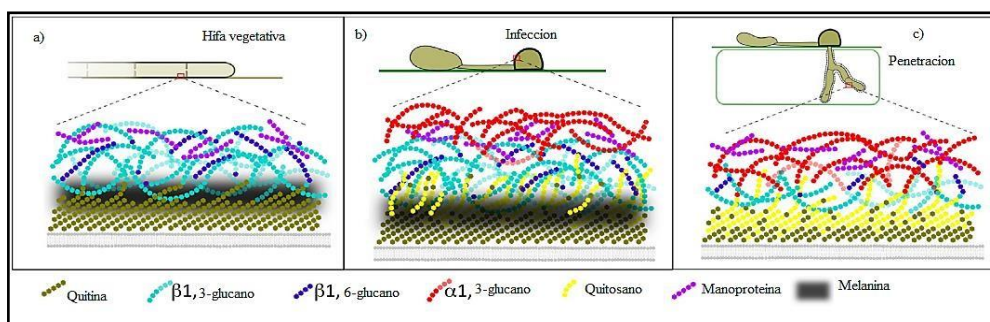


Figura 5 Cambios en la composición de la pared celular durante la penetración de la raíz. a) Composición de pared celular, b) Durante la infección la quitina es desacetilada, formando quitosano, y los β -glucanos se reducen y c) β -1,3 glucanos influyen en la adherencia del conidióforo a la célula vegetal (Geoghegan *et al.* 2017).

Dichas modificaciones permiten fortalecer la pared celular de los conidióforos evadiendo la respuesta inmune de la planta, además, de sintetizar melanina que otorga flexibilidad a la pared celular para extenderse y llegar hasta los vasos xilemáticos por la secreción de enzimas como celulasas, pectinasas, lipasas y xilanasas activadas por cascadas de señalización de proteínas quinasas dependientes de cAMP y MAPK que degradan la pared celular (Figura 6) y las estructuras del xilema. De hecho, dentro del sistema xilema (Figura 7 A) los conidióforos forman microconidios, que son llevados por la corriente de transpiración hacia el tallo y la corona de la planta.

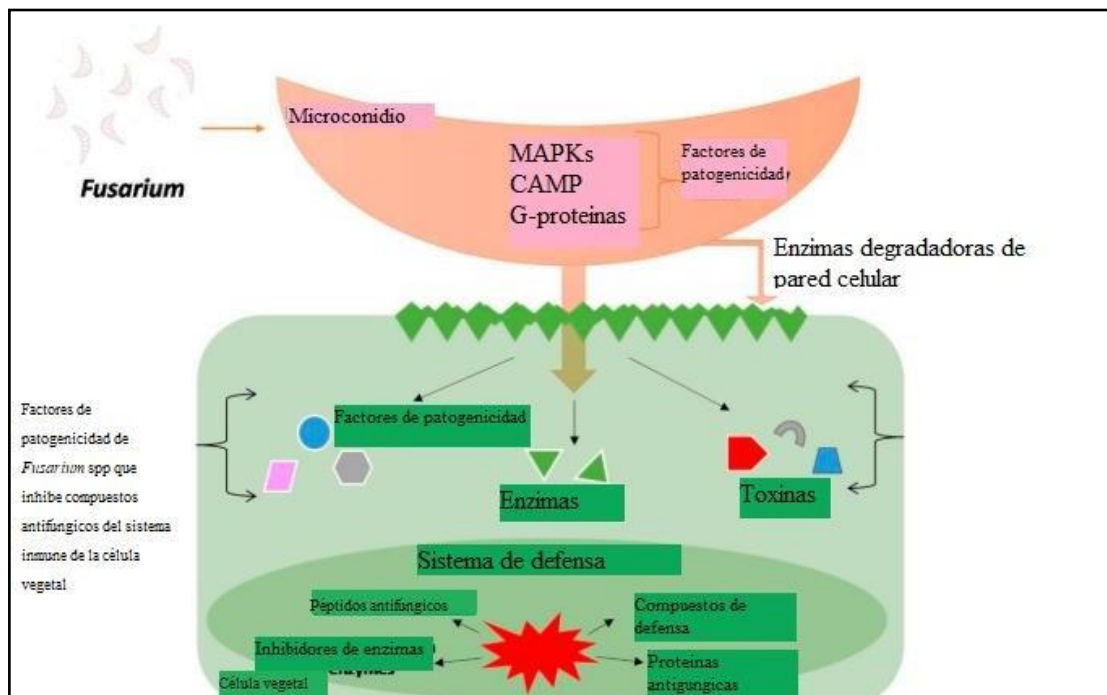


Figura 6 Factores de patogenicidad de *Fusarium* spp.

(Lakshmipriya Perincherry. 2019) .

Así, el hongo invade entonces en gran escala los tejidos parenquimatosos de la planta, llega a la superficie de los tejidos muertos y ahí esporula profusamente, diseminando las esporas hacia nuevas plantas. La obstrucción de los vasos por el micelio y los conidios (Figuras 7 B y 7 C), así como, la presión que ejerce la proliferación de las células parenquimatosas adyacentes, se debe a la alteración en la economía del agua de las plantas infectadas; cuando el volumen de agua disponible para las hojas es inferior al mínimo requerido para su funcionamiento, las estomas se cierran, las hojas se marchitan, mueren y como consecuencia, muere el resto de la planta (Agrios. 2004; Geoghegan *et al.* 2017; Lakshmipriya Perincherry 2019; Nguvo y Gao. 2019; Stępień y Lalak-Kańczugowska, 2021).

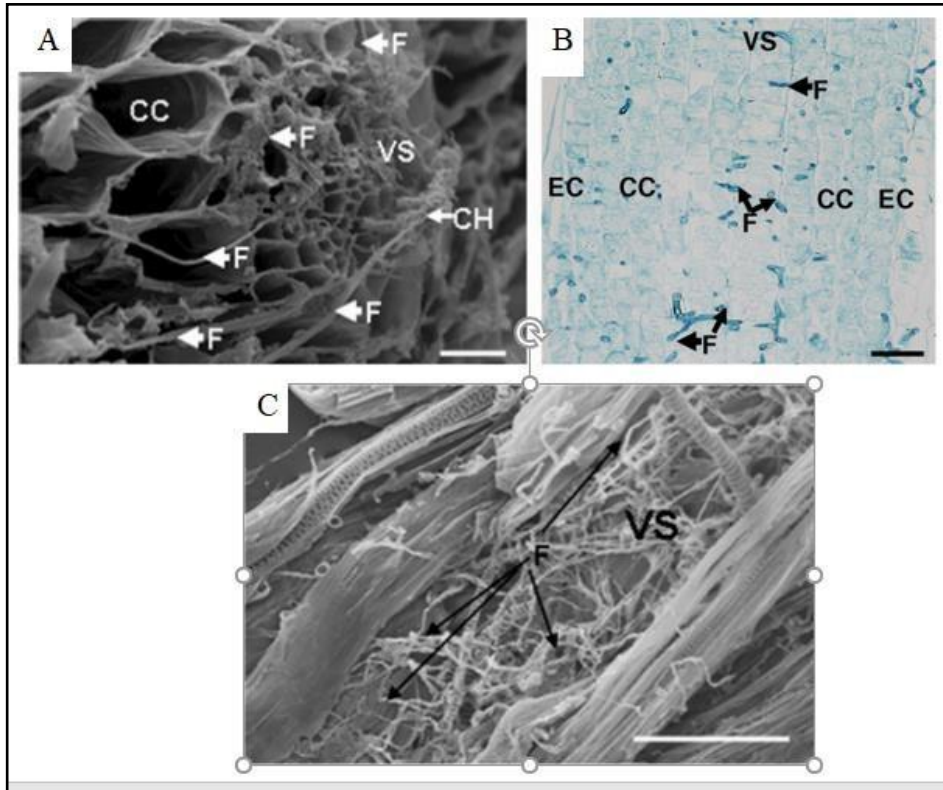


Figura 7 Colonización de tejidos de la epidermis y córtex de raíz por *Fusarium* spp. A) micrografía SEM que muestra la colonización en las células del córtex y del sistema vascular, B) micrografía de corte longitudinal que muestra la colonización de células del córtex y del sistema vascular por conidióforos de *Fusarium* spp y C) micrografía SEM que muestra la colonización completa de conidióforos de *Fusarium* spp en el sistema vascular. VS = Sistema vascular de raíz, EC= Epidermis de raíz, CC= Células del córtex de la rizodermis, F= Conidióforos de *Fusarium* spp y CH= Formación de conidióforos de *Fusarium* spp.

(Jaroszuk-Ścisiel *et al.* 2008)

II.4.2 Síntomas ocasionados por *Fusarium* spp

El marchitamiento vascular ocasionado por *Fusarium* spp es una de las enfermedades más prevalentes y destructivas. Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan con la pérdida de turgencia en las hojas, debilitándose y adquiriendo una tonalidad del verde al amarillo verdoso, finalmente, decaen y se marchitan. Las plantas adultas del campo pueden marchitarse, achaparrarse y formar raíces adventicias; los síntomas avanzan hacia la parte superior de la planta hasta que destruyen al follaje y ocasionan la muerte del tallo. En los vasos xilemáticos de tallos y otros órganos infectados puede haber micelio y esporas del hongo (Figura 8). Los frutos que, ocasionalmente, son infectados se pudren y se desprenden sin que aparezcan manchas en ellos (Agrios, 2004; Reyes-Velázquez *et al.* 2011; Shahnazi *et al.* 2012; Santillán-Mendoza *et al.* 2019; Delgado-Ortiz *et al.* 2016).

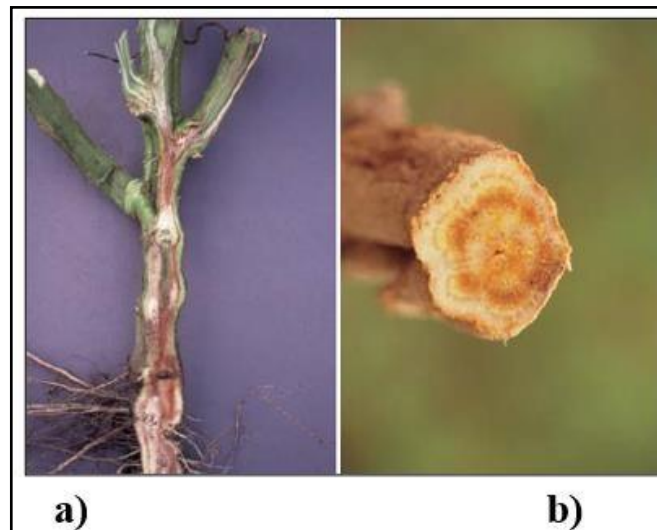


Figura 8 Síntomas de marchitamientos vasculares:
a) tallo y raíz, b) decoloración de tejidos vasculares.
(Agrios. 2004)

Las pudriciones (Figura 9) de raíces, tallos, coronas, bulbos y tubérculos empiezan con manchas ligeras rojizas, adquiriendo una tonalidad de oscura a pardo; en la raíz principal aparecen fisuras longitudinales, en tanto que, las pequeñas raíces laterales son destruidas. Por otra parte, las lesiones aparecen en el tallo a nivel de la superficie del suelo o por debajo de ella y sus ejes presentan manchas rojas o de color rosa; estas lesiones se desarrollan de afuera hacia dentro (Agrios, 2004; Reyes-Velázquez *et al.* 2011; Shahnazi *et al.* 2012; Santillán-Mendoza *et al.* 2019; Delgado-Ortiz *et al.* 2016).



Figura 9 Pudriciones de tallo y raíz de cultivos de tomate causado por *Fusarium oxysporum* f. sp *radicis-lycopersici*. (Agrios. 2004)

II.4.3 Daños en cultivos de importancia agrícola en México

Los marchitamientos vasculares y pudriciones de plántulas, raíces y tallos son muy destructivas y alarmantes. En la Tabla I se enlistan las especies *Fusarium* causantes de dichas enfermedades, los síntomas que ocasionan y la planta de cultivo afectada, así como, la locación en México.

Tabla I Descripción de *Fusarium* spp causantes de enfermedades y síntomas en plantas de cultivo en varios estados de México.

Especie (s)	Enfermedad y síntoma	Planta afectada	Estado	Referencia
<i>F. verticillioides</i> y <i>F. proliferatum</i>	Marchitamientos vasculares, pudriciones y coronas	Maíz	Jalisco	Reyes-Velázquez <i>et al.</i> (2011)
<i>F. acuminatum</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. verticillioides</i>	Pudrición basal del bulbo del ajo con coloraciones cafés en las puntas de las hojas, enanismo y pudriciones de tallo y raíz	Ajo	Zacatecas, Guanajuato y Aguascalientes	Delgado-Ortiz <i>et al.</i> (2016)
<i>F. mexicanum</i> , <i>F. solani</i>	Marchitamientos vasculares	Mango	Michoacán	Santillán-Mendoza <i>et al.</i> (2019)
<i>F. oxysporum</i>	Pudriciones y marchitamientos vasculares	Pepino	Sinaloa	López-Orona <i>et al.</i> (2019)
<i>F. oxysporum</i> , <i>F. falciforme</i>	Pudriciones de raíces y marchitamientos vasculares, defoliación	Tomate	Sinaloa	Vega-Gutiérrez <i>et al.</i> (2019)

II.5 Estrategias para el control de *Fusarium* spp

Fusarium spp se encuentran ampliamente distribuidos en los cultivos y son persistentes en los suelos, lo que hace difícil erradicarlos. La rotación de cultivos y la inundación de los terrenos de cultivo han sido útiles para disminuir las poblaciones de *Fusarium* spp en el suelo, pero no los eliminan totalmente.

Por su parte, el proceso de fumigación y esterilización de los suelos ha tenido éxito en algunos casos, pero es demasiado costoso, tóxico y su efecto es tan poco duradero que lo hace inadecuado (Agrios 2004; Rai *et al.* 2018; Nguvo y Gao. 2019).

II.5.1 Limitaciones en el uso de fungicidas sintéticos

Para minimizar el control de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp, los agricultores recurren normalmente al uso de fungicidas sintéticos, no obstante, estos productos ocasionan diversos efectos negativos en el ambiente y en los seres vivos, entre los que destacan: a) pérdida de la fertilidad del suelo, b) pérdida de la microbiota del suelo, c) generación de resistencia y adaptación de microorganismos fitopatógenos, d) toxicidad en las plantas de cultivo, e) daños en la salud en los consumidores por frutos y hortalizas contaminados con productos tóxicos, f) daños en la salud de los agricultores por su exposición a dichos productos y g) acumulación en el ambiente, provocando ecotoxicidad (Rai *et al.* 2018; Nguvo y Gao, 2019; Tleuova *et al.* 2020; Lykogianni *et al.* 2021).

II.5.2 Perspectivas para el control de *Fusarium* spp

El uso de fungicidas sintéticos ha sido gradualmente restringido en México, no solo por el daño que causan al medio ambiente, sino también por los efectos indeseados en la salud humana. Por lo tanto, son necesarias alternativas de control que sean compatibles con la agricultura sustentable, por lo que, cada vez más agricultores optan por el control biológico usando a) microorganismos denominados PGRPs (*i.e.* microorganismos colonizadores de raíces y capaces de sintetizar enzimas líticas) y/ o b) el uso de extractos de origen vegetal o de macro y microalgas. Los extractos incluyen ácidos grasos, péptidos y compuestos fenólicos que presentan diversos mecanismos de acción, ya sea sobre un organelo en específico, o pueden inhibir funciones celulares como la biosíntesis de ergosterol (Dambolena *et al.* 2012; Suresh *et al.* 2014; Abdullah *et al.* 2016; Pina-Barrera *et al.* 2019; Scaglioni *et al.* 2018).

II.6 Compuestos bioactivos obtenidos a partir de microalgas

Las microalgas son un diverso grupo de microorganismos fotosintéticos, unicelulares con gran diversidad de colores, con tamaño celular de 3-10 μm y eucariontes. Se estima que existen alrededor de 50,000 especies diferentes y se clasifican de acuerdo con su pigmentación y los compuestos constituyentes de la pared celular. Por ejemplo, se tienen verdes (Chlorophyta y Charophyta), rojas (Rhodophyta), cafés (Phaeophyta), amarillo-verdes (Xanthophyta) y diatomeas (Bacillariophyta). Habitan comúnmente en ecosistemas acuáticos dulces y/o salinos, son organismos autótrofos, es decir, que utilizan la energía lumínica y nutrientes inorgánicos como CO_2 , mientras que, las microalgas con metabolismo heterotrófico utilizan compuestos orgánicos como glucosa o acetato y, por último, también existen las que poseen metabolismo mixotrófico, obteniendo energía a través de la fotosíntesis y de los procesos de oxidación (De Morais *et al.* 2015; Pina-Pérez *et al.* 2017; Silva *et al.* 2018).

El metabolismo de las microalgas reacciona a factores ambientales, por lo que, la manipulación de las condiciones de cultivo, o la presencia y ausencia de ciertos nutrientes, estimula la biosíntesis de compuestos específicos (De Morais *et al.* 2015; Abdullah *et al.* 2016; Silva *et al.* 2018; Hallmann y Rampelotto, 2019).

II.6.1 Condiciones de cultivo que estimulan la síntesis de compuestos bioactivos

Los compuestos bioactivos son sintetizados por las microalgas a partir de su metabolismo primario (*e.g.* proteínas, ácidos grasos y pigmentos) o a través de su metabolismo secundario obteniendo compuestos fenólicos como flavonoides, taninos ácidos fenólicos, terpenos y compuestos halogenados alifáticos; tales compuestos pueden presentar actividades biológicas incluyendo antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias o anticancerígenas (Figura 10) (Hajimahmoodi *et al.* 2010; De Morais *et al.* 2015; Abdullah *et al.* 2016; Singh *et al.* 2017).

Cabe resaltar que manipulando las condiciones de temperatura, salinidad, luz, pH y nutrientes, así como el tiempo de cultivo, se puede modular el desarrollo celular y se estimula el metabolismo para la síntesis de compuestos bioactivos de interés (De Morais *et al.* 2015; Abdullah *et al.* 2016).

Por ejemplo, el control del pH es esencial para la efectiva absorción de los compuestos disponibles en el medio de cultivo. Por su parte, la reducción de algunos compuestos, como el nitrógeno, pueden conllevar a la síntesis de carbohidratos o de lípidos neutros, por ejemplo, a pH alcalinos se incrementa la síntesis de triglicéridos neutros.

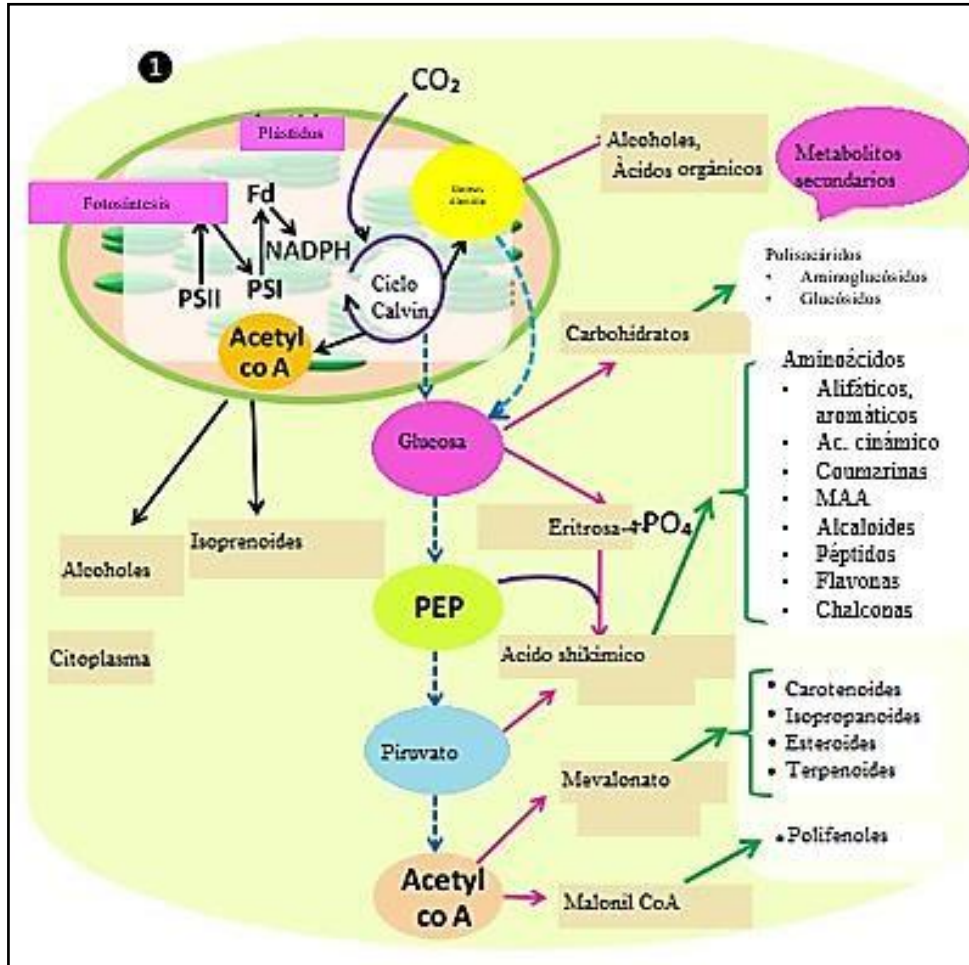


Figura 10 Principales rutas de la biosíntesis de metabolitos primarios y secundarios.

La luz es un factor indispensable para la fotosíntesis, generando la división celular y un incremento en la concentración celular. La iluminación influye en la composición bioquímica de la biomasa, por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos puede llegar a disminuirse con el incremento de la incidencia lumínica debido que los lípidos son los componentes mayoritarios de los cloroplastos, por lo que, al incrementar la energía lumínica esta demanda una actividad mayor de los cloroplastos; por su parte, la síntesis de carbohidratos aumenta conforme aumenta la incidencia lumínica. La fotosíntesis y la respiración celular también se ven afectadas por la temperatura.

Por otro lado, la respiración celular aumenta conforme se eleva la temperatura, este factor influye en la síntesis de proteínas, ácidos grasos insaturados y compuestos fenólicos, determinándose que la temperatura óptima de desarrollo va de 35-37 °C y de 16-28 °C.

Los requerimientos nutricionales generales son C, N, O, P, Ca, Mg, S y K y, en menor medida, Fe, Mn, Cu, Mo y Co. La manipulación de las condiciones de cultivo en presencia o ausencia de ciertos nutrientes estimula la biosíntesis de compuestos específicos, por ejemplo, bajo condiciones de 1-6 % (p/v) de KNO₃, 0.3-0.75 % (p/v) de Na₂HPO₄ y 0.25 % (p/v) de FeCl₃, se favorece la acumulación de lípidos en un 37, 24, 28 % en las microalgas *N. oculata*, *T. suecica* y *I. galbana*, respectivamente, aunque a costa de una baja en el desarrollo celular; esto es debido a que las microalgas resguardan los lípidos de almacenamiento, cuyos niveles se modifican dependiendo de las condiciones de estrés (Abdullah *et al.* 2016; De Morais *et al.* 2015).

II.6.2 Modo de acción de compuestos bioactivos con actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de compuestos bioactivos, obtenidos a partir de estos microorganismos, es debido a su capacidad para sintetizar compuestos como: ácidos grasos, ácidos acrílicos, halogenuros alifáticos, terpenoides, esteroides, compuestos heterocíclicos que contienen sulfuros, carbohidratos, acetogeninas, polifenoles y flavonoides (De Morais *et al.* 2015; Pina-Pérez *et al.* 2017).

Algunos ácidos grasos, como el linoleico, palmítico, láurico, oleico y araquidónico, pueden presentar actividad antimicrobiana. En cuanto a su mecanismo de acción, los ácidos grasos afectan la estructura celular de varios microorganismos, principalmente, la membrana. El daño que ocasionan a este nivel provoca, tanto la pérdida de sustancias internas de la célula, como la entrada de componentes perjudiciales; además, se reduce la absorción de nutrientes y se inhibe la producción de esporas (De Morais *et al.* 2015).

En el caso de los compuestos fenólicos (*e.g.* terpenos, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides y florotanninos) su actividad antagónica se debe a diversas alteraciones fisiológicas, por ejemplo: a) la inhibición en la germinación de esporas, b) la inhibición en la síntesis del β -(1,3)-D-glucano, precursor de componentes integrales

de la pared celular como ergosterol y glucosamina, c) la inhibición de enzimas amilasas, impidiendo así la captación de azúcares del medio nutritivo, d) la inhibición de la síntesis de aminoácidos, por ejemplo, interfiriendo en la reacción entre fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato y e) en la inhibición de síntesis de lípidos, disminuyendo la relación de ácidos grasos saturados e insaturados, lo que repercute en la producción de micotoxinas (Pagnussatt *et al.* 2013; Arnhold *et al.* 2014; Abdullah *et al.* 2016; Tripathi y Kumar 2017; Scaglioni *et al.* 2018).

II.6.3 *Chlorella vulgaris*

Chlorella vulgaris pertenece al dominio eucariota de la división Chlorophyta, su taxonomía es:

Dominio: Eucariota

Reino: Protista

Filo: Chlorophyta

Clase: Trebouxiophyceae

Orden: Chlorellales

Género: *Chlorella*

Especie: *vulgaris*

C. vulgaris (Figura 11) tiene un tamaño celular de 2-10 μm de diámetro, con pigmentación verde, no móvil y autotrófica, es decir, obtiene energía a través del proceso fotosintético; además, es de reproducción asexual y de rápido crecimiento, siendo ideal para su producción industrial, ya que, solo requiere de luz solar o artificial, dióxido de carbono, agua y compuestos inorgánicos como nutrientes. *C. vulgaris* posee capacidad de adaptación a condiciones ambientales severas, tales como concentraciones bajas de nitrógeno y fósforo, o altas concentraciones de dióxido de carbono y excesiva exposición a la luz (Safi *et al.* 2014; Baudelet *et al.* 2017; Silva *et al.* 2018).

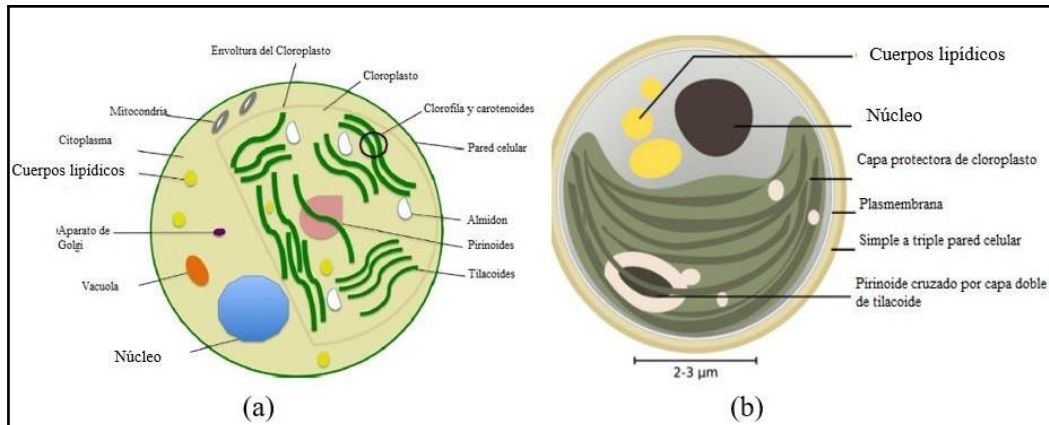


Figura 11 Estructura celular de *C. vulgaris* (a) organelos (b) componentes de pared celular y organelos.

II.6.4 Ventajas del cultivo de *C. vulgaris*

C. vulgaris se considera una microalga Chlorophyta con ventajas para su cultivo a escala industrial, o en condiciones de laboratorio, debido a diferentes razones: a) su reproducción asexual, ya que, a las primeras 24 h se reproduce por autoesporulación, formándose 4 nuevas células hijas dentro de una célula madre, que al lisarse libera las nuevas células formadas, es decir, tiene una reproducción rápida y sencilla, b) metabólicamente, tiene capacidad de adaptación a medios de cultivos no selectivos, siempre y cuando, estos contengan minerales inorgánicos. De hecho, para su producción, se ha cultivado a partir de fuentes inorgánicas provenientes de aguas residuales y a diferentes intensidades de luz, lo que influye en una eficiente asimilación de nutrientes (Safi *et al.* 2014; Arbib *et al.* 2014; Asadi *et al.* 2020).

Por ejemplo, Arbib *et al.* (2014) determinaron que la máxima concentración de biomasa (mg/L) final de *C. vulgaris* correspondió a $X_{max} = 1303 \pm 270$ mg/L, cuando se utilizaba como medio de cultivo nutrientes obtenidos a partir de aguas residuales como: NH_4 (21 mg/L) y $\text{PO}_4 = (6 \text{ mg/L})$. En otro estudio, Asadi *et al.* (2020) obtuvieron que, después de 8 días, la máxima concentración de biomasa (g/L) de *C. vulgaris* era de $X_{max} = 1.84$ g/L, empleando una intensidad óptima de luz de 7500 lx.

II.6.5 Compuestos bioactivos

C. vulgaris es reconocida como una fuente notable de compuestos bioactivos incluyendo vitaminas (*e.g.* α -tocoferol y ácido ascórbico), minerales, clorofilas α y β y carotenoides (*e.g.* luteína, α -caroteno, β -caroteno, xantofilas); además, a partir de su metabolismo secundario, puede sintetizar compuestos fenólicos (*e.g.* flavonoides y ácidos fenólicos). En particular, la identificación de dichos compuestos bioactivos permite su aplicación como agentes antitumorales, antiinflamatorios, antioxidantes y antimicrobianos (*e.g.* bactericidas y antifúngicos) (Stramarkou *et al.* 2017; Yadavalli *et al.* 2018; Prabakarana *et al.* 2018; Bhuvana *et al.* 2019). Por ejemplo, utilizando metanol como solvente, Prabakarana *et al.* (2018) extrajeron diversos compuestos bioactivos de *C. vulgaris* y lograron identificar la presencia de alcaloides, flavonoides, triterpenos, glicósidos, taninos y fenoles a concentraciones de 72, 51, 62, 58, 23, 47 y 91 mg/g, respectivamente. Por su parte, Bhuvana *et al.* (2019) identificaron y caracterizaron por CLAR (Figura 12) compuestos bioactivos extraídos de *C. vulgaris*. Los compuestos fenólicos que presentaron los picos mayoritarios en el cromatograma fueron quercetina (32.76 min), ácido cicórico (43.14 min), ácido cafeico (34.80 min) y luteína (35.24 min) (Figura 12a). Además, se identificaron tocoferoles, siendo el α -tocoferol (3.5 min) y δ -tocoferol (28.66 min) (Figura 12b) los que mostraron los mayores picos en el cromatograma.

En otro estudio llevado a cabo por Yadavalli *et al.* (2018), se aislaron e identificaron flavonoides utilizando CLAR a partir de biomasa de *Chlorella sp.* Se determinó la presencia de flavonoides incluyendo cafeína (5.26 min), epicatequina (6.54 min), epigallocatequina galato (11.32 min) y ácido protocatequico (7.15 min), siendo la epicatequina el más abundante.

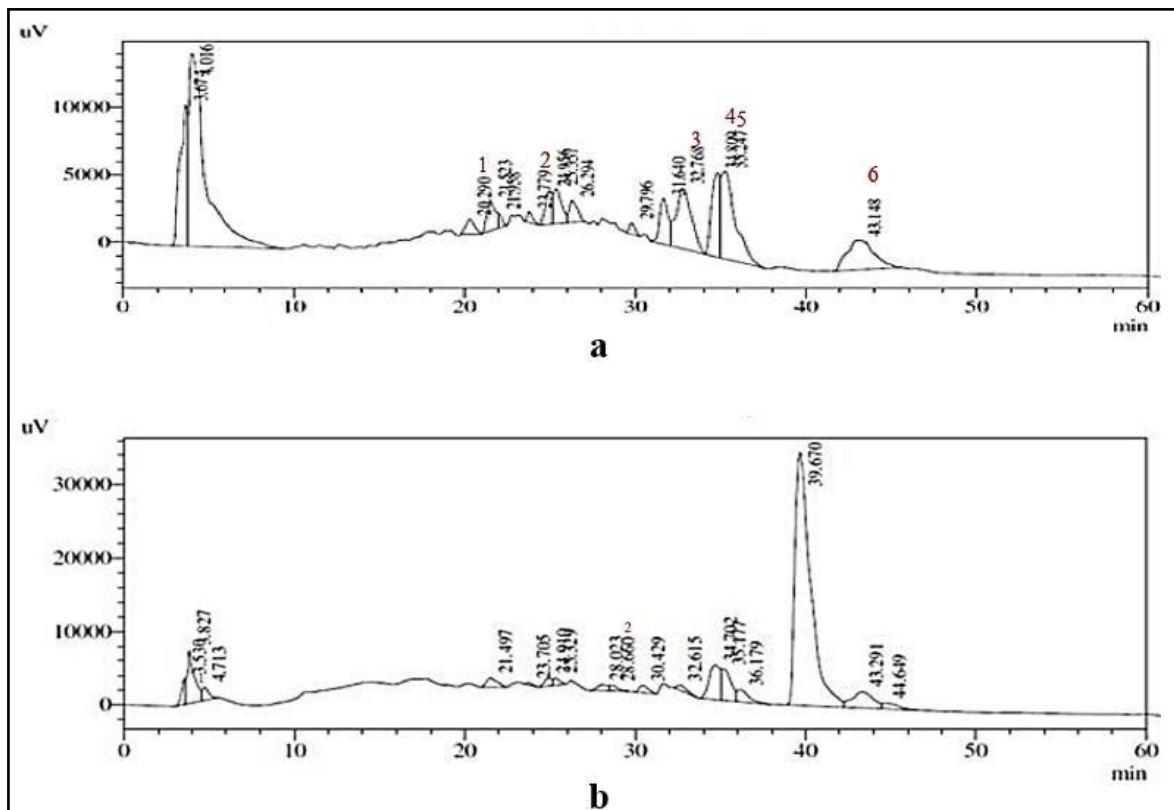


Figura 12 Perfiles cromatográficos obtenidos por CLAR para el extracto metanólico de *C. vulgaris*: a) cromatograma de polifenoles, 1) ác. clorogénico, 2) ác. cafeico, 3) quercetina, 4) ác. cafeico y 5) luteína, y b) cromatograma de tocoferoles, 1) α -tocoferol y 2) δ -tocoferol.

(Bhuvana *et al.* 2019)

II.6.5.1 Condiciones de cultivo para la síntesis de compuestos bioactivos

Aremu *et al.* (2015) determinaron que el contenido de compuestos fenólicos en un cultivo de *Chlorella* sp dependía de la concentración de nitrógeno. En condiciones con periodos luz/oscuridad de 14:10 h a 25°C y con inyección de CO₂ constante por aireación por 12 días, la síntesis de compuestos fenólicos y flavonoides mejoró utilizando bajas concentraciones de nitrógeno (35 μ g/mL) en el medio de cultivo; tal comportamiento se debió al estrés fisiológico que ocasionó la baja de dicho macronutriente. Por el contrario, a concentraciones altas de nitrógeno (700 μ g/mL) la síntesis de compuestos fenólicos disminuyó debido al abastecimiento suficiente del macronutriente. Además, se comprobó que el periodo de tiempo de cultivo fue otro factor que influyó en la síntesis de compuestos fenólicos.

En otro estudio, Ahn *et al.* (2016) evaluaron el efecto de la temperatura sobre el rendimiento de ácidos grasos y compuestos bioactivos en un cultivo de *C. vulgaris*, el cual se desarrolló en condiciones de luz/oscuridad de 16:8, con BBM como medio de cultivo y en el que se compararon dos temperaturas 20 y 10 °C. A la temperatura más baja se obtuvo la siguiente composición de ácidos grasos: a) saturados, ácido hexadecanoico (C16:0, 32.78 %) y ácido octadecanoico (C18:0, 0.32 %), b) monoinsaturados, ácido octadecenoico (C18:1, 3.76 %) y c) poliinsaturados, ácido hexanoico (C16:2, 5.07 %), ácido octadecadienoico (C18:2, 3.81 %), ácido hexadecatrienoico (C16:3, 27.69 %) y ácido octadecatrienoico (C18:3, 24.26 %). Se determinó que los ácidos grasos con mayores porcentajes (*i.e.* C16:3, C16:0 y C18:3) fueron significativamente más altos que los obtenidos a temperatura de 20 °C. Los autores mencionaron que la síntesis de estos ácidos grasos se debió a la respuesta fisiológica de la microalga para mantener la fluidez de la membrana celular y tolerar las bajas temperaturas; además, el proceso de adaptación a condiciones extremas ocasionó también la síntesis de compuestos bioactivos como ácidos orgánicos y vitaminas, por ejemplo, se obtuvieron concentraciones de ácido ascórbico de 0.11 µg/mL a 10 °C en la fase estacionaria y de neofitadieno de 0.30 µg/mL a 10 °C.

Por su parte, Kim *et al.* (2014) examinaron el efecto de diferentes tipos de luz, utilizando iluminación continua azul ($\lambda_{max} = 430 - 465$ nm) y roja ($\lambda_{max} = 630 - 665$ nm), sobre la síntesis de ácidos grasos. Cultivando *C. vulgaris* a 26 °C, se obtuvieron rendimientos de 10.65 y 11.07 % para la luz azul y roja, respectivamente. Los autores mencionaron que el rendimiento de ácidos grasos aumentó por la influencia que la longitud de onda de la luz en el desarrollo celular y, por lo tanto, en la producción de ácidos grasos.

Así mismo, Yadavalli *et al.* (2018) determinaron la relación existente entre dos modos de cultivo de *Chlorella* sp y el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides. En el modo fototrófico, utilizaron el medio BG11 como fuente de nutrientes, iluminación $55 \mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ y aireación constante, mientras que, en el cultivo heterotrófico emplearon glucosa como fuente de nutrientes, temperatura ambiente y oscuridad constante. Se obtuvieron 1,210 mg PE/g de fenoles y 870 mg RE/g de flavonoides en condiciones heterotróficas, siendo mayores que las obtenidas en condiciones fototróficas.

Así mismo, la epicatequina fue la de mayor abundancia en ambos modos de cultivo. La producción de flavonoides en cultivo heterotrófico es debido a la falta de iluminación que ocasiona estrés en la microalga, lo que conlleva a la inhibición en la síntesis pigmentos.

II.6.5.2 Aplicación de compuestos bioactivos con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos

Vehapi *et al.* (2019) estudiaron la actividad antifúngica del extracto metanólico de *C. vulgaris* a una concentración de 1 mg/mL contra los hongos fitopatógenos *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* y *Penicillium expansum*, presentando inhibición de micelio de 43, 25 y 15 mm, respectivamente; la actividad antifúngica se atribuyó a la presencia de compuestos fenólicos como polifenoles y terpenos, ácidos grasos y polipéptidos.

En el estudio llevado a cabo por Righini H. (2020) se determinó que el extracto acuoso de *C. vulgaris* a concentraciones de 3 y 20 mg/mL reducía en 35 y 48 % los síntomas de marchitez de raíces en plántulas ocasionados por el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. En este caso, la actividad antifúngica del extracto acuoso se atribuyó a la presencia de compuestos bioactivos, tanto del metabolismo primario (*e.g.* polisacáridos -carragenano-, ácidos grasos), como del metabolismo secundario (*e.g.* florotaninos, terpenos, lectinas, alcaloides y compuestos halogenados).

A su vez, Perveen *et al.* (2021) determinaron 67, 60, 53 y 54% de inhibición contra *Fusarium oxysporum*, *F. spp*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, respectivamente, aplicando el extracto metanólico de *C. vulgaris* a 0.5 mg/mL; además, identificaron los compuestos bioactivos con potencial actividad antifúngica, incluyendo a ácidos grasos como el ác. eicosanoico, el ác. esteárico y el ác. oleico. Se estableció que los ácidos grasos con más de 10 carbonos pueden dañar la pared y membrana celular, conllevando a la pérdida de los organelos e induciendo así la inhibición de desarrollo de conidios e hifas.

Los compuestos bioactivos obtenidos de microalgas (Figura 13) pueden ser susceptibles de degradarse y/o volatilizarse, lo cual reduce su eficacia y aplicación. Para evitar dichos inconvenientes es necesario realizar procesos de formulación con ingredientes (*e.g.* polímeros, surfactantes y estabilizadores) que puedan mejorar la aplicación, adherencia y liberación controlada de los compuestos bioactivos (Gómez-Loredo *et al.* 2015; Borges *et al.* 2018; De Souza *et al.* 2019).

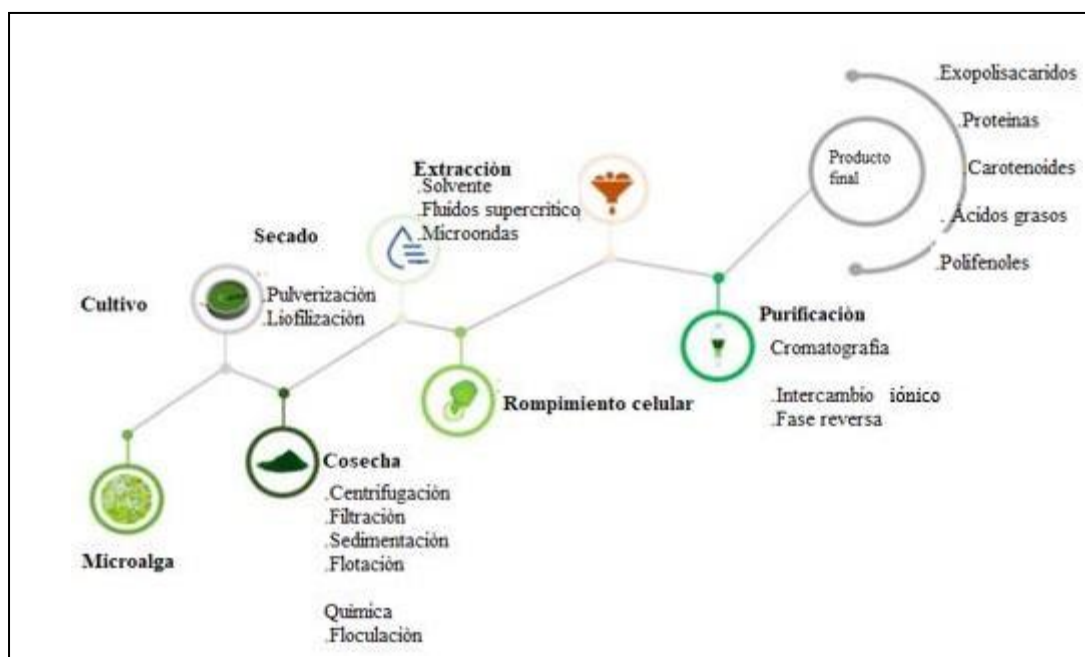


Figura 13 Procesos involucrados en la obtención de los bioproductos de microalgas.

II.7 Nanotecnología en el sector agrícola

La nanotecnología es la manipulación de la materia en una dimensión aproximada de 1-100 nm. En la agricultura (Figura 14) se ha aplicado, principalmente, para la protección de plantas de cultivo contra fitopatógenos y para suministro de nutrientes. Uno de los principios más buscados consiste en generar formulaciones basadas en nanopartículas con el fin de liberar de manera controlada compuestos bioactivos (Duhan *et al.* 2017; Athanassiou *et al.* 2018; Pascoli *et al.* 2018; Shukla *et al.* 2019).

Debido a que las plantas de cultivo son atacadas por hongos fitopatógenos, el uso de compuestos bioactivos de origen botánico es una alternativa de control biológico. Mediante la encapsulación del compuesto bioactivo en nanopartículas, se pueden formar sistemas poliméricos de liberación controlada que prolonguen el efecto de los

compuestos bioactivos en sitios específicos de las plantas. Además, en las nanoformulaciones se pueden incorporar compuestos hidrófobos, incrementando así su solubilidad en medio acuoso y facilitando su interacción con estructuras vegetales. Finalmente, la nanoencapsulación puede mejorar la estabilidad de los compuestos bioactivos, ya que, puede protegerlos de ser degradados (*i.e.* fotodegradación, hidrólisis) y/o de evaporarse (Ojha *et al.* 2018; Ingle *et al.* 2019).

II.7.1 Nanopartículas poliméricas

Las nanopartículas poliméricas (NP) están formadas de materiales macromoleculares y son definidas como una subclase de partículas ultrafinas con características dimensionales de 1 hasta 400 nm, las cuales tienen propiedades únicas y diferenciadoras de partículas de escala micrométrica con composición química similar. Principalmente, el tamaño de partícula, su área superficial y su composición química definen sus propiedades y sus potenciales aplicaciones (Athanassiou *et al.* 2018). De los diversos nanosistemas de liberación existentes, las NP ofrecen las ventajas de funcionar como acarreadores y de proteger a los compuestos bioactivos que se han sido incorporados y/o encapsulados (Ingle *et al.* 2019).

Dependiendo de la técnica de preparación de las NP, estructuralmente, se pueden obtener nanoesferas o nanocápsulas (Figura 15). En el caso de las nanoesferas, los compuestos bioactivos están distribuidos al azar en la matriz polimérica o en su superficie. Por su parte, las nanocápsulas presentan un núcleo con una cavidad aceitosa o acuosa, en donde el compuesto bioactivo, comúnmente hidrofóbico, es incorporado y luego encapsulado por el polímero. La liberación controlada del compuesto bioactivo, ya sea incorporado o encapsulado, dependerá de las propiedades de degradación y permeabilidad del polímero (Athanassiou *et al.* 2018; Ingle *et al.* 2019).

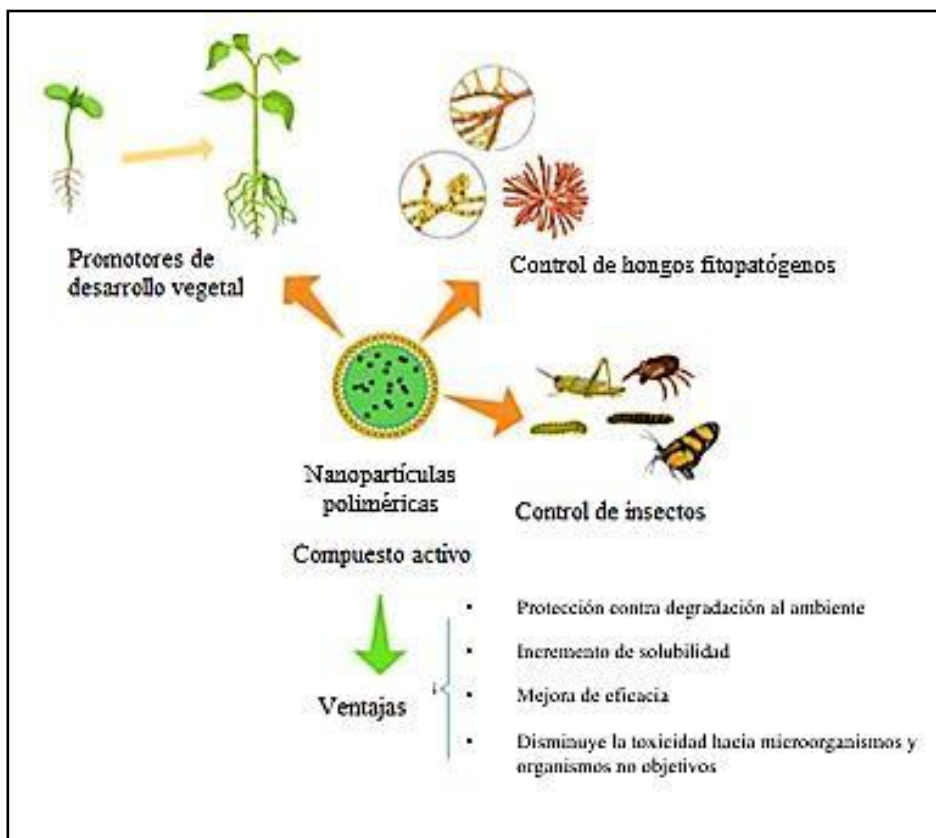


Figura 14 Aplicaciones de la nanotecnología en el desarrollo de la agricultura mediante nanopartículas poliméricas (Pascoli *et al.* 2018).

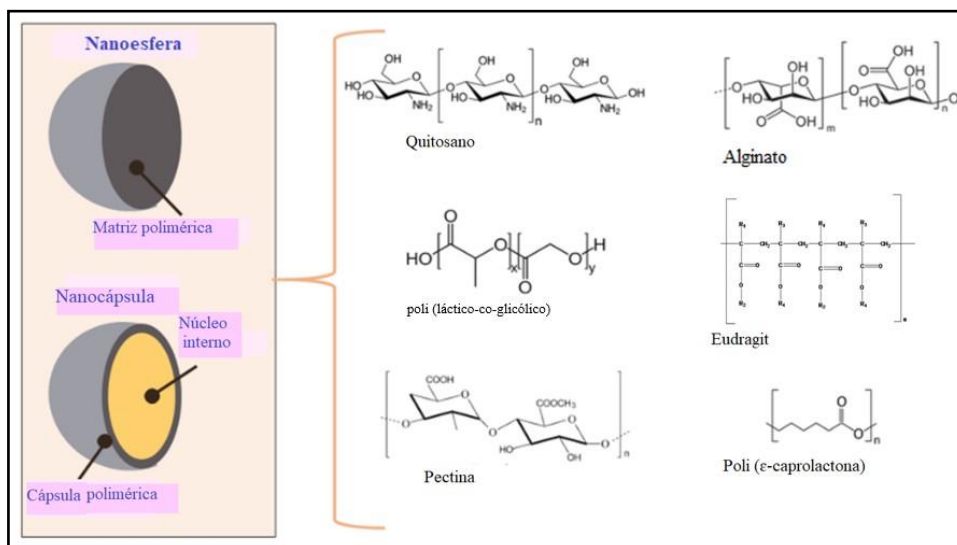


Figura 15 Características estructurales de las nanopartículas poliméricas utilizadas en la agricultura (Pascoli *et al.* 2018).

Las NP pueden ser sintetizadas utilizando diferentes tipos de polímeros biodegradables, ya sean naturales o sintéticos (Figura 15). Los polímeros naturales o biopolímeros son sintetizados por plantas, microorganismos (*e.g.* hongos) o animales. Los biopolímeros incluyen a la celulosa, quitina, quitosano, proteínas y péptidos. En la agricultura el quitosano y la pectina son los biopolímeros mayormente utilizados para la preparación de nanopartículas debido a que se encuentran ampliamente disponibles en la naturaleza, son biodegradables, no tóxicos y pueden ser producidos a gran escala (Ojha *et al.* 2018; Pascoli *et al.* 2018).

Entre los polímeros sintéticos utilizados para la preparación de nanopartículas se encuentran el poli(láctico-*co*-glicólico) (PLGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), ácido poli(láctico) (PLA) y poli(metilmetracrilato) (Eudragit). En general, estos polímeros poseen propiedades hidrofílicas/hidrofóbicas variables, lo que permite la liberación eficiente de compuestos bioactivos en ambientes con distintas características de pH y concentración de iones, entre otras (Ojha *et al.* 2018; Pascoli *et al.* 2018).

Generalmente, los biopolímeros son utilizados por su compatibilidad y capacidad biodegradable, pero continuas desviaciones en sus propiedades, de lote a lote, limitan su uso. Por el contrario, la forma de obtención de los polímeros sintéticos hace que su composición presente pocas variaciones (Ingle *et al.* 2019). Debido a su composición química, polímeros como el Eudragit son frecuentemente utilizados en la preparación de sistemas de liberación nanoparticulados (Figura 16). Una de sus principales características es su sensibilidad a cambios en el pH del medio en el que se encuentran, lo cual se debe a la presencia de grupos funcionales ionizables como aminas y carboxilatos. La ionización de dichos grupos puede resultar en la solubilización o hinchamiento del polímero y, por lo tanto, de la NP (Ojha *et al.* 2018; Camara *et al.* 2019)

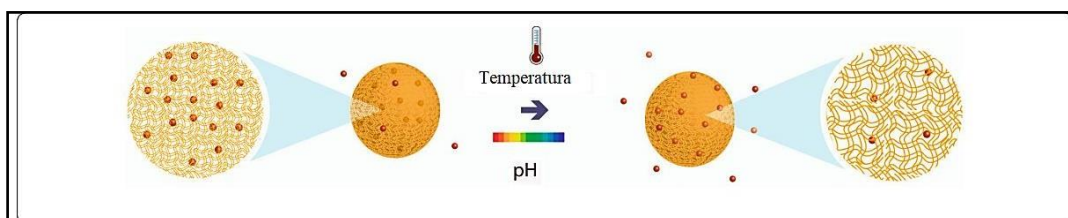


Figura 16 Liberación de compuestos activos por la modificación del material polimérico en respuesta al pH y la temperatura.

(Camara *et al.* 2019)

II.7.2 Compuestos bioactivos encapsulados en nanopartículas poliméricas

Valletta *et al.* (2014) investigaron la captación de NP de ácido poli(láctico-co-glicólico) cargadas con Cumarina-6 fluorescente en plántulas de *Vitis vinifera*; además, estudiaron su permeabilidad en la membrana y pared celular de los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *A. niger* y *A. carbonarius*. Se obtuvieron NP con tamaños de 30 a 600 nm con 20 mg/g de Cumarina 6 y se determinó que eran capaces de internalizarse en las membranas celulares fúngicas (Figura 17). De igual manera, a las 3 h de entrar en contacto con las raíces, las NP cargadas fueron absorbidas, encontrándose en la rizodermis, particularmente, en los tricoblastos. A las 48 h, las NP alcanzaron el sistema vascular central, permitiendo su distribución hasta los brotes. Al aplicarse NP cargadas a nivel foliar, a los 15 min habían penetrado el estoma y a los 30 min eran visibles en las células de guarda; finalmente, hasta las 12 h fueron visibles en el tejido mesófilo, siendo más abundantes en el parénquima en empalizada.

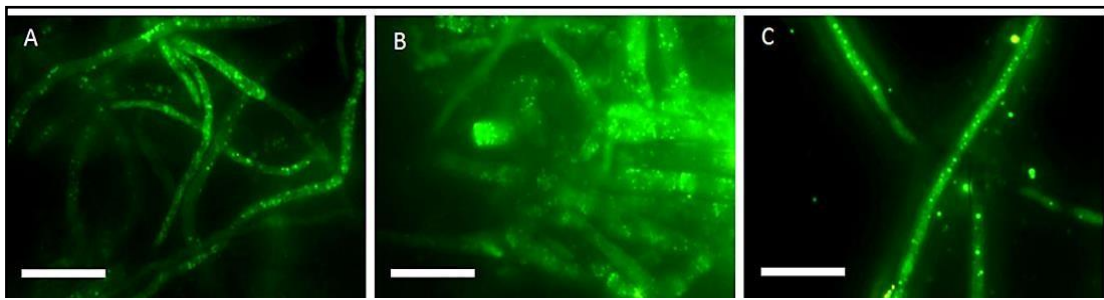


Figura 17 Análisis por microscopia de epifluorescencia en cepas de a) *B. cinerea* b) *A. carbonarius* y c) *A. niger*.

(Camara *et al.* 2019)

En otro estudio, Martínez-Rivas *et al.* (2017) encapsularon la fracción hexánica del extracto de hojas de *L. frutescens* en NP de ácido poli(láctico), obteniendo tamaños de 189.70 ± 3.80 nm con una distribución homogénea. Además, tomando en cuenta los 4 picos principales de un cromatograma obtenido por CLAR, se determinó que los % de eficiencia de encapsulación fueron de 44, 74, 86 y 97 %, para cada pico, respectivamente. Los mayores porcentajes de eficiencia de encapsulación se presentaron en los compuestos hidrofóbicos.

Por su parte, Antonioli *et al.* (2020) extrajeron de la hierba de limoncillo β -mirceno, citral A y citral, componentes de aceites esenciales, y los encapsularon en NP de ácido

poli(láctico). Además, se evaluó la actividad antifúngica de las NP contra las especies de hongos fitopatógenos *C. acutatum* y *C. gloeosporioides*. En el estudio se obtuvieron nanocápsulas con un tamaño promedio de 96 nm, potencial zeta de -25.2 mV y una eficiencia de encapsulación del 99 %. La completa inhibición de conidios de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* por los compuestos no encapsulados se obtuvo a una CMI de 0.025 % (v/v), mientras que, para los compuestos nanoencapsulados se dio a 0.1% (v/v). Los autores atribuyeron la diferencia entre las CMI a que los compuestos no encapsulados estaban en contacto con los conidios, obteniendo una inhibición en corto tiempo, pero con pérdida rápida de actividad; por el contrario, los compuestos del aceite esencial nanoencapsulados permearon la nanocápsula, liberándose de manera paulatina e inhibiendo los conidios de manera más lenta, pero más eficaz.

En el estudio llevado a cabo por Pina-Barrera *et al.* (2019) se extrajo aceite esencial a partir de hojas *Thymus vulgaris* y se identificaron como los componentes más abundantes al *o*-cimeno, el timol y el γ -terpineno. Dichos compuestos fueron encapsulados en NP utilizando Eudragit L 100-55 como polímero. La formulación de NP presentó un diámetro promedio de 153.9 ± 4.7 nm, un PDI= 0.186 ± 0.011 , un $\zeta = -4.11 \pm 0.170$ mV y una % EE de 52.81 ± 2.69 . La densidad de carga negativa de la nanocápsula se atribuyó a los grupos ionizables del Eudragit L 100-55. Este aspecto resultó relevante, ya que, los autores asumieron que dicha densidad de carga podría favorecer la interacción de la nanocápsula con la pared y membrana celular de hongos fitopatógenos (*e.g Botrytis spp* y *Aspergillus spp*), lo cual permitiría la liberación más directa de los compuestos bioactivos desde las nanocápsulas hacia las células de los hongos.

III JUSTIFICACIÓN

Por su aportación al PIB nacional, la agricultura es una de las actividades prioritarias en México. Además, globalmente nuestro país se ubica entre los principales exportadores de alimentos (Nacional 2016). Según el Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), el aumento de plagas de hongos fitopatógenos *Fusarium* es preocupante, ya que, son causantes de marchitamientos y pudriciones en cultivos de frutas y hortalizas, llegando a causar pérdidas mayores al 50 % con repercusiones económicas significativas para el país. Esta situación demanda de alternativas innovadoras para el control de *Fusarium* spp, por lo que, el control biológico es una opción viable que contribuye al desarrollo de la agricultura sustentable.

En particular, las microalgas del género *Chlorella* generan una biomasa de alto valor, de la cual se pueden obtener extractos con compuestos bioactivos que posean actividad antifúngica. Sin embargo, debido a que dichos extractos son obtenidos con solventes orgánicos, para su aplicación en campo y el aprovechamiento de su actividad biológica contra hongos fitopatógenos, los extractos deben ser incorporados en un vehículo que permita su dosificación. Especialmente, la incorporación de extractos vegetales en nanopartículas poliméricas podría hacer viable su aplicación, ya que, pueden obtenerse formulaciones libres de solventes orgánicos. Adicionalmente, el extracto nanoencapsulado queda protegido de factores ambientales que inducen su degradación (*e.g.* radiación UV, oxígeno) y, dependiendo del polímero utilizado en la nanoencapsulación, puede presentar una liberación controlada desde las nanopartículas, lo que podría favorecer su actividad biológica. En este contexto, el objetivo del presente trabajo fue formular extractos de *Chlorella vulgaris* en nanopartículas poliméricas y determinar su actividad contra *Fusarium* sp a fin de evaluar su potencial aplicación en el tratamiento de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

IV HIPÓTESIS

- Los extractos de *Chlorella vulgaris* contienen compuestos bioactivos con actividad antifúngica que al ser encapsulados en nanopartículas poliméricas son viables en el control del hongo fitopatógeno *Fusarium* sp.

V OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar una formulación de nanopartículas poliméricas con extracto de *Chlorella vulgaris* y evaluar su actividad contra el hongo fitopatógeno *Fusarium solani*.

VI OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener extractos, por el método maceración, a partir de la biomasa de *C. vulgaris* y realizar su caracterización fitoquímica.
2. Desarrollar una formulación de nanopartículas poliméricas con el extracto de *C. vulgaris* y caracterizarla fisicoquímicamente en función del tamaño, índice de polidispersidad, potencial zeta, análisis por espectroscopia infrarroja, porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación.
3. Comparar el extracto libre y la formulación de nanopartículas poliméricas-extracto en función de su actividad antifúngica contra el hongo fitopatógeno *F. solani*.

VII MATERIAL Y MÉTODOS

VII.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

La cepa *C. vulgaris* se adquirió en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C (CIBNOR). Para su mantenimiento, se utilizó el medio de cultivo 3N-BBM+V (CCAP) basado en el Bold Basal Medium (BBM), el cual presenta la siguiente composición (Tabla II).

Tabla II Compuestos del medio de cultivo 3N-BBM+V.

Compuestos	% (p/v)
NaNO₃	2.5
CaCl₂·2H₂O	0.25
MgSO₄ · 7H₂O	0.75
<i>such</i> K₂HPO₄ · 3H₂O	
KH₂PO₄	1.75
NaCl	0.25
Vitamina B1	0.12
Vitamina B12	0.1
Metales Traza	mg/L
Na₂EDTA	0.75
FeCl₃ · 6H₂O	97
MnCl₂ · 4H₂O	41
ZnCl₂ · 6H₂O	5
CoCl₂ · 6H₂O	2
Na₂MoO₄ · 2H₂O	4

El medio de cultivo 3N-BBM+V se utilizó como medio adaptativo y de mantenimiento, para lo cual, se tomaron 15 mL de *C. vulgaris* que se adicionaron en 2.5 L de medio 3N-BBM+V, previamente esterilizado en autoclave a 120 °C, 15 kPA por 15 min. El cultivo (Figura 18) se mantuvo, durante 15 días, en agitación constante mediante aireación por burbujeo, a temperatura ambiente, con incidencia de luz blanca Led de 2500 a 3000 lx por 12 h, alternando con 12 h de oscuridad.



Figura 18 Cultivo inicial de *C. vulgaris*.

Con el fin de obtener suficiente biomasa para los experimentos posteriores, se procedió a montar cultivos estandarizados de *C. vulgaris* en fotobiorreactores (PBRs) de 8 L. El escalamiento del cultivo, así como la curva de desarrollo de biomasa conforme a los días de cultivo, y demás parámetros de crecimiento, se realizaron de acuerdo a lo descrito en la literatura por otros autores (Hajimahmoodi *et al.* 2010; Arbib *et al.* 2014; Khalili *et al.* 2015; Asadi *et al.* 2020). Para ello, se realizó el montaje de un PBR, con agitación constante similar a una columna de burbujeo, de tipo *batch*, y de modo fototrófico (Figura 19). Al PBR, se le adicionaron 800 mL del cultivo inicial de *C. vulgaris* y como fuente de nutrientes el fertilizante comercial ULTRASOL® MULTIPROPOSITO NPK (18-18-18) cuya concentración de nutrientes (% p/p) se describe en la Tabla III, dicho cultivo se consideró como el Cultivo Madre de *C. vulgaris* (CM_{Cv}); las demás condiciones de cultivo se describen en la Tabla IV.

El CM_{Cv} se mantuvo en crecimiento durante tres semanas para tener un desarrollo adecuado de la biomasa. A la tercera semana, se tomaron 50 mL, se centrifugaron (SOLBAT-C-40) a 10 000 rpm/10 min para sedimentar la biomasa, la cual se dejó en desecación en un horno a 40 °C por 6 h. La biomasa recuperada seca se pesó para determinar su contenido por volumen de medio de crecimiento.

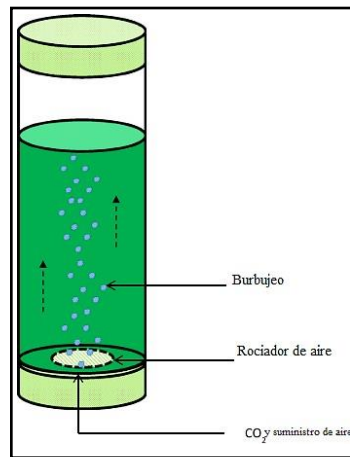


Figura 19 Representación esquemática del fotobiorreactor por columna de burbujeo (Gupta *et al.* 2015)

Tabla III Información técnica del fertilizante ULTRASOL[®] MULTIPROPOSITO NPK (18-18-18)

Compuestos	% (p/p)
N	18
NO₃	5.3
NH₄	5.1
NH₂	7.8
P₂O₅	18
K₂O	18
MgO	2.0
SO₃	3.5
B	0.02
Cu	0.002
Fe	0.03
Mn	0.02
Mo	0.001

Tabla IV Condiciones físicas del Cultivo Madre de *C. vulgaris* (CM_{cv}).

Condiciones						
Inóculo inicial (mL)	Medio de cultivo (mL)	Temperatura (°C)	Periodos de luz		pH	Volumen final PBR (L)
			(lx)	(h)		
800	7200	25	2500	12	7.5	8

Una vez conocida la concentración en (g/L) del CM_{cv} , se tomaron volúmenes de 50 mL y se diluyeron en las siguientes proporciones 1:12, 1:6, 1:5.4, 1:5.2, 1:4, 1:2 y 1:1.5. Se determinó la absorbancia de cada dilución a $\lambda = 686$ nm (Spectrophotometer – Jenway, Model 6305) y se obtuvo la curva de calibración respectiva, asociando las absorbancias con el contenido de biomasa (g/L) de cada dilución.

La curva de calibración fue utilizada para determinar el desarrollo de biomasa en (g/L) durante 17 días de cultivo, así como, para obtener los parámetros de crecimiento y de productividad de biomasa (Formulas 1, 2, 3 y 4). Para ello, se tomaron volúmenes de 800 mL del CM_{cv} , y se adicionaron a tres PBRs de columna de burbujeo, tipo *batch*, y de modo fototrófico con el fin de obtener Cultivos Estándar de *C. vulgaris* (CS_{cv}). Las condiciones y medios de cultivos para los tres CS_{cv} fueron los mismos que se describieron en las Tabla III y Tabla IV para el CM_{cv} .

VII.2 Determinación de contenido total de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

Con el fin de dar seguimiento a la producción de polifenoles, durante el desarrollo y crecimiento de los CS_{cv} en los PBRs, se estandarizó el método de Folin Ciocalteu. Para ello, a partir de una solución madre de 250 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gálico se realizaron 5 diluciones estándar con concentraciones entre de 2 y 12 $\mu\text{g/mL}$. Posteriormente se agregaron 100 μL de reactivo de Folin y 300 μL de Na_2CO_3 al 20 % (p/v), llevándose a un volumen final de 2 mL.

- **TASA DE CRECIMIENTO**

$$\mu (d) = \frac{\text{Ln} \left(\frac{X_f}{X_o} \right)}{t_2 - t_1}$$

Fórmula 1

Donde:

μ : Tasa de crecimiento.

X_f y X_o : Concentración de biomasa (g/L) final e inicial, respectivamente.

t_2 y t_1 : Tiempos (días) de la fase de crecimiento celular final e inicial, respectivamente.

- **DIVISIÓN CELULAR POR DÍA**

$$\text{División celular por día} = \frac{\mu}{\text{Ln}2}$$

Fórmula 2

Donde:

μ = Tasa de crecimiento por día.

- **DUPLICACION DE BIOMASA POR DÍA**

$$\text{Duplicación biomasa por día} = \frac{\text{Ln}2}{\mu}$$

Fórmula 3

Donde:

μ = Tasa de crecimiento por día.

- **PRODUCTIVIDAD DE BIOMASA**

$$P_B = \frac{\mu * (0.9 * X_{max} - 1.1 * X_o)}{\text{Ln} \left(\frac{9 * (X_{max} - 1.1 * X_o)}{1.1 * X_o} \right)}$$

Fórmula 4

Donde:

P_B : Productividad de biomasa.

X_{max} : Es la máxima concentración registrada al final del experimento (mg/L).

X_o : Concentración inicial de biomasa (mg/L).

μ = Tasa de crecimiento por día.

Los grupos fenólicos que reaccionaron con el reactivo Folin-Ciocalteu dieron una

coloración azul, por lo que, se midió la absorbancia a una $\lambda = 765$ nm (Espectrofotómetro de microplacas, BioTek Instruments, Epoch).

Para la determinación de polifenoles totales en la biomasa seca de *C. vulgaris*, cada tercer día y durante 17 días de cultivo se tomaron muestras de 50 mL (n=3) de los PBRs de *CS_{cv}*. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min (Allegra 64R Centrifuge, Beckman-Coulter) y la biomasa sedimentada se desecó a 40 °C por 6 h. Posteriormente, se pesaron 14 mg de biomasa seca y se les agregó 2.7 mL de metanol (n=3), manteniéndose en agitación constante por 24 h. Se tomaron 2.2 mL de la extracción y se llevó a un aforo de 5 mL. De esta dilución A (n=3) se tomaron 1.5 mL y se agregó 100 μ L de reactivo de Folin y 300 μ L Na_2CO_3 al 20 % (p/v), llevando a un aforo de 2 mL con agua destilada. Se midió la absorbancia a una $\lambda = 765$ nm (Espectrofotómetro de microplacas, BioTek Instruments, Epoch). Finalmente, se calculó la concentración en μ g equivalentes de ácido gálico/mg en la biomasa durante los 17 días de cultivo (Hajimahmoodi *et al.* 2010).

VII.3 Obtención de extractos a partir de biomasa de *C. vulgaris*

Después de los 17 días de cultivo, en los que *C. vulgaris* alcanzó la fase estacionaria, se recuperó la biomasa suspendida en los PBRs y se centrifugó (SOLBAT-C-40) a 10 000 rpm por 10 min. La biomasa sedimentada se recuperó y se mantuvo en desecación a 40 °C por 8 h. Finalmente, la biomasa seca fue pesada para calcular su rendimiento de producción.

Para la obtención de los extractos, la biomasa seca fue macerada con metanol durante 3 días. Posteriormente, el macerado fue filtrado y el solvente fue evaporado a presión reducida utilizando un evaporador rotativo (Laborota 4003, HB control, Heidolph Instruments). El extracto seco fue pesado y el rendimiento de extracción fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{extracto (g)}}{\text{biomasa (g)}} \times 100$$

Fórmula 5

Los extractos se mantuvieron resguardados en refrigeración en 4 °C en viales ámbar

estériles hasta su posterior uso.

VII.4. Caracterización del extracto de la biomasa de *C. vulgaris*

El extracto crudo de la biomasa de *C. vulgaris* se disolvió en metanol y se analizó, a través de ensayos fitoquímicos de identificación (Tabla V), para determinar el tipo de compuestos que contenía.

Tabla V Ensayos fitoquímicos para la caracterización de compuestos bioactivos presentes en el extracto de *C. vulgaris*.

Ensayo	Método
Esteroles y triterpenos <i>Prueba de Liebermann-Buchard</i>	Se mezcla 1 mL de anhídrido acético y 1 mL de cloroformo; se enfría a 0 °C y se añade esta mezcla al extracto.
Sesquiterpenlactonas <i>Prueba de Baljet</i>	Se agregan 3 gotas de la solución de Baljet al extracto.
Flavonoides <i>Prueba de Shinoda y del H₂SO₄</i>	Se agrega limadura de magnesio al extracto y se aplica calor a la flama para posteriormente adicionar gotas de HCl. El extracto se disuelve en H ₂ SO ₄ .
Taninos vegetales <i>Prueba de FeCl₃</i>	Se añaden gotas de FeCl ₃ al 13% en agua.
Alcaloides <i>Prueba de Dragendorff</i>	Se adicionan de 2 a 3 gotas del reactivo de Dragendorff.

VII.5 Pruebas de solubilidad del extracto de *C. vulgaris*

Se realizaron pruebas de solubilidad con disolventes de distinta polaridad incluyendo: metanol, etanol, isopropanol, acetona y acetato de etilo. Se utilizó 1 mL de disolvente por 1 mg de extracto en tubos de ensayo, sometiéndolo en agitación con vórtex.

VII.6 Preparación de nanopartículas con extracto de *C. vulgaris*

Para incorporar el extracto de *C. vulgaris* en las NP se utilizó la técnica de nanoprecipitación descrita por Fessi *et al.* (1989). Brevemente, se preparó una fase orgánica (5 mL) con el extracto, el polímero Eudragit® S-100 (20 mg/mL) y una mezcla de metanol, isopropanol y etanol. La fase orgánica se inyectó en una fase acuosa de (10 mL) que contenía alcohol polivinílico (5 % p/p) . La difusión del solvente en la fase acuosa indujo la agregación de polímero que dio lugar a la formación de las NP con extracto incorporado (NP-Ex). Los disolventes se eliminaron por evaporación a presión reducida (Figura 20). Adicionalmente, utilizando el mismo procedimiento se prepararon lotes de NP blanco (NP-BCO), es decir, sin extracto.

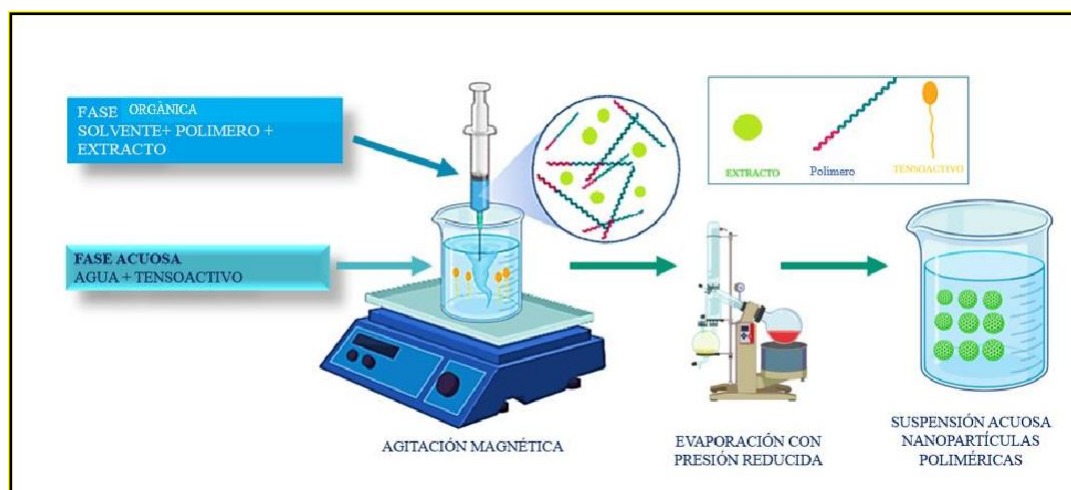


Figura 20 Preparación de nanopartículas poliméricas por el método de nanoprecipitación.

VII.7 Caracterización de fisicoquímica de las NP-Ex y NP-BCO

Para determinar el tamaño de las NP y el índice de polidispersidad (PDI) se realizó un análisis de la muestra por espectroscopia de correlación fotónica (Zetasizer Nano-Z90, Malvern Instruments, UK). Se tomó una muestra de 50 μ L del lote de NP y se diluyó en 2.5 mL de agua destilada. La dilución se colocó en la celda y se realizó la medición. Para la medida de potencial zeta (ζ) se realizó mediante micro-electroforesis láser Doppler (Zetasizer Nano- ZS90, Malvern Instruments, UK). Se tomó 1 mL del lote de NPs y se colocó en la celda con electrodos para obtener la medición respectiva.

VII.8 Análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-FT)

de las NP-Ex y NP-BCO

Se obtuvo el espectro de infrarrojo ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) de los componentes de la formulación (*i.e.* extracto de *C. vulgaris*, Eudragit® S-100), las NP-Ex y las NP-BCO por medio de Espectrofotometría Infrarroja por Transformada de Fourier (Frontier FT-IR, Perkin Elmer, USA) a 64 barridos utilizando un accesorio universal de punta de diamante (UATR, Perkin Elmer, USA). El extracto y el polímero (Eudragit® S-100) se analizaron directamente, mientras que, las NP-Ex y NP-BCO se sometieron previamente a un proceso de desecación durante 1 semana a 40°C .

VII.9 Cuantificación del extracto en las nanopartículas por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-FT)

Se desarrolló un método por espectrofotometría FT-IR (Frontier FT-IR, Perkin Elmer, USA) para cuantificar el extracto encapsulado en las NP-Ex. El método implicó las siguientes etapas:

- a) *Selectividad.* Con la finalidad de seleccionar una señal representativa del extracto se analizó la absorbancia total del extracto y el polímero Eudragit® S-100 formador de la NP a 64 barridos en una región de 4000 a 400 cm^{-1} .
- b) *Linealidad.* Una vez obtenida la señal representativa del extracto se realizó una curva de calibración para cuantificarlo en las NP. A partir de una disolución madre de $5000\text{ }\mu\text{g/mL}$ de extracto disuelto en una mezcla de metanol: etanol (1:1), se realizaron disoluciones estándar a seis niveles de concentración ($300-1800\text{ }\mu\text{g/mL}$) por triplicado. A cada estándar se le determinó el área bajo la curva (ABC) de la banda más alta a partir de las absorbancias ubicadas en la región de $1605 - 1401\text{ cm}^{-1}$ por espectroscopía FT-IR. Posteriormente, se realizó un análisis de regresión lineal del ABC en función de las concentraciones de los estándares del extracto.
- c) *Cuantificación del extracto incorporado en las NPs.* Se prepararon 3 lotes de NP-Ex y se centrifugaron a $25\ 000\text{ rpm}$ durante 2 h. Se recuperaron las pastillas y se secaron en horno a 35°C .

De cada pastilla se pesaron 10 mg y se disolvieron en 2 mL de una mezcla metanol:etanol (1:1), manteniéndose en agitación constante por 24 h. Las soluciones

se analizaron por el método desarrollado por FT-IR y, finalmente, se determinó la eficiencia de encapsulación (% EE) y el porcentaje de encapsulación (% E) en base a las siguientes fórmulas:

$$\%E = \frac{\text{mg de extracto encapsulado}}{\text{mg del polímero} + \text{mg extracto encápsulado}} \times 100$$

Fórmula 6

$$\% EE = \frac{\text{mg de extracto encapsulado}}{\text{mg de extracto en fase orgánica}} \times 100$$

Fórmula 7

VII.10 Preparación de la suspensión de conidios de *Fusarium* sp

El hongo fitopatógeno *Fusarium* sp fue proporcionado por el Departamento de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL y se identificó molecularmente como *F. solani* en el CINVESTAV en Guanajuato, México (Anexo I). La suspensión de conidios de *F. solani* se obtuvo utilizando los métodos descritos por Debourgogne *et al.* (2012) y Caligiore-Gei y Valdez (2015). A partir un cultivo de 7 días en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), se raspó la superficie del micelio de *F. solani* con una espátula estéril y los conidios obtenidos se suspendieron en 10 mL de agua destilada estéril. La suspensión se filtró con gasa estéril y después se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min. Los conidios se resuspendieron en agua y se realizó su conteo en cámara de Neubauer.

VII.11 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos y nanoencapsulados de *C. vulgaris* contra *F. solani*

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó por medio del método de microdilución en caldo (Balouiri *et al.* 2016; Dambolena *et al.* 2012; Sharma *et al.* 2017) según el protocolo M38-4 del CLSI para hongos filamentosos. El ensayo se realizó en microplacas de 96 pozos por triplicado, agregando los reactivos que se describen en la Tabla VI.

El extracto se disolvió en DMSO y se utilizó como control de esterilidad el medio caldo agar papa dextrosa (medio de dilución); además, como testigo se agregaron solamente los conidios de *F. solani* (5×10^4 conidios/mL) y como control positivo de 100% de inhibición se utilizó el fármaco Anfotericina B (Figura 21).

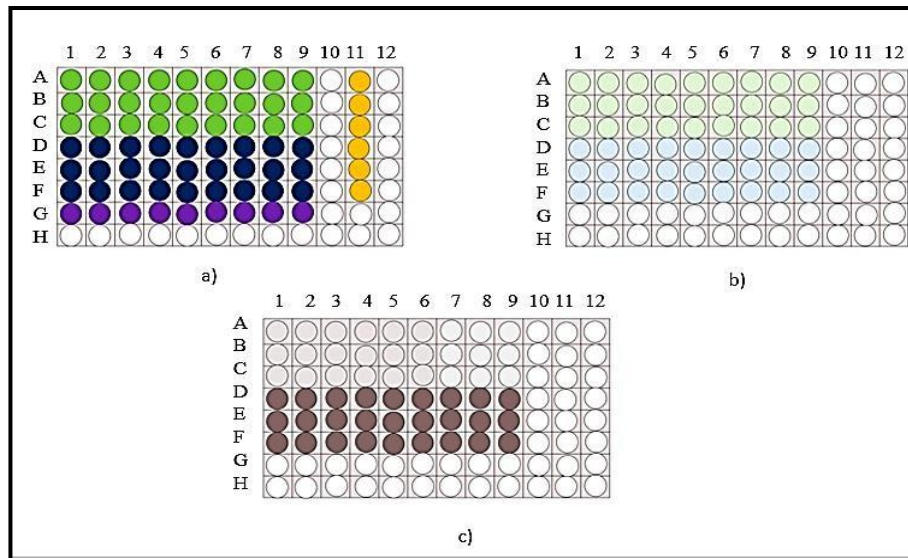


Figura 21 Distribución de los tratamientos en las microplacas:

a) soluciones del extracto y dispersión NP-Ex de mayor a menor concentración en columnas 1-9 filas A-F con conidios de *F. solani*, solución de fármaco Anfotericina B a la misma concentración con conidios de *F. solani* en columnas 1-9 fila G, testigo de crecimiento de conidios de *F. solani* en columna 11, fila A-F.

b) soluciones (blanco) del extracto y dispersión (blanco) NP-Ex de mayor a menor concentración en columnas 1-9 filas A-F, sin conidios de *F. solani*.

c) controles de no actividad antifúngica de DMSO y NP-BCO de mayor a menor concentración en columnas 1-9 filas A-F con conidios de *F. solani*.

Las microplacas se incubaron 48 h, observando la respuesta de los conidios de *F. solani* a los tratamientos aplicados, midiendo la absorbancia a una $\lambda = 600$ nm (Espectrofotómetro de microplacas, BioTek Instruments, Epoch). La actividad antifúngica se determinó según la CLSI como aquella concentración capaz de inhibir el crecimiento del hongo en un 80 % en comparación con el testigo de crecimiento de conidios de *F. solani*.

$$(I \%) = \frac{[Testigo - (Tratamiento - Blanco)]}{Testigo}$$

Donde:

I % = Porcentaje de inhibición.

Tabla VI Sistemas utilizados para determinar la actividad antifúngica

Solución / Dispersión	Concentraciones evaluadas ($\mu\text{g/mL}$)
Extracto <i>C. vulgaris</i>	4-1000
Anfotericina B	2
DMSO	4-1000
NP-Ex ¹	4-1000
NP-BCO ²	4-1000

¹ NP-Ex, dispersión de NP-Ex.

² NP-BCO, dispersión de NP-BCO.

VII.12 Análisis estadístico

Se realizó una prueba Kolmogórov-Smirnov de los datos obtenidos para determinar la distribución normal. Además de un análisis *t-student* de comparación de medias con un nivel de significancia de 0.05 con el programa estadístico *OpenStat* para determinar si había diferencia significativa entre las CMI del extracto crudo, el extracto nanoencapsulado, y el fármaco Anfotericina B (control positivo) en el porcentaje (%) de inhibición de conidios de *F. solani*.

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Cultivo de *Chlorella vulgaris*

La concentración de biomasa del reactor principal CM_{Cv} correspondió a 2 ± 0.76 g de biomasa/L. A partir de esta se obtuvieron las concentraciones (*g de biomasa húmeda/L*) de cada dilución estándar de la curva de calibración, las cuales correspondieron a 0.17, 0.34, 0.38, 0.40, 0.52, 1.00 y 1.40 *g de biomasa húmeda/L*. Se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$DO = 0.7229_{686\text{ nm}} \text{ Biomasa (g/L)} - 0.0555, r^2 = 0.9978$$

Fórmula 9

El desarrollo de la biomasa de *C. vulgaris* en los tres PBR (Figura 22) se obtuvo a las condiciones descritas en la Tabla IV. Como puede observarse en la Figura 23, la concentración inicial en los biorreactores fue de 0.14 ± 0.12 *g biomasa húmeda/L*, que, en la fase exponencial (13 días de cultivo) se logró una 12 ± 1.3 *g biomasa húmeda/L*.

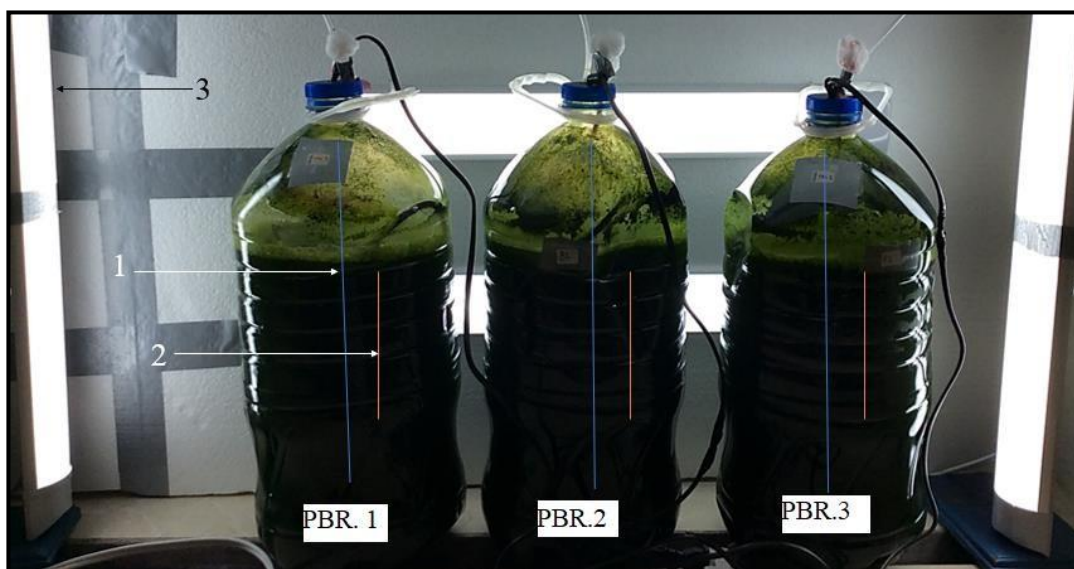


Figura 22 Cultivo estándar de *C. vulgaris* (CS_{cv}) en los fotobiorreactores y sus componentes: 1) Piedras difusoras de aire bombeadas a presión constante, 2) Termostato de acuario a 25 °C y 3) Lámparas de luz led de 25000 y 3000 lx con proyección de luz durante 12 h con un temporizador.

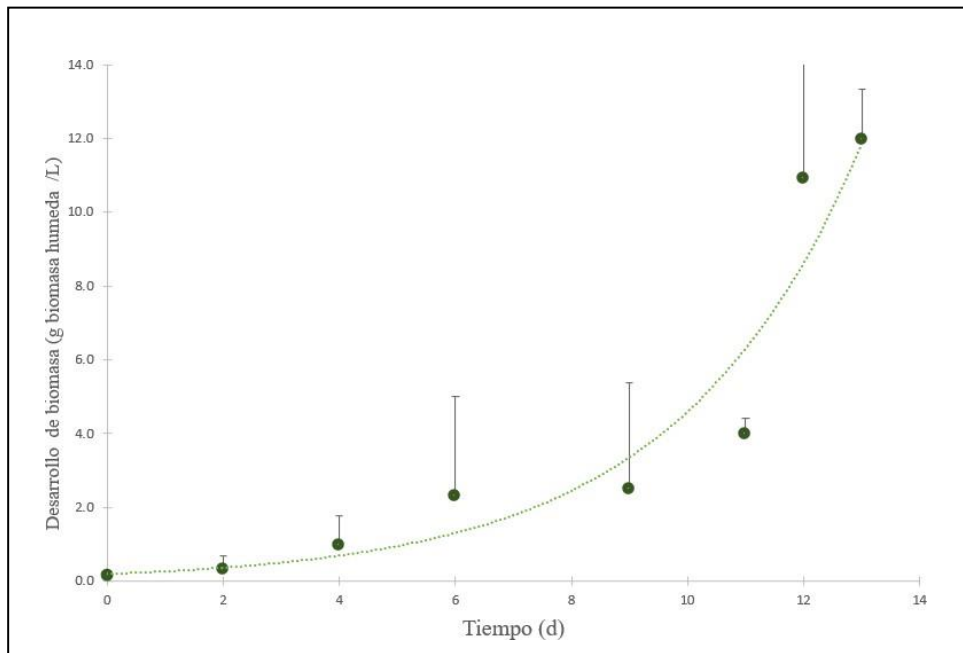


Figura 23 Desarrollo de biomasa de *C. vulgaris* monitoreado durante 13 días de cultivo (n=3, $\bar{X}+SD$).

VIII.2 Determinación de contenido total de polifenoles por el método de Folin-Ciocalteu

Con el fin de dar seguimiento a la producción de compuestos fenólicos durante el cultivo de *C. vulgaris*, y así establecer el tiempo de recuperación de biomasa, se determinó la concentración de polifenoles (EAG/mg de biomasa seca) durante los 17 días de cultivo utilizando la siguiente curva de calibración:

$$D.O = 0.747765_{nm}(\mu g EAG/mg \text{ de biomasa}) - 0.007,$$

$$r^2 = 0.9849$$

Formula 10

Como se puede observar en la Figura 24, el contenido de polifenoles se fue incrementando en la biomasa conforme el cultivo del alga se fue extendiendo. Se pudo determinar que a los 17 días de cultivo se obtuvo la mayor concentración de compuestos fenólicos en la biomasa correspondiendo a un valor de $5 \pm 0.6 \mu g$ EAG/mg de biomasa. Prácticamente, la concentración de polifenoles se cuatuplicó.

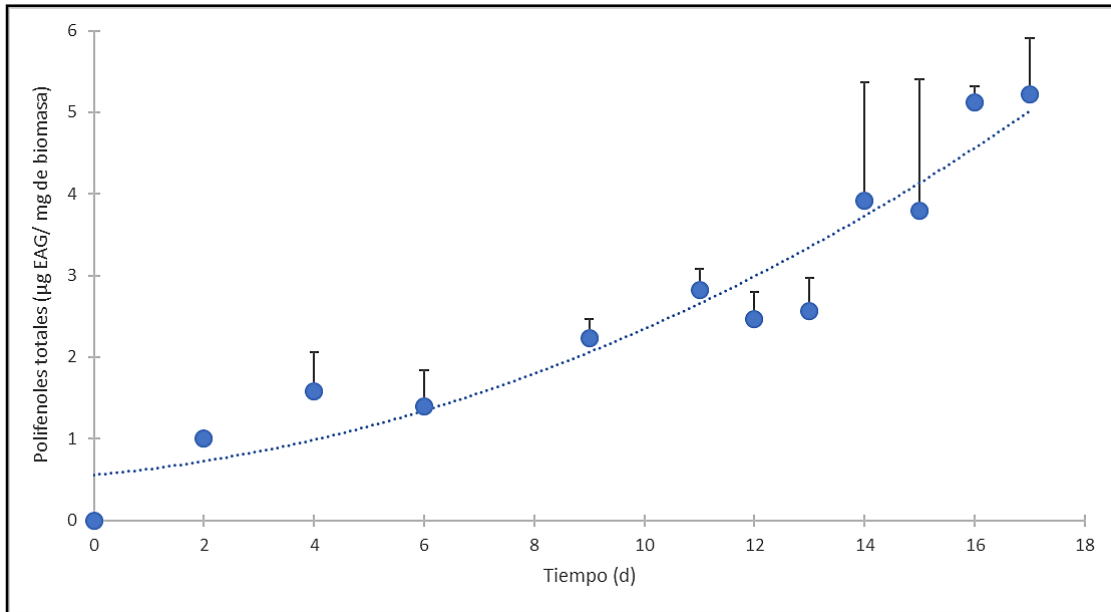


Figura 24 Progresión en la producción de polifenoles totales en la biomasa de *C. vulgaris* durante 17 días de cultivo (n=3, \bar{X} +SD).

En la Tabla VII se muestran los parámetros de desarrollo de la biomasa durante 13 días de los 17 días totales del cultivo. Los resultados obtenidos indican la respuesta metabólica de *C. vulgaris* a las condiciones de cultivo desarrolladas.

Tabla VII Parámetros de desarrollo de biomasa, celular y velocidad de crecimiento de *C. vulgaris* durante 13 días de 17 del cultivo (n=3, \bar{X} +SD).

Velocidad de crecimiento	División celular	Duplicación de biomasa	Productividad de biomasa
(µ/d)	(d)	(d)	(mg/L/d)
0.343± 0.055	0.495 ± 0.079	2 ± 0.313	576 ± 0.095

VIII.3 Obtención y caracterización fitoquímica del extracto metanólico de la biomasa de *C. vulgaris*

A partir de la biomasa seca de *C. vulgaris* se obtuvo un extracto metanólico, el cual tuvo un rendimiento de 36 ± 6.0 %. Posteriormente, el extracto metanólico fue caracterizado fitoquímicamente, determinándose la presencia de flavonoides, alcaloides, triterpenos y sesquiterpenlactonas (Tabla VIII). En cuanto a la solubilidad, el extracto fue parcialmente soluble en metanol, etanol e isopropanol e insoluble en acetato de etilo y acetona (Tabla IX).

Tabla VIII Tamizaje fitoquímico del extracto metanólico de *C. vulgaris*.

Metabolito por identificar	Presencia en el extracto
Esteroles y triterpenos	+
Sesquiterpenlactonas	+
Flavonoides	+
Alcaloides	+

(+) Presente; (-) ausente.

Tabla IX Solubilidad del extracto en disolventes con diferente grado de polaridad.

Disolvente	Solubilidad del extracto
Metanol	++
Etanol	++
Isopropanol	++
DMSO	+++

++ Parcialmente soluble.

+++ Solubilidad total.

VIII.4 Preparación y caracterización fisicoquímica de nanopartículas poliméricas con y sin extracto de *C. vulgaris*

Se obtuvieron NP cargadas con extracto (NP-Ex) y NP blanco (NP-BCO), es decir, sin extracto (Tabla X). Las NP-Ex presentaron un tamaño mayor (117 ± 2.7 nm) en comparación con las NP-BCO (109 ± 3.7 nm), así como, una densidad de carga (ζ) mayor (-7.8 ± 0.37 nm) que las NP-BCO (-4.0 ± 0.78 Mv).

Ambos resultados, el aumento de tamaño y el cambio en la densidad de carga, hacen suponer que el extracto fue incorporado en las NP. En cuanto al IP, que determina la homogeneidad de la dispersión de las NP, al no sobrepasar el valor de 0.2 se puede afirmar que la población de NP-Ex es homogénea, mientras que, la de NP-BCO estuvo en el límite de la homogeneidad.

Tabla X Características fisicoquímicas de las NP-Ex y NP-BCO obtenidas por nanoprecipitación (\bar{X} SD \pm , n=4).

Formulación	Tamaño	IP	Potencial ζ
	(nm)		(mV)
NP-Ex	117 \pm 2.7	0.14 \pm 0.03	-7.8 \pm 0.37
NP-BCO	109 \pm 3.7	0.22 \pm 0.04	-4.0 \pm 0.78

VIII.5 Análisis por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (IR-FT) de la formulación de NP-Ex

Con el objetivo de caracterizar cualitativamente las NP-Ex, se obtuvieron los espectrogramas de 4000 a 400 cm^{-1} de los componentes de la formulación, el extracto metanólico y el polímero Eudragit® S-100 (Figuras 25-A y 25-B). Se identificaron los picos para el extracto, grupo funcionales amina y amida en las regiones de 1605 y 1401 cm^{-1} , respectivamente; por su parte, para el Eudragit S-100 se determinó la presencia de grupos funcionales éster en las regiones 1725 y de 1444 cm^{-1} , respectivamente. Por otro lado, en la Figura 26 se observa la comparación de los espectrogramas de las NP-Ex y las NP-BCO. Se puede apreciar que ambos espectrogramas están prácticamente sobrepuestos, lo cual indicaría que el extracto se encuentra incorporado en el interior de la matriz polimérica de las nanopartículas.

VIII.6 Obtención del porcentaje de encapsulación y eficiencia de encapsulación del extracto en nanopartículas poliméricas (NP-Ex)

Dado que se requería cuantificar el contenido de extracto metanólico incorporado en las NP-Ex, primeramente, se desarrolló un método de cuantificación por espectrofotometría FT-IR. Para ello, se identificó la banda correspondiente al grupo funcional amina NH_2 en las regiones de 1605 a 1401 cm^{-1} , ya que, fue la señal que estuvo presente en el extracto y ausente den el polímero Eudragit®S-100 (Figura 27).

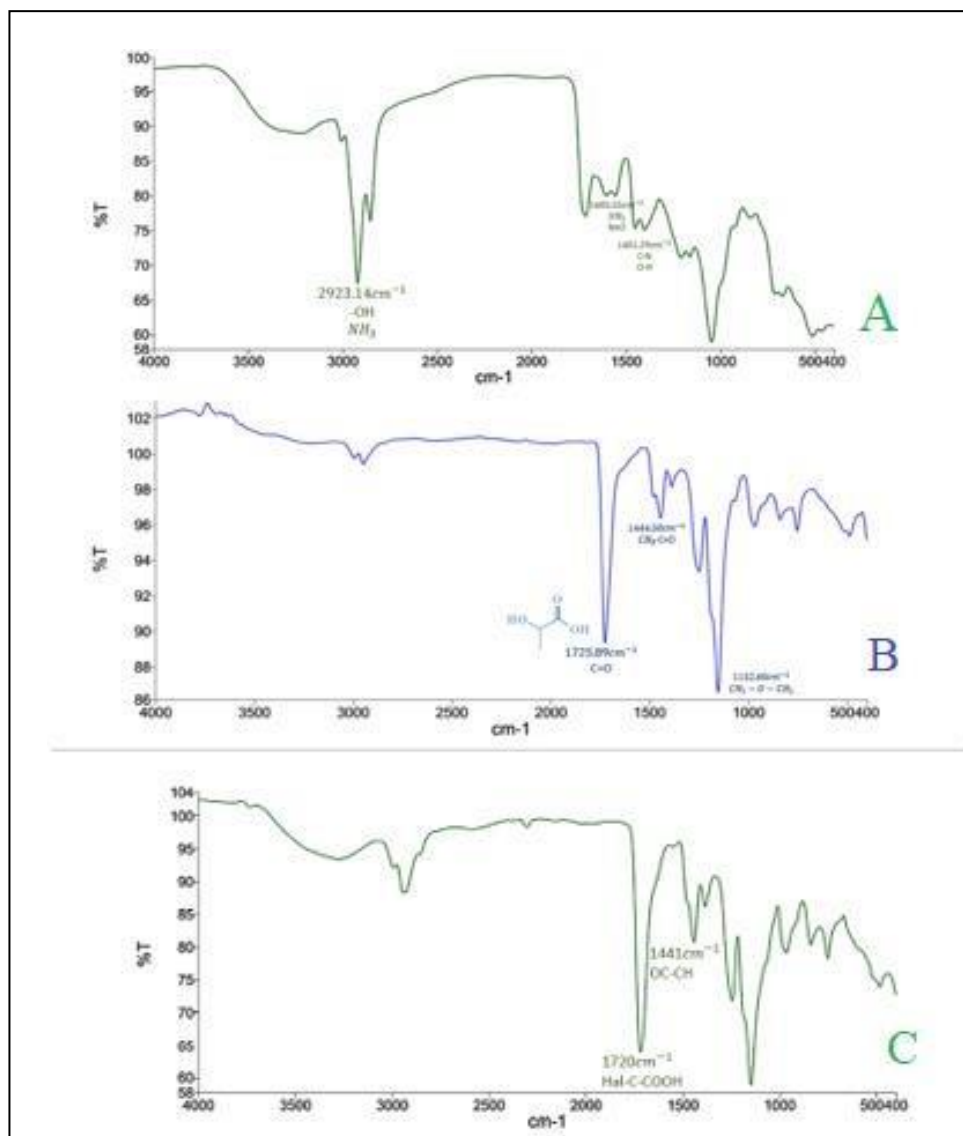


Figura 25 Espectrogramas FT-IR de A) Extracto metanólico de *C. vulgaris*, B) Polímero EudragitS-100 y C) NP-Ex.

Posteriormente, se realizaron seis disoluciones estándar del extracto en un intervalo de concentración de 300 a 1800 $\mu\text{g/mL}$ por triplicado y se analizaron por FT-IR para obtener su espectrograma correspondiente (Figura 28). Se determinó el área bajo la curva de la banda más alta a partir de las absorbancias de la región 1605 a 1401 cm^{-1} . Con el análisis de regresión lineal se obtuvo la siguiente curva de calibración:

$$\text{Pico mas alto} = 3E^{-06}{}_{1449\text{cm}^{-1}}\text{Extracto } C. \text{vulgaris } (\mu\text{g/mL}) + 0.0675$$

$$r^2=0.9922$$

Formula 11

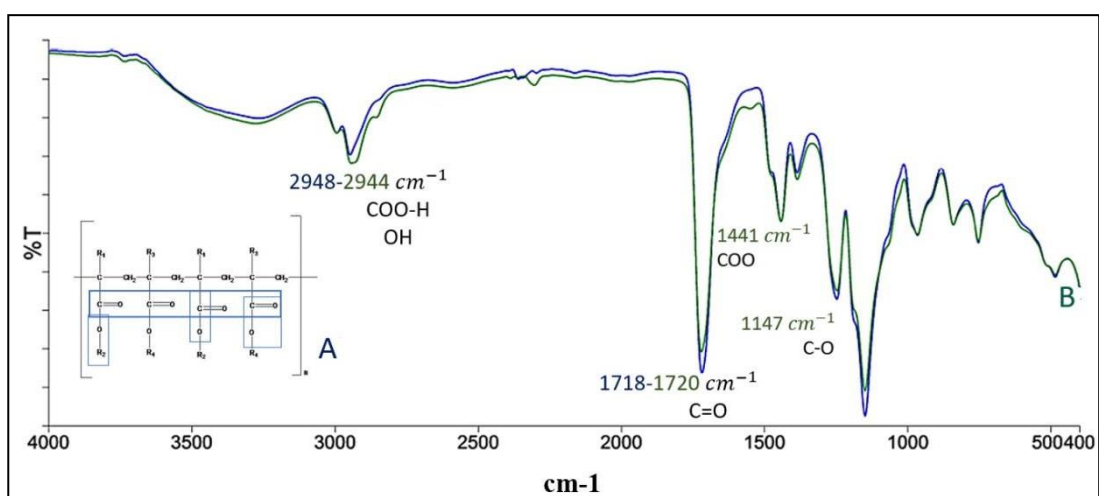


Figura 26 A) Fórmula estructural del Eudragit S-100 y B) Espectrogramas FT-IR de las NP-BCO (azul) y NP-EX (verde).

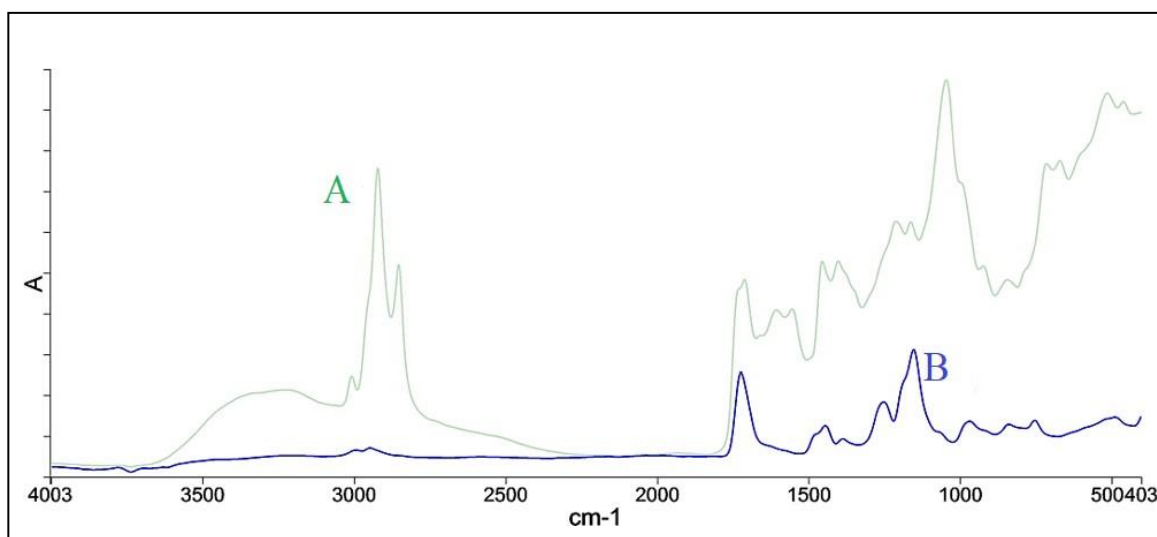


Figura 27 Espectrogramas por FT-IR de A) extracto metanólico de *C. vulgaris* y B) Eudragit S-100.

Finalmente, utilizando el método analítico desarrollado por FT-IR, se cuantificó el contenido de extracto en las NP-Ex, lo cual permitió calcular el porcentaje de encapsulación ($34 \pm 2.4 \%$) y la eficiencia de encapsulación ($56 \pm 3.9 \%$).

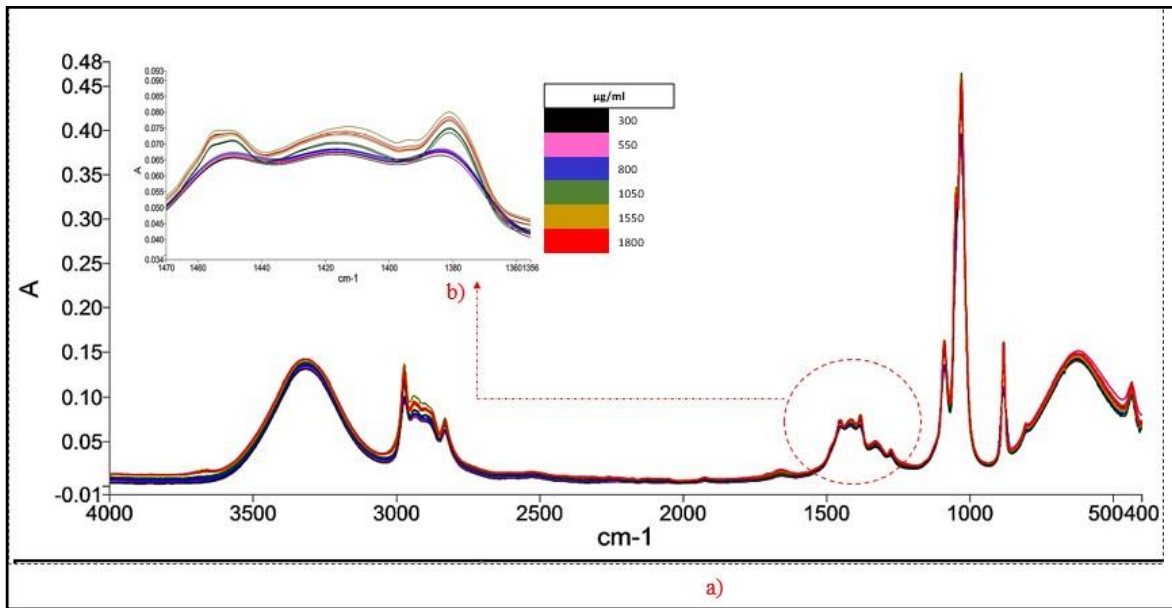


Figura 28 Espectrogramas obtenidos de la curva de calibración del extracto metanólico de *C. vulgaris* (300-1800 µg/mL) por espectroscopía FT-IR.

VIII.7 Identificación de *Fusarium* sp y ajuste de solución de conidios

Se determinó que la especie *Fusarium* sp correspondía a la especie *F. solani*, teniendo una similitud del 97 %, según los datos enviados por el CINVESTAV, Guanajuato (Anexo I). Además, se realizaron las observaciones macroscópicas determinándose un micelio blanquecino con centro rosado, mientras que, en la observación microscópica se observaron los macroconidios y microconidios (Figura 29). Al realizarse el conteo por cámara de Neubauer se obtuvo una concentración de 1.64×10^8 conidios/mL y se ajustó a una concentración de 5×10^4 conidios/mL para los ensayos de actividad antimicrobiana.

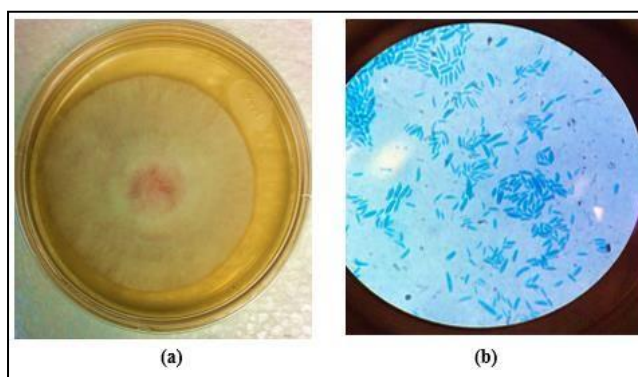


Figura 29 Morfología a) macroscópica y b) microscópica (100X) de *Fusarium solani*. Los macroconidios y microconidios fueron teñidos con azul de lactofenol.

VIII.8 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos y nanoencapsulados de *C. vulgaris* contra *F. solani*

La concentración mínima inhibitoria (CMI) correspondió a aquella en la que se observó un porcentaje de inhibición de conidios cercano al 100 %. En el caso del extracto crudo la CMI fue $> 1000 \pm 15 \mu\text{g/mL}$, mientras que para la formulación de NP-Ex la CMI fue igual a $1000 \pm 9 \mu\text{g/mL}$. Las NP-BCO no presentaron inhibición (Tabla XI).

Tabla XI Actividad antifúngica del extracto metanólico de *C. vulgaris* y las nanoformulaciones por la técnica de microdilución en microplaca contra *Fusarium solani*. Valores con diferentes letras representa diferencia significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos ($n = 3$, \bar{X} SD).

Formulación	Muestra	Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g/ml}$)
Extracto metanólico de <i>C. vulgaris</i>	Libre	$> 1000 \pm 15^{abc}$
Nanopartículas	NP – EX ¹	1000 ± 9^{ba}
	NP – BCO ²	Negativo
Fármaco (control positivo)	Anfotericina B	2 ± 3^{ca}

¹ Nanopartículas con extracto de *C. vulgaris*.

² Nanopartículas blanco

1X. DISCUSIÓN

IX.1 Obtención de la biomasa de *C. vulgaris* y caracterización fitoquímica de su extracto metanólico

Inicialmente, se realizó la adaptación de la microalga *C. vulgaris* con el medio de cultivo de la Tabla II. Después, se escaló a un cultivo semi-piloto de capacidad de 8 L, modo fototrófico, tipo *batch*, sistema cerrado con columna de burbujeo y utilizando como fuente de nutrientes el fertilizante ULTRASOL MULTIPROPOSITO 18-18-18 NPK (Tabla III). Durante los 17 días de cultivo, se obtuvieron una concentración máxima de 12 ± 1.3 g biomasa húmeda/L (Figura 23), una productividad de biomasa de 576 ± 0.09 mg/L/d y una división celular de 0.3 ± 0.05 (Tabla VII). De acuerdo con los resultados se determinó que el medio de cultivo, como fuente de nutrientes, así como, la incidencia de luz fueron las condiciones influyentes en el desarrollo celular. En un estudio llevado a cabo por Arbib *et al.* (2014) se determinó una productividad de biomasa de *C. vulgaris* de 94 mg/L/d, utilizando como fuente de nutrientes NH_4 (21mg/L), NO_3 (2 mg/L)y PO_4 (6 mg/L) con periodos de luz de 14 h y 10 h de oscuridad. Por su parte, Aremu *et al.* (2015) determinaron la concentración más elevada de biomasa de *C. vulgaris* (3 g/L) al día 12 de cultivo. Las condiciones de cultivo fueron periodos de 14 h de luz y 10 h de oscuridad, utilizando N a una concentración de 700 mg/L.

Por otro lado, Sati *et al.* (2021) emplearon, como fuente de nutrientes, extracto de algas-rojas, cuyos constituyentes sirvieron como fuentes de nutrientes orgánicos (*i.e.* aminoácidos, minerales y hormonas). Se determinó una velocidad de crecimiento de 0.153 μ /d y una división celular de 0.22 d con 0.4 % (p/p) del extracto de algas. En otro estudio, Khalili *et al.* (2015) obtuvieron una concentración máxima de biomasa de *C. vulgaris* de 2 g/L al día 8 de cultivo, utilizando urea (0.132 g/L) como fuente de nitrógeno y K_2HPO_4 (0.04 g/L) como fuente de fósforo. En los estudios antes mencionados se determinó que la fuente de nitrógeno, en cualquiera de sus formas asimilables, influye en la acumulación de biomasa. Esto es debido a que las fuentes de nitrógeno influyen en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, por lo que, una deficiencia de nitrógeno conlleva a condiciones de estrés. Por su parte, el fósforo está relacionado igualmente en la acumulación de biomasa; la falta de este nutriente declina la actividad fotosintética y conlleva al descenso de proteínas (Khalili *et al.* 2015; Aremu *et al.* 2015).

Para el CS_{cv} (PBR.1, PBR.2 y PBR.3) se utilizaron periodos de 12 h de luz a 2500 lx y 12 h de oscuridad (Tabla IV). Asadi *et al.* (2020) mencionan que debe de haber un periodo e incidencia de luz adecuados, ya que, de excederse conlleva a la inhibición celular debido a que afecta los sistemas fotosintéticos, dañando el contenido de clorofilas. Los autores reportaron 7500 lx como el óptimo obteniendo 0.33 μ /d y una duplicación de biomasa/d de 2. Además, Asadi *et al.* (2020) reportaron que a 2500 lx, que es la misma intensidad de luz utilizada en el presente estudio, se obtuvieron 0.29 μ /d y una duplicación de biomasa/d de 2.3. Ambos valores son similares a los obtenidos en nuestra investigación, los cuales corresponden a 0.33 ± 0.05 μ /d y una duplicación de biomasa/d de 2 ± 0.31 . Las variaciones entre los cultivos de microalgas se deben al diseño de su cultivo en el que influyen la incidencia y periodos de luz, los nutrientes, la temperatura y la especie (Arbib *et al.* 2014; Aremu *et al.* 2015; Asadi *et al.* 2020). Dado que, los parámetros de crecimiento reportados son parecidos a los que se establecieron en nuestro estudio se puede considerar que el cultivo de *C. vulgaris* en los PBR.1, PBR.2 y PBR.3 fue adecuado.

C. vulgaris es una microalga con una amplia diversidad de compuestos bioactivos, tales como proteínas y lípidos, que son producto de su metabolismo primario; además, a partir de ciertas rutas se pueden sintetizar otros compuestos, como los fenólicos, que son derivados de su metabolismo secundario. En el presente estudio se cuantificaron polifenoles totales durante 13 de los 17 días de cultivo de *C. vulgaris*. En la Figura 24 se muestra el contenido de polifenoles en función del tiempo, observando que conforme avanza el tiempo de cultivo, la presencia de polifenoles se incrementa; la máxima concentración (5 μ g EAG/ mg de biomasa seca) se alcanzó el día 13 de cultivo, lo que corresponde a 0.5 % (p/p) de rendimiento en la biomasa seca. Aremu *et al.* (2016) determinaron polifenoles totales en extractos metanólicos de *Chlorella* spp, obteniendo 7 μ g EAG/mg con 0.7 % (p/p) de rendimiento a bajas concentraciones de nitrógeno para *Chlorella* sp y 8 μ g EAG/mg con 0.8 % (p/p) para *C. minutissima*. Por su parte, Monteiro *et al.* (2019) determinaron 6 μ g EAG/mg de biomasa con un 0.6 % (p/p) de rendimiento, lo cual fue muy parecido a nuestro estudio. La diferencia con respecto al estudio de Monteiro *et al.* (2019) puede deberse al tipo de extracción. En su trabajo utilizaron una mezcla de metanol:agua (80:20), mientras que, en nuestro caso solo metanol. En el presente estudio fue de interés determinar la concentración de polifenoles totales debido a que podrían presentar actividad antimicrobiana.

La síntesis de metabolitos secundarios en la microalga se presenta en condiciones de estrés de nutrientes, siendo la fuente de nitrógeno una de las más influyentes. Es probable que, conforme avanzó el tiempo del cultivo, la fuente de nitrógeno se agotara y el estímulo para la síntesis de compuestos fenólicos también aumentara. Los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de la ruta del fenilpropanoide en el citoplasma, donde el aminoácido fenilalanina es convertido en ácido cinámico para ser convertido en coumaroil-coA, uniéndosele acetatos para formar chalconas; a partir de estas se forman una variedad de flavonoides (Goiris *et al.* 2014; Yadavalli *et al.* 2018). Lo anterior explica que se haya detectado la presencia de flavonoides, sesquiterpenlactonas, esteroides y alcaloides en el extracto, es decir, la síntesis de estos compuestos fue una ruta metabólica de *C. vulgaris* a las condiciones de cultivo (Tabla VIII).

IX.2 Nanoencapsulación del extracto de *C. vulgaris* en NPs y su caracterización fisicoquímica

Se obtuvieron formulaciones de extracto encapsulado en NP-Ex al igual que NP sin extracto incorporado. Con tamaños de NP-Ex de 117 ± 2.7 nm, IP de 0.1 ± 0.03 y $\zeta = -7.8 \pm 0.3$ mV. los parámetros fisicoquímicos fueron mayores que las NP-BCO (Tabla X). Sunoqrot y Abujamous (2019) desarrollaron una nanoformulación con quercetina (compuesto puro) y Eudragit-S-100 reportando un tamaño de 69 nm, mientras que, Li *et al.* (2018) desarrollaron una nanoformulación incorporando el fármaco antifúngico Osthol, obteniendo un tamaño promedio de 55 nm. Aunque en los dos estudios se utilizó el mismo polímero, los tamaños difieren con respecto a las NP-Ex, lo cual pudo deberse a la concentración de polímero utilizada en la fase orgánica. En la presente investigación se utilizó 20 mg/mL de polímero Eudragit S-100, mientras que, Sunoqrot y Abujamous (2019) utilizaron 7.6 mg/mL y Li *et al.* (2018) realizó una proporción (1:4) con respecto al fármaco y el polímero Eudragit S-100. De acuerdo con Galindo-Rodriguez *et al.* (2004) el incremento en la concentración del polímero en la fase orgánica influye en el tamaño de las nanopartículas, ya que, un aumento en las cadenas de polímero por unidad de disolvente inducirá la formación de estructuras esféricas con un mayor volumen.

El índice de polidispersidad (IP) es un parámetro fisicoquímico que se asocia a la homogeneidad de la población de nanopartículas en la formulación. Las NP-Ex mostraron un IP inferior a 0.2 (Tabla X), lo que mostró una relativa homogeneidad poblacional de las nanopartículas en las formulaciones. Los resultados coinciden con tendencias obtenidas en

otras formulaciones de NP, por ejemplo, Li *et al.* (2018) reportaron un IP de 0.165 con NP cargadas con Osthol y preparadas con Eudragit S-100, mientras que, Pina-Barrera *et al.* (2019) reportaron un IP de 0.186, pero utilizando Eudragit L 100-55.

Otro parámetro fisicoquímico en la caracterización de las NP es el potencial zeta (ζ), el cual se define como el potencial electrostático en el límite que divide la capa compacta y la capa difusa de las partículas coloidales. Las NP-Ex presentaron un $\zeta = -7.8 \pm 0.37$ mV (Tabla X), como lo reportado por Sunoqrot y Abujamous (2019) con NP cargadas con quercetina presentando un $\zeta = -5$ mV. Por otra parte, Radbeh *et al.* (2020) reportaron un $\zeta = -16$ mV de NP cargadas con extracto de cereza (*Cornus mas L.*). Eudragit S-100 es un copolímero aniónico que está constituido de ácido metacrílico y metil metacrilato, por lo que, las NP presentarían grupos funcionales aniónicos que quedarían expuestos en su superficie, presentando así una carga negativa, la cual es importante debido a que facilitaría su interacción con membranas biológicas (*e.g.* membrana celular y pared celular de hongos fitopatógenos) (Patra *et al.* 2017; Pina-Barrera *et al.* 2019).

Continuando con la caracterización fisicoquímica de las NP, se empleó espectroscopia infrarroja por FT-IR para caracterizar la interacción entre el polímero Eudragit S-100 y el extracto metanólico de *C. vulgaris*. La región media del espectro infrarrojo $4000 - 400$ cm^{-1} es muy utilizada para estudiar las vibraciones fundamentales y la estructura rotacional-vibratorial asociada a los diferentes enlaces químicos. En el espectrograma del extracto metanólico de *C. vulgaris* (Figura 25 A) se observaron bandas en la región 2923 cm^{-1} , correspondientes a grupos amino e hidroxilos y en 1605 cm^{-1} para compuestos nitrogenados (Pradhan *et al.* 2021). Por su parte, el espectrograma del polímero Eudragit S-100 (Figura 25 B) presentó bandas en las regiones 1725 cm^{-1} hasta 1152 cm^{-1} para grupos carbonilo (C=O), los cuales se encuentran formando los grupos funcionales ésteres que conforman al Eudragit S-100 (Patra *et al.* 2017).

En el espectro de las NP-Ex (Figura 25 C) se observan las bandas antes mencionadas, tanto del extracto metanólico de *C. vulgaris*, como del polímero, pero con una diferencia en cuanto su intensidad. Esta diferencia pudo deberse a la interacción que hay entre el extracto y las cadenas del polímero. Como lo mencionan Anwer *et al.* (2017), la berberina (alcaloide isoquinólico) presenta una banda en la región 3412 cm^{-1} del grupo amina,

el cual al ser nanoencapsulado (Eudragit S-100) se desplaza ligeramente. Los autores asumieron que la interacción intermolecular con el polímero, posiblemente, se daba por medio de puentes de hidrógeno entre el grupo amino (-NH₂) de los compuestos del extracto y el grupo carbonilo (-C=O) del polímero, lo que daría lugar a una baja en la intensidad de las bandas en el espectro de IR.

Como se observa en el espectrograma de las NP-Ex (Figura 25 C), se presentaron bandas correspondientes a los grupos funcionales del polímero formador de la NP (Figura 26 A). Por otra parte, las NP-Ex mostraron una baja en la intensidad de la banda (*e.g* región 2923.14 cm⁻¹ del grupo amina), probablemente, debido a que los compuestos con grupos bioactivos del extracto se encuentran dispersos en la matriz polimérica (Eudragit S-100) de manera uniforme; así serían los grupos funcionales que conforman las paredes del polímero los que se estarían detectando por IR en las NP. Por lo mencionado, se puede determinar que el extracto se encuentra distribuido de manera homogénea en las NP-Ex. De hecho, en la Figura 26 B se observan los espectrogramas de NP-Ex y NP-BCO muy similares, por lo que, el polímero pudo haber provocado un enmascaramiento de bandas debido a la diferencia de relación en masa entre el polímero (Eudragit S-100) y los compuestos con grupos bioactivos nanoencapsulados.

Para completar la caracterización fisicoquímica de las NP-Ex, se estableció un método de FT-IR para cuantificar el extracto incorporado en las NP-Ex y se calcularon los porcentajes de encapsulación y de eficiencia de encapsulación. En la primera etapa del método analítico se obtuvo la transmitancia total del extracto y del polímero Eudragit S100 para identificar las señales espectroscópicas predominantes en el extracto y ausentes en el polímero (Figura 27). Así, se seleccionó la banda que se encuentra entre las regiones de 1605 a 1401 cm⁻¹, la cual se atribuye a las señales del grupo amino (-NH₂) presente en los compuestos del extracto, pero que no forman parte de la estructura química de Eudragit S-100. Posteriormente, se realizó una curva de calibración en un intervalo de concentración de 300 a 1800 µg/mL del extracto (Figura 28) y se realizó un análisis de regresión lineal del área bajo la curva de la banda más alta a partir de las absorbancias en la región de 1605 a 1401 cm⁻¹, obteniendo una correlación lineal con un valor de $r^2 = 0.9922$.

Una vez determinado el contenido de extracto encapsulado en las NP, se calcularon el porcentaje de encapsulación y el porcentaje de eficiencia de encapsulación que

correspondieron a $34 \pm 2.4 \%$ y $56 \pm 3.9 \%$, respectivamente. La determinación de los porcentajes de encapsulación y eficiencia de encapsulación es importante, ya que, permite establecer las dosis de la formulación de las NP-Ex para estudios *in vitro* y, posteriormente, *in vivo*. Los % de encapsulación y de eficiencia de encapsulación obtenidos se consideraron adecuados debido a que el extracto es una mezcla de diversos compuestos, lo cual influye en la interacción o afinidad entre los grupos funcionales del polímero y de los compuestos del extracto; es decir, dicha interacción determina la medida en la que el extracto se incorpora a las NP. En comparación con otras formulaciones, Martínez-Rivas *et al.*(2017) reportaron 9 % de encapsulación y 97 % de eficiencia de encapsulación de extracto de *L. frutescens* en NP. Por su parte, Sunoqrot y Abujamous (2019) reportaron 2 % de encapsulación y 43 % de eficiencia de encapsulación de quercetina en NP.

En cuanto al polímero formador de las NP, se seleccionó al Eudragit S-100 debido a que presenta un comportamiento pH dependiente (se disuelve a $\text{pH} > 7$) (Patra *et al.* 2017). De hecho, los grupos carboxilo del ácido metacrílico se encuentran protonados a pH ácido y las cadenas más externas no se encuentran cargadas, mientras que, a pH alcalino, o cerca de la neutralidad, los grupos carboxilo se ionizan generando cargas negativas que se repelen, lo que provoca un incremento en la solubilidad del polímero (Guo *et al.* 2017; Sunoqrot y Abujamous 2019). Bajo esta condición, la propiedad pH dependiente del Eudragit S-100 podrían aprovecharse en el sector agrícola para la liberación controlada de compuestos con actividad biológica. Por ejemplo, el pH del suelo de un cultivo puede cambiar por algún proceso fisiológico de las plantas como, por ejemplo, durante la formación de los frutos. En nuestro estudio, como el polímero formador de las NP fue el Eudragit S-100, es posible que las NP-Ex pudieran presentar la liberación del extracto al pH alcalino de los suelos de los cultivo (Lakshmi Priya Perincherry 2019; Camara *et al.* 2019).

IX.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos y nanoencapsulados de *C. vulgaris* contra *F. solani*

Se determinó la CMI en un rango de 4 a 1000 $\mu\text{g/mL}$ del extracto crudo de *C. vulgaris* y las NP-Ex, sobre una concentración de 5×10^4 conidios/mL. Se utilizó el protocolo CLSI para hongos filamentosos, el cual determina que la CMI de un compuesto activo será aquella que inhiba el 100 % de conidios.

En el presente trabajo, con ninguna de las concentraciones del extracto crudo ensayadas se pudo obtener un 100 % de inhibición de *F. solani*. Se determinó que se requería una concentración mayor a 1000 µg/mL para inhibirlo. Así, solo se estableció que a una concentración del extracto a 1000 µg/mL inhibe el 62 ± 15 % de los conidios (Tabla XI). La actividad antifúngica podría atribuirse a los polifenoles que hayan estado presentes en el extracto. Por ejemplo, Scaglioni *et al.* (2019) determinó una CL₅₀ de 50 µg/mL del extracto metanólico de *Nannochloropsis* spp con 63, 71 y 93 % de reducción en la concentración de ergosterol (membrana celular) contra los hongos *F. graminearum*, *F. meridionale* y *F. asiaticum* y 19, 10 y 29 % de reducción en la concentración de glucosamina (pared celular) para las especies de *Fusarium* anteriormente mencionadas atribuyendo la inhibición de pared y membrana celular a la acción de ácidos fenólicos.

En otro estudio Vehapi *et al.* (2019) determinaron una reducción de 42, 25 y 15 mm de inhibición del micelio, a 10,000 µg/mL del extracto metanólico de *C. vulgaris*, contra *A. niger*, *A. alternata* y *P. expansum*, respectivamente. Dicha actividad se atribuyó a la presencia de compuestos polifenólicos. En particular, la actividad antifúngica de polifenoles se debe a cambios en la permeación de la pared y la membrana celular, ya sea, en micelio o directamente en los conidios, evitando así la proliferación de tubos germinales (Scaglioni *et al.* 2019).

Por otra parte, el extracto nanoencapsulado mantuvo su efectividad antifúngica, obteniendo una inhibición de 89 ± 9 % a 1000 µg/mL, habiendo una diferencia significativa ($\alpha = 0.05$) con respecto al extracto. La mejoría en el porcentaje de inhibición, con respecto al extracto crudo, podría deberse a la liberación controlada del extracto y al aumento en el área superficial de contacto de la NP-Ex con el conidio; también podría haber influido la atracción iónica que pudo tener el polímero con las glicoproteínas y la quitina de la pared celular del conidio. Así, la interacción más cercana de las NP-Ex podría haber facilitado que el extracto se liberara más directamente en los conidios y que sus compuestos interaccionaran con las estructuras celulares (*e.g.* pared y membranas celulares) evitando la germinación de conidióforos (Pina-Barrera *et al.* 2019; Kumar *et al.* 2019; Antonioli *et al.* 2020).

X CONCLUSIONES

En el presente trabajo se acondicionó un método de cultivo de la microalga *C. vulgaris* que permitió su desarrollo para obtener una biomasa seca con adecuado contenido de polifenoles. A partir del extracto metanólico de la biomasa de *C. vulgaris*, caracterizado fitoquímicamente, se desarrolló una nanoformulación a base del polímero Eudragit S-100, obteniendo NP con un tamaño de partícula menor a 200 nm con IP de 0.1, un $\zeta = -7.8$ mV, un porcentaje de encapsulación de 34 ± 2.4 % y un porcentaje de eficiencia de encapsulación de 56 ± 3.9 %. Finalmente, se determinó que la nanoencapsulación del extracto favoreció ligeramente la actividad antifúngica con respecto al extracto sin encapsular. En conclusión, la formulación de NP con extracto de *C. vulgaris* presentó potencial para usarse en el control de *F. solani*, no obstante, se requieren de algunas estrategias fitoquímicas y nanotecnológicas para optimizar la formulación obtenida.

XI PERSPECTIVAS

- Seguir trabajando con la cepa *C. vulgaris* poniendo énfasis en la concentración de nutrientes inorgánicos, temperatura e incidencia, tipo y periodos de luz para determinar sus parámetros de crecimiento (*e.g* velocidad, duplicación y productividad de biomasa) y la concentración de metabolitos secundarios (*e.g* flavonoides, ácidos fenólicos, alcaloides, taninos, tocoferoles y luteína) en la biomasa.
- Eficientizar la extracción de compuestos bioactivos mediante pretratamientos de rompimiento celular (*e.g* ultrasonido, enzimático) y/o utilizar mezclas de disolventes (metanol:agua, metanol:etanol); así mismo, cuantificar los compuestos bioactivos presentes en el o los extractos mediante FT-IR y CLAR.
- Desarrollar nuevas formulaciones con polímeros de diferentes características (*e.g* quitosano) o mezcla de polímeros (*e.g* quitosano-Eudragit, Eudragit-PLA) para mejorar los % E y % EE; además, aprovechar las características fisicoquímicas de los polímeros en la afinidad e interacción con membranas y pared celular de microorganismos (*e.g* hongos fitopatógenos) y con raíces, tallos y hojas vegetales.
- Ampliar los ensayos *in vitro* de la actividad antifúngica del extracto crudo y nanoencapsulado (*e.g*. inhibición micelial, concentración de ergosterol y glucosamina e inhibición de micotoxinas y α -amilasas) contra *Fusarium* spp y otros hongos fitopatógenos.

XII BIBLIOGRAFÍA

1. Abdullah MA, Ahmad A, Shah SMU, Shanab SMM, Ali HEA, Abo-State MAM, Othman MF. 2016. Integrated algal engineering for bioenergy generation, effluent remediation, and production of high-value bioactive compounds. *Biotechnol Bioprocess Eng* 21:236–249.
2. Agrios G . 2004. *Plant pathology*. Limusa: Mexico, pp. 273-468.
3. Ahn HM, Kim SH, Hyun SH, Lim SR, Kim HY, Oh J, Lee KM, Hong SJ, Cho BK, Lee H, Lee CG, Choi HK. 2016. Effects of the timing of a culture temperature reduction on the comprehensive metabolite profiles of *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol* 28:2641–2650. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0817-4>.
4. Antonioli G, Fontanella G, Echeverrigaray S, Longaray Delamare AP, Fernandes Pauletti G, Barcellos T.n2020. Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: In vitro and in vivo evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chem* 326:126997. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126997>.
5. Anwer MK, Al-Shdefat R, Ezzeldin E, Alshahrani SM, Alshetaili AS, Iqbal M. 2017. Preparation, evaluation and bioavailability studies of Eudragit coated PLGA nanoparticles for sustained release of eluxadoline for the treatment of Irritable Bowel syndrome. *Front Pharmacol* 8:1–11.
6. Arbib Z, Ruiz J, Álvarez-Díaz P, Garrido-Pérez C, Perales JA. 2014. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. *Water Res* 49:465–474.
7. Aremu AO, Masondo NA, Molnár Z, Stirk WA, Ördög V, Van Staden J. 2016. Changes in phytochemical content and pharmacological activities of three *Chlorella* strains grown in different nitrogen conditions. *J Appl Phycol* 28:149–159.
8. Aremu AO, Neményi M, Stirk WA, Ördög V, van Staden J. 2015. Manipulation of nitrogen levels and mode of cultivation are viable methods to improve the lipid, fatty acids, phytochemical content, and bioactivities in *Chlorella minutissima*. *J Phycol* 51:659–669.
9. Arnhold F, Medeiros E, Ponte D, Garda-buffon J. 2014. Inhibition of *Fusarium graminearum* growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina*

- sp* . Pestic Biochem Physiol 108:21–26. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.11.002>.
10. Asadi P, Rad HA, Qaderi F. 2020. Lipid and biodiesel production by cultivation isolated strain *Chlorella sorokiniana* pa.91 and *Chlorella vulgaris* in dairy wastewater treatment plant effluents. J Environ Heal Sci Eng 18:573–585.
 11. Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Benelli G, Losic D, Usha Rani P, Desneux N. 2018. Nanoparticles for pest control: current status and future perspectives. J Pest Sci (2004) 91.
 12. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal 6:71–79. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
 13. Baudalet PH, Ricochon G, Linder M, Muniglia L. 2017. A new insight into cell walls of Chlorophyta. Algal Res 25:333–371. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2017.04.008>.
 14. Bhuvana P, Sangeetha P, Anuradha V, Ali MS. 2019. Spectral characterization of bioactive compounds from microalgae: *N. oculata* and *C. vulgaris*. Biocatal Agric Biotechnol 19:101094. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101094>.
 15. Borges DF, Lopes EA, Robledo A, Moraes F, Soares MS, Visôto LE, Oliveira CR. 2018. Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens : A review. Crop Prot 110:135–140. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.04.003>.
 16. Caligiore-Gei PF, Valdez JG. 2015. Ajuste de un método rápido para la cuantificación de suspensiones de esporas de *Fusarium* spp. en fitopatología. Rev Argent Microbiol 47:152–154. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2015.03.002>.
 17. Camara MC, Campos EVR, Monteiro RA, Do Espirito Santo Pereira A, De Freitas Proença PL, Fraceto LF. 2019. Development of stimuli-responsive nano-based pesticides: Emerging opportunities for agriculture. J Nanobiotechnology 17:1–19. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0533-8>.
 18. Dambolena JS, López AG, Meriles JM, Rubinstein HR, Zygadlo JA. 2012 . Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. Food Control 28:163–170. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.008>.

19. De Morais MG, Vaz BDS, De Morais EG, Costa JAV. 2015. Biologically Active metabolites synthesized by microalgae. *Biomed Res Int* Volume 2015, <http://dx.doi.org/10.1155/2015/835761>
20. Deng GM, Yang QS, He W Di, Li CY, Yang J, Zuo CW, Gao J, Sheng O, Lu SY, Zhang S, Yi GJ. 2015. Proteomic analysis of conidia germination in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 reveals new targets in ergosterol biosynthesis pathway for controlling *Fusarium* wilt of banana. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7189–7207
21. De Souza MP, Hoeltz M, Gressler PD, Benitez LB, Schneider RCS. 2019. Potential of microalgal bioproducts: General perspectives and main challenges. *Waste and Biomass Valorization* 10:2139–2156. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-018-0253-6>.
22. Debourgogne A, DeHoog S, Lozniewski A, Machouart M. 2012. Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: Comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:615–618.
23. Delgado-Ortiz JC, Ochoa-Fuentes YM, Cerna-Chávez E, Beltrán-Beache M, Rodríguez-Guerra R, Aguirre-Uribe LA, Vázquez-Martínez O. 2016. Patogenicidad de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición basal del ajo en el centro norte de México. *Rev Argent Microbiol* 48:222–228. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.04.003>.
24. Deng GM, Yang QS, He W Di, Li CY, Yang J, Zuo CW, Gao J, Sheng O, Lu SY, Zhang S, Yi GJ. 2015. Proteomic analysis of conidia germination in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 reveals new targets in ergosterol biosynthesis pathway for controlling *Fusarium* wilt of banana. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:7189–7207.
25. Duhan JS, Kumar R, Kumar N, Kaur P, Nehra K, Duhan S. 2017. Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnol Reports* 15:11–23.
26. Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. 1989. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 55:1–4.
27. Galindo-Rodriguez S, Allémann E, Fessi H, Doelker E. 2004. Physicochemical

parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm Res* 21:1428–1439.

28. Geoghegan I, Steinberg G, Gurr S. 2017. The role of the fungal cell wall in the infection of plants. *Trends Microbiol* 25:957–967. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.015>.
29. Goiris K, Muylaert K, Voorspoels S, Noten B, De Paepe D, E Baart GJ, De Cooman L. 2014. Detection of flavonoids in microalgae from different evolutionary lineages. *J Phycol* 50:483–492.
30. Gómez-Loredo A, Benavides J, Rito-Palomares M. 2015. Purification and formulation of xanthophyll for pharmaceutical use: Current strategies and future trends. *ChemBioEng Rev* 2:393–405.
31. Guo S, Wang G, Wu T, Bai F, Xu J, Zhang X. 2017. Solid dispersion of berberine hydrochloride and Eudragit® S100: Formulation, physicochemical characterization and cytotoxicity evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol* 40:21–27. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2017.02.003>.
32. Gupta PL, Lee SM, Choi HJ. 2015. A mini review: photobioreactors for large scale algal cultivation. *World J Microbiol Biotechnol* 31:1409–1417.
33. Hajimahmoodi M, Faramarzi MA, Mohammadi N, Soltani N, Oveisi MR, Nafissi-Varcheh N. 2010. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *J Appl Phycol* 22:43–50.
34. Hallmann A, Rampelotto PH. 2019. Grand Challenges in Algae Biotechnology. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-25233-5>.
35. Ingle AP, Shende S, Gupta I, Rai M. 2019. Recent trends in the development of nano-bioactive compounds and delivery systems. Elsevier B.V. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64323-0.00014-X>.
36. Jaroszuk-Ściseł J, Kurek E, Winiarczyk K, Baturó A, Łukanowski A. 2008. Colonization of root tissues and protection against *Fusarium* wilt of rye (*Secale cereale*) by nonpathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biol Control* 45:297–307.
37. Khalili A, Najafpour GD, Amini G, Samkhaniyani F. 2015. Influence of nutrients and LED light intensities on biomass production of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 20:284–290.

38. Kim DG, Lee C, Park SM, Choi YE. 2014. Manipulation of light wavelength at appropriate growth stage to enhance biomass productivity and fatty acid methyl ester yield using *Chlorella vulgaris*. *Bioresour Technol* 159:240–248. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.02.078>.
39. Kosuri T, Nayak S, Gul MZ, Rupula K, Beedu SR. 2018. TLC-Digital image-based fluorometric analysis of ergosterol and chitin content in food grains artificially infested with *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Food Anal Methods* 11:1267–1280.
40. Kumar A, Kujur A, Yadav A, Pratap S, Prakash B. 2019. Optimization and mechanistic investigations on antifungal and aflatoxin B 1 inhibitory potential of nanoencapsulated plant-based bioactive compounds. *Ind Crops Prod* 131:213–223. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.01.043>.
41. Kurt Ş, Uysal A, Soylu EM, Kara M, Soylu S. 2020. Characterization and pathogenicity of *Fusarium solani* associated with dry root rot of citrus in the eastern Mediterranean region of Turkey. *J Gen Plant Pathol*. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10327-020-00922-6>.
42. Lakshmipriya Perincherry JL-Kanczugowska and ŁS. 2019. *Fusarium* spp produced mycotoxins in plant-pathogen interactions *Journal of Toxins* 11, 664; doi:10.3390/toxins11110664.
43. Larson TM, Kendra DF, Busman M, Brown DW. 2011. *Fusarium verticillioides* chitin synthases CHS5 and CHS7 are required for normal growth and pathogenicity. *Curr Genet* 57:177–189.
44. Li J, Jiang G, Yang B, Dong X, Feng L, Lin S, Chen F, Ashraf M, Jiang Y. 2012. A luminescent bacterium assay of fusaric acid produced by *Fusarium proliferatum* from banana. *Anal Bioanal Chem* 402:1347–1354.
45. Li LP, Wang XJ, Zhang JY, Zhang LL, Cao YB, Gu LQ, Yu YQ, Yang QL, Shen CY, Han B, Jiang YY. 2018. Antifungal activity of osthol *in vitro* and enhancement *in vivo* through Eudragit S100 nanocarriers. *Virulence* 9:555–562. Available at: <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1356503>.
46. Li T, Gong L, Jian Q, Duan X, Jiang Y, Jian Q, Chen F, Gupta VK. 2017. Proteomics analysis of *Fusarium proliferatum* under various initial pH during fumonisin production. *J Proteomics* 164:59–72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2017.05.008>.

47. Liu W, Yuan L, Wang S. 2020. Recent progress in the discovery of antifungal agents targeting the cell wall. *J Med Chem* 63:12429–12459.
48. López-Orona CA, Hernández-Verdugo S, Velarde-Félix S, Garzón-Tiznado JA, Sy O, Retes-Manjarrez JE. 2019. Cross pathogenicity of *Fusarium oxysporum* isolated from peppers. *Eur J Plant Pathol* 154:1111–1123.
49. Lykogianni M, Bempelou E, Karamaouna F, Aliferis KA. 2021. Do pesticides promote or hinder sustainability in agriculture? The challenge of sustainable use of pesticides in modern agriculture. *Sci Total Environ* 795:148625. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148625>.
50. Martínez-Rivas CJ, Álvarez-Román R, Rivas-Morales C, Elaissari A, Fessi H, Galindo-Rodríguez SA. 2017. Quantitative aspect of *Leucophyllum frutescens* fraction before and after encapsulation in polymeric nanoparticles. *J Anal Methods Chem* 2017.
51. Monteiro M, Santos RA, Iglesias P, Couto A, Serra CR, Gouvinhas I, Barros A, Oliva-Teles A, Enes P, Díaz-Rosales P. 2019. Effect of extraction method and solvent system on the phenolic content and antioxidant activity of selected macro- and microalgae extracts. *J Appl Phycol*:349–362.
52. Nacional PA. 2016. Bioenergéticos: higuera, jatropha curcas, sorgo dulce mexicanos. *Planeación Agrícola Nac.* Available at: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255625/Planeaci_n_Agr cola_Nacional_2017-2030-_parte_dos.pdf.
53. Nguvo KJ, Gao X. 2019. Weapons hidden underneath: bio-control agents and their potentials to activate plant induced systemic resistance in controlling crop Fusarium diseases. *J Plant Dis Prot* 126:177–190. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41348-019-00222-y>.
54. Ojha S, Singh D, Sett A, Chetia H, Kabiraj D, Bora U. 2018. Nanotechnology in Crop Protection. *ELSEVIER:India*, pp 345-391.
55. Pagnussatt FA, Kupski L, Darley FT, Filoda PF, Ponte ÉM Del, Garda-Bufferon J, Badiale-Furlong E. 2013. *Fusarium graminearum* growth inhibition mechanism using phenolic compounds from *Spirulina* sp. *Food Sci Technol* 33:75–80.
56. Pascoli M, Lopes-Oliveira PJ, Fraceto LF, Seabra AB, Oliveira HC. 2018. State of the art of polymeric nanoparticles as carrier systems with agricultural applications:

- a minireview. *Energy, Ecol Environ* 3:137–148.
57. Patra CN, Priya R, Swain S, Kumar Jena G, Panigrahi KC, Ghose D. 2017. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Futur J Pharm Sci* 3:33–45.
 58. Perveen K, Bukhari NA, Al Masoudi LM, Naser Alqahtani A, Alruways MW, Alkhattaf FS. 2021. Antifungal potential, chemical composition of *Chlorella vulgaris* and SEM analysis of morphological changes in *Fusarium oxysporum*. *Saudi J Biol Sci*. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.12.033>.
 59. Pina-Barrera AM, Alvarez-Roman R, Baez-Gonzalez JG, Amaya-Guerra CA, Rivas-Morales C, Gallardo-Rivera CT, Galindo-Rodriguez SA. 2019. Application of a multisystem coating based on polymeric nanocapsules containing essential oil of *Thymus vulgaris* L. to Increase the shelf life of table grapes (*Vitis Vinifera* L.). *IEEE Trans Nanobioscience* 18:549–557.
 60. Pina-Pérez MC, Rivas A, Martínez A, Rodrigo D. 2017. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chem* 235:34–44.
 61. Prabakarana G, Moovendhana M, A. Arumugam a AM, And RD, Sampathkumara P. 2018. Quantitative analysis of phytochemical profile in marine. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences* 8:562–565.
 62. Pradhan B, Patra S, Dash SR, Nayak R, Behera C, Jena M. 2021. Evaluation of the anti-bacterial activity of methanolic extract of *Chlorella vulgaris* Beyerinck [Beijerinck] with special reference to antioxidant modulation. *Futur J Pharm Sci* 7.
 63. Radbeh Z, Asefi N, Hamishehkar H, Roufegarinejad L, Pezeshki A. 2020. Novel carriers ensuring enhanced anti-cancer activity of *Cornus mas* (*Cornelian cherry*) bioactive compounds. *Biomed Pharmacother* 125:109906. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109906>.
 64. Rai M, Ingle AP, Paralikar P, Anasane N, Gade R, Ingle P. 2018. Effective management of soft rot of ginger caused by *Pythium* spp and *Fusarium* spp: emerging role of nanotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 102:6827–6839.
 65. Reyes-Velázquez WP, Figueroa-Gómez RM, Barberis M, Reynoso MM, Rojo FGA, Chulze SN, Torres AM. 2011. *Fusarium* species (section liseola) occurrence and natural incidence of beauvericin, fusaproliferinand fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Res* 27:187–194.

66. Righini H, Roberti R, Quintana AM. 2020. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* by water extracts from *Chlorella* sp. and *Halopithys* sp. Open Acc J Agri Res: OAJAR-100029
67. Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renew Sustain Energy Rev* 35:265–278.
68. Santillán-Mendoza R, Pineda-Vaca D, Fernández-Pavía SP, Montero-Castro JC, Goss EM, Benítez-Malvido J, Rodríguez-Alvarado G. 2019. Genetic diversity of *Fusarium mexicanum*, causal agent of mango and big-leaf mahogany malformation in Mexico. *Mol Biol Rep* 46:3887–3897. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04832-5>.
69. Sati H, Chokshi K, Soundarya R, Ghosh A, Mishra S. 2021. Seaweed-based biostimulant improves photosynthesis and effectively enhances growth and biofuel potential of a green microalga *Chlorella variabilis*. *Aquac Int* 29:963–975.
70. Scaglioni PT, Blandino M, Scarpino V, Giordano D, Testa G, Badiale-furlong E. 2018. Application of fungicides and microalgal phenolic extracts for the direct control of fumonisin contamination in maize. *J Agric Food Chem* 66:4835–4841.
71. Shahnazi S, Meon S, Vadamalai G, Ahmad K, Nejat N. 2012. Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *J Gen Plant Pathol* 78:160–169.
72. Sharma A, Rajendran S, Srivastava A, Sharma S, Kundu B. 2017. Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. *J Biosci Bioeng* 123:308–313. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.09.011>.
73. Shukla P, Chaurasia P, Younis K, Qadri OS, Faridi SA, Srivastava G. 2019. Nanotechnology in sustainable agriculture: studies from seed priming to post-harvest management. *Nanotechnol Environ Eng* 4:1–15. Available at: <https://doi.org/10.1007/s41204-019-0058-2>.
74. Silva J, Alves C, Pinteus S, Reboleira J, Pedrosa R, Bernardino S. 2018. *Chlorella* spp. Elsevier Inc. Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812491-8.00026-6>.
75. Singh R, Parihar P, Singh M, Bajguz A, Kumar J, Singh S, Singh VP, Prasad SM.

2017. Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. *Front Microbiol* 8:1–37.
76. Stępień Ł, Lalak-Kańczugowska J. 2021. Signaling pathways involved in virulence and stress response of plant-pathogenic *Fusarium* species. *Fungal Biol Rev* 35:27–39.
77. Stramarkou M, Papadaki S, Kyriakopoulou K, Krokida M. 2017. Effect of drying and extraction conditions on the recovery of bioactive compounds from *Chlorella vulgaris*. *J Appl Phycol* 29:2947–2960.
78. Summerell BA, Laurence MH, Liew ECY, Leslie JF. 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: A review. *Fungal Divers* 44:3–13.
79. Sunoqrot S, Abujamous L. 2019. pH-sensitive polymeric nanoparticles of quercetin as a potential colon cancer-targeted nanomedicine. *J Drug Deliv Sci Technol* 52:670–676. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.05.035>.
80. Suresh A, Praveenkumar R, Thangaraj R, Oscar FL, Baldev E, Dhanasekaran D, Thajuddin N. 2014. Microalgal fatty acid methyl ester a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific J Trop Dis* 4:S979–S984.
81. Tleuova AB, Wielogorska E, Talluri VSSLP, Štěpánek F, Elliott CT, Grigoriev DO. 2020. Recent advances and remaining barriers to producing novel formulations of fungicides for safe and sustainable agriculture. *J Control Release* 326:468–481. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.035>.
82. Tripathi BN, Kumar D. 2017. Prospects and challenges in algal biotechnology. *Prospect Challenges Algal Biotechnol*:1–326.
83. Valletta A, Chronopoulou L, Palocci C, Baldan B, Donati L, Pasqua G. 2014. Poly(lactic-co-glycolic) acid nanoparticles uptake by *Vitis vinifera* and grapevine-pathogenic fungi. *J Nanoparticle Res* 16:2744 DOI 10.1007/s11051-014-2744-0
84. Vega-Gutiérrez TA, López-Urquidez GA, Allende-Molar R, Amarillas-Bueno LA, Romero-Gómez S de J, López-Orona CA. 2019. Aggressiveness and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with foot rot and wilt in Tomato in Sinaloa, Mexico. *3 Biotech* 9:1–10. Available at: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1808-3>.
85. Vehapi M, Koçer AT, Yılmaz A, Özçimen D. 2019. Investigation of the antifungal

effects of algal extracts on apple-infecting fungi. Arch Microbiol. Apr;202(3):455-471 Available at: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01760-7>..

86. Wang H, Wang Z, Liu Z, Wang K, Xu W. 2021. Membrane disruption of *Fusarium oxysporum f. sp. niveum* induced by myriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01. Microb Biotechnol 14:517–534.
87. Yadavalli R, Peasari JR, Mamindla P, Praveenkumar, Mounika S, Ganugapati J . 2018. Phytochemical screening and *in silico* studies of flavonoids from *Chlorella pyrenoidosa*. Informatics Med Unlocked 10:89–99. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.imu.2017.12.009>.
88. Zhang H, Wolf-Hall C, Hall C. 2008. Modified microwave-assisted extraction of ergosterol for measuring fungal biomass in grain cultures. J Agric Food Chem 56:11077–11080.

XIII ANEXOS

XIII.1 Anexo I

Identificación de especie *Fusarium solani*, teniendo una similitud del 99.7 %, según los datos enviados por el CINVESTAV, Guanajuato

Reference description	Score	Similarity	Overlap%
<i>Fusarium solani</i>	762.37	99.79 %	100.00 %

XIII.2 Anexo II



La Facultad de Ciencias Químicas de la
Universidad Autónoma de Nuevo León

otorga el presente

RECONOCIMIENTO A:

*Miguel Eduardo Lopez Arellanes , Sergio Arturo Galindo Rodríguez,
Rocio Álvarez Roman , David Mizaël Ortiz Martínez, Sergio Moreno Limón*

por su participación como ponentes del trabajo titulado:
**CULTIVO TIPO BATCH DE *Chlorella vulgaris* Y CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA
DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LA BIOMASA**
(Modalidad Cartel)

**VI CONGRESO INTERNACIONAL
DE QUÍMICA E INGENIERÍA VERDE**
Modalidad Virtual

realizado el
8, 9 y 10 de Septiembre de 2021


Dra. Argelia Vargas Moreno
DIRECTORA

