

# Evaluación de la estabilidad de cuatro sistemas de liberación para la formulación de conidios de *Trichoderma asperellum*

Recibido 05 de septiembre de 2019 //  
Aceptado 03 de diciembre de 2020 //  
Publicado online 06 de octubre de 2021

Perdomo, C.E.<sup>1</sup>, Villamizar, L. F.<sup>2</sup>, Báez, F.J.<sup>1</sup>, Viera, W.F.<sup>1</sup>, Jackson, T.<sup>3</sup>

## RESUMEN

El éxito de un bioproducto a base de microorganismos depende de que la formulación sea adecuada para su uso y estable en condiciones de almacenamiento. En este contexto, se evaluó la estabilidad de cuatro sistemas de liberación para la formulación de conidios del hongo antagonista *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (polvo mojable, gránulo cubierto, gránulo dispersable y concentrado emulsionable). La estabilidad de los prototipos almacenados a 4 °C y 30 °C fue evaluada durante seis meses mediante la determinación de características microbiológicas y fisicoquímicas. Los productos almacenados a 4 °C fueron más estables que los almacenados a 30 °C; presentando estos últimos una pérdida total de la germinación después de seis meses de almacenamiento, con excepción del polvo mojable (WP) que mantuvo su germinación por encima del 80%. Dentro de los sistemas de entrega, el polvo mojable fue el prototipo más estable, manteniendo una germinación de conidios mayor al 85% y una viabilidad de  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g). Esta formulación además mantuvo las propiedades fisicoquímicas dentro de los estándares de calidad cuando fue almacenada bajo condiciones de refrigeración.

**Palabras clave:** bioplaguicida, formulación, trichoderma, polvo mojable, gránulo cubierto, gránulo dispersable, concentrado emulsionable.

## ABSTRACT

*The success of a microorganism-based bio product depends on an appropriate formulation for use, stable under storage conditions. In this context, four delivery systems were evaluated for the formulation of conidia of the antagonist fungus Trichoderma asperellum (wetable powder, coated granule, dispersible granule and emulsifiable concentrate). The stability of the prototypes stored at 4°C and 30°C was assessed for six months by determining microbiological and physicochemical characteristics. The products stored at 4°C were more stable than those stored at 30°C, the latter presenting a total loss of germination except for the wettable powder (WP), which presented a germination of over 80% after six months of storage. Within delivery systems, wettable powder was the most stable prototype, maintaining conidia germination above 85% and viability in  $1 \times 10^8$  colony forming units per gram (UFC/g). This formulation also maintained all physicochemical properties within quality standards, when stored under refrigeration.*

**Keywords:** biopesticides, formulation, trichoderma, wettable powder, coated granule, dispersible granule, emulsifiable concentrate.

<sup>1</sup>Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Av. 12 de octubre N24-584 y Francisco Salazar (esq.), edif. Torre Sol Verde, piso 2, Pichincha, Ecuador. Correo electrónico: stefyq-perdomo@hotmail.com

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Sector Cutuglagua, km 1½, Mejía, Pichincha, Ecuador, CP: EC170353.

<sup>3</sup>Microbial Solutions, AgResearch Limited, Lincoln Research Centre, Nueva Zelanda.

## INTRODUCCIÓN

El uso de bioproductos a base de microorganismos benéficos es una alternativa que permite el manejo sostenible de los cultivos, minimiza los problemas de contaminación ambiental, los riesgos para la salud de los operarios y reduce el riesgo de presencia de trazas de agroquímicos en los productos agrícolas (Bettiol et al., 2014). Entre los microorganismos benéficos que más se utilizan en la agricultura actual se encuentran más de 200 especies del género *Trichoderma*, entre las que se destaca *T. asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg por poseer la capacidad de inducir resistencia sistémica en algunas plantas y por su acción sobre patógenos de importancia agrícola como *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* en pepino (*Cucumis sativus*) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en banano (*Musa × paradisiaca*) (Yedia et al., 2003.; Thangavelu y Gopi, 2015; Bissett et al., 2015).

La comercialización y uso masivo de agentes de control biológico requiere el desarrollo de formulaciones eficientes, estables y factibles desde el punto de vista técnico y económico. Para esto es necesario desarrollar sistemas de producción y formulación óptimos que resulten en productos de la misma o mayor eficacia que los agroquímicos (Santos et al., 2012).

El tipo de formulación dependerá de la forma de aplicación del producto y el modo de acción del ingrediente activo, siendo los sistemas de liberación más utilizados para la formulación de microorganismos: polvo para espolvoreo, polvo mojable (WP), polvo seco para recubrimiento de semillas, gránulos, microgránulos, gránulos dispersables (WG), gránulo encapsulado o cubierto (CG), emulsiones (E), suspensión concentrada, dispersión en aceite, suspoemulsiones y suspensión de microencapsulados (Díaz et al., 2018). Los polvos mojables son aquellos que requieren ser reconstituidos en agua para su aplicación. Los granulados son formulaciones sólidas preparadas mediante la aglomeración de partículas; los más utilizados son los gránulos dispersables, que se aplican en forma de dispersión luego de su desintegración en agua. Los granulados cubiertos o encapsulados son aquellos que poseen una cobertura para la protección o la liberación controlada de la sustancia activa. Dentro de las formulaciones líquidas, se destacan los concentrados emulsionables, que constan de un principio activo suspendido en un medio oleoso apropiado, cuya mezcla con agua produce una emulsión estable (Burgess, 1998; Fernández, 2001; FAO, 2004).

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue seleccionar un sistema de liberación para los conidios de *T. asperellum*, con base en la evaluación de la estabilidad microbiológica y fisicoquímica de cuatro prototipos de formulación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismo

Se utilizó la cepa *T. asperellum* Ta001, aislada e identificada por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias en Ecuador (INIAP), Estación Experimental Litoral Sur (EELS), en el año 2010. Esta cepa liofilizada se conserva en crioviales mantenidos en cámaras de desecación a 19 °C.

### Producción masiva de *T. asperellum*

La cepa liofilizada de *T. asperellum*Ta001 se reactivó mediante siembra en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) con ácido láctico, que fueron incubadas por 7 días a 25 °C.

El sustrato de producción fue arroz, el cual se hidrató en agua a 70 °C por 20 minutos, se filtró y se dejó secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Muestras de 100 g de arroz hidratado se colocaron en bolsas de polietileno de alta densidad (8 cm x 12 cm), las cuales fueron selladas con grapas y esterilizadas en autoclave. Una vez frías, fueron inoculadas con 10 ml de una suspensión de conidios preparada en solución de Tritón X-100 al 0,1%, sacarosa al 10% y ajustada a una concentración de 10<sup>7</sup> conidios/ml mediante recuento en cámara Neubauer. Las bolsas se incubaron 7 días a 25 °C y posteriormente el sustrato esporulado se transfirió a fundas de papel que se incubaron a 19 °C con humedad relativa del 60% por 7 días.

### Extracción de conidios de *T. asperellum*

Los conidios se cosecharon por vía seca utilizando un tamiz de 500 µm ensamblado sobre un tamiz de 250 µm sujeto a una bolsa de recolección. Los tamices fueron agitados manualmente por 5 minutos con movimientos horizontales y se recuperaron los conidios colectados en la bolsa, obteniéndose 3,5 g de conidios puros por cada 100 g de arroz esporulado seco.

### Formulación

Los prototipos de formulación (seleccionados por la facilidad de aplicación en el campo y su factibilidad técnica y económica) fueron elaborados siguiendo las composiciones descritas en la tabla 1. La bentonita, talco y zeolita fueron previamente esterilizados en estufa Memmert SN 30 a 100 °C, durante 24 horas.

- Polvo mojable (WP): los conidios secos de *T. asperellum* se mezclaron manualmente con los excipientes hasta obtenerse un producto homogéneo que presentó una humedad del 2,20%.
- Gránulo cubierto (CG): se preparó un gel acuoso al 0,05% de goma previamente mezclada con aceite vegetal. Los conidios secos fueron adicionados al gel y este fue mezclado con la zeolita empleada como núcleo de recubrimiento. Se adicionaron los excipientes secos en polvo y se mezclaron hasta obtener partículas de flujo libre. Los gránulos cubiertos fueron secados al ambiente (18 °C, HR 60%) por 24 horas (Swaminathan et al., 2016). El producto terminado presentó una humedad del 6,15%.

Ingredientes	WP	CG	WG	EC
Bentonita: Talco (1:1)	87	6	82	0
Almidón	7	0	5	0
Zeolita	0	86	0	0
Goma natural	0	1	1	0
Aceite vegetal	0	1	0	0
Aceite mineral	0	0	0	87
Tensioactivo	0	1	1	5
Conidios secos	6	5	11	8

Tabla 1. Composición porcentual en base seca de los bioformulados con base en conidios de *T. asperellum*. Realizada para la publicación.

\*Bentonita (Bentotec, Ecuador), Talco (Ecuaminerales, Ecuador) Zeolita (Minmetec, Ecuador), Goma Natural, Aceites y Tensoactivo (La casa de los químicos, Ecuador).

- Gránulo dispersable (WG): se preparó un gel acuoso al 0,02% con la goma y el tensioactivo (Tritón X-100). Posteriormente se añadieron los excipientes en polvo y los conidios del hongo. La masa obtenida fue granulada vía húmeda a través de una malla (1 mm) y los gránulos se secaron al ambiente (18 °C, HR 60%) por 22 horas hasta alcanzar un 5,58% de humedad.
- Concentrado emulsionable (EC): los excipientes fueron mezclados con los conidios utilizando un mezclador de alta velocidad Polytron™ PT 2100 a 1500 rpm por 5 min.

### Estabilidad en almacenamiento

Muestras de 300 g de los prototipos sólidos y 10 g de conidios puros (tratamiento control) fueron empacados en fundas metalizadas (laminado de polietileno y de aluminio) tipo Ziploc® con capacidad de 500 g y 20 g respectivamente (10 unidades experimentales/prototipo). Para el formulado líquido diez muestras de 300 ml se envasaron en frascos de vidrio de color ámbar de 500 ml de capacidad. Antes de iniciar el almacenamiento se determinaron las características microbiológicas (contenido de contaminantes, porcentaje de germinación y viabilidad) y fisicoquímicas (actividad de agua, pH, porcentaje de humedad, estabilidad del concentrado emulsionable, tamaño de la partícula, densidad apisonada, humectabilidad y suspendibilidad). Las unidades experimentales (UE) fueron almacenadas a 4 °C (temperatura de refrigeración utilizada para extender la vida útil de los bioproductos) y 30 °C (temperatura promedio del lugar de origen del microorganismo utilizado), utilizando 5 UE/temperatura, de cada una de las cuales se evaluaron dos muestras (duplicado) antes y pasados los tres y seis meses de almacenamiento (mínima vida útil requerida para que un bioinsumo sea comercializado), determinado los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos mencionados anteriormente. Una funda del tratamiento control (conidios puros sin formulación) almacenado a cada temperatura también fue retirada para la evaluación de la viabilidad.

### Pruebas microbiológicas

#### - Viabilidad (UFC/g o ml)

Se utilizó la metodología de diluciones seriadas y recuento en placa descrita por Báez *et al.* (2019). Las muestras fueron de 1 g o 1 ml, la siembra se realizó en medio de cultivo PDA con Tritón x-100 al 0,1% y ácido láctico. Las cajas se incubaron durante 7 días a 25 °C, momento en que se realizó el recuento de colonias y el resultado se expresó en UFC/g o ml.

#### - Germinación de conidios (%)

Las diluciones 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> preparadas previamente para la prueba de viabilidad fueron sembradas en medio de cultivo PDA por duplicado e incubadas durante 24 horas a 25 °C. Transcurrido este tiempo se realizó el conteo de conidios germinados y no germinados en un microscopio de luz (40X). El resultado se expresó como el porcentaje de los conidios germinados con respecto al total observado (Báez *et al.*, 2019).

#### - Contenido de contaminantes (UFC/g o ml)

El contenido de contaminantes fue estimado en las cajas de Petri de la dilución 10<sup>-4</sup> sembradas para la prueba de via-

bilidad, en las cuales se realizó un conteo de todas las colonias diferentes a *T. asperellum*. Este resultado fue transformado a concentración de contaminantes y posteriormente expresado como UFC/g o ml.

### Pruebas fisicoquímicas

#### - Humedad (%)

En un medidor de humedad Boeco Modelo BMA I50, se pesaron 2,0 g del producto en un plato de aluminio y se inició el secado de la muestra a 100 °C hasta peso constante.

#### - Actividad de agua (a<sub>w</sub>)

Esta variable se determinó en un medidor de a<sub>w</sub> Aqua Lab modelo 4TE, utilizando muestras de 2,0 g o ml de los formulados (Báez *et al.*, 2019).

#### - Densidad apisonada (g/ml)

La densidad apisonada se determinó para los prototipos sólidos siguiendo la metodología descrita por Báez *et al.* (2019). Se registró el volumen (V) de la muestra y la densidad apisonada (D) se calculó con la siguiente fórmula

$$D = \frac{50g}{V}$$

#### - pH

Muestras de 5,0 g o ml de formulado fueron reconstituidas en 50 ml de agua destilada desionizada. La suspensión se homogenizó con agitador magnético a 150 rpm durante dos minutos y se determinó el valor de pH mediante lectura con un potenciómetro HACH Sesión 3 previamente calibrado.

#### - Humectabilidad (minutos)

Se utilizó la metodología reportada por Báez *et al.* (2019) basada en la metodología CIPAC MT 53. Se adicionaron 5 g del producto desde una altura de 25 cm en un vaso de precipitación con 100 ml de agua destilada sin ningún tipo de agitación y se registró el tiempo en segundos que tardó el producto en humedecerse completamente.

#### - Suspendibilidad (%)

Este parámetro fue determinado para los prototipos sólidos siguiendo la metodología descrita por Quiroga *et al.* (2011) y basada en el método CIPAC MT 168. Muestras de producto de 2,5 g se reconstituyeron en 50 ml de agua destilada y posteriormente se colocó la suspensión preparada en una probeta de 250 ml con el mismo volumen de agua destilada. El sistema se incubó a 30 °C por 30 minutos y se retiró el sobrenadante. El sedimento fue secado 90 °C por 24 horas, el peso final de los sólidos fue registrado y con este se calculó el porcentaje de suspendibilidad.

$$\text{Suspendibilidad (\%)} = 111 \left[ 1 - \left( \frac{A}{2,5g} \right) \right]$$

A = Peso de la masa seca en los 25 ml de residuo (sobrante del proceso de extracción del sistema).

#### - Tamaño de partícula (%)

El tamaño de partícula se determinó mediante metodología reportada por Báez *et al.* (2019) basada en el método CIPAC MT 197. Muestras de 10 g de producto se colocaron en una columna de tamices de poro conocido ordenados de mayor a menor (2 mm, 1,7 mm, 250 μm, 150 μm y 53 μm para formulaciones

granuladas y 500 µm, 250 µm, 150 µm, 106 µm, y 53 µm para el polvo mojable). La columna de tamices se ubicó en un agitador vibratorio marca KARL KOLB que operó por 5 minutos y transcurrido este tiempo se pesó el material retenido en cada tamiz, valor que se expresó como porcentaje del peso inicial de la muestra.

- Estabilidad de la emulsión formada por el concentrado emulsionable (ml)

Se utilizó la metodología reportada por Báez *et al.* (2019) basada en el método CIPAC MT 20. El concentrado emulsionable (2 ml) se reconstituyó en 28 ml de agua destilada. La emulsión formada se transfirió a una probeta, se llevó a volumen de 100 ml con agua destilada, se agitó con una varilla de vidrio y se dejó en reposo durante una hora. Finalmente se registró el volumen de crema formado en la superficie del sistema.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar (DCA) con arreglo factorial 5 x 2 (4 formulaciones y el control x 2 temperaturas de almacenamiento) y medidas repetidas en el tiempo a los 3 y 6 meses de almacenamiento. El estudio contó con un total de 50 UE (10 UE/tratamiento). Todas las determinaciones fueron analizadas por duplicado.

La normalidad y homocedasticidad de los datos se determinaron mediante las pruebas de Shapiro Wilks y Levene, respectivamente. Una vez demostrados estos principios, se utilizó un análisis de varianza ANOVA y a las pruebas de comparación de medias por diferencia mínima significativa (DMS) y Tukey con 95% de confiabilidad. Para las variables que no fueron paramétricas se utilizó la prueba de Kruskal Wallis (95%). Los valores de los parámetros fisicoquímicos antes y después de almacenamiento fueron comparados con una prueba de t-apareada (95%). Se utilizó el programa estadístico Statistix versión 8.0.

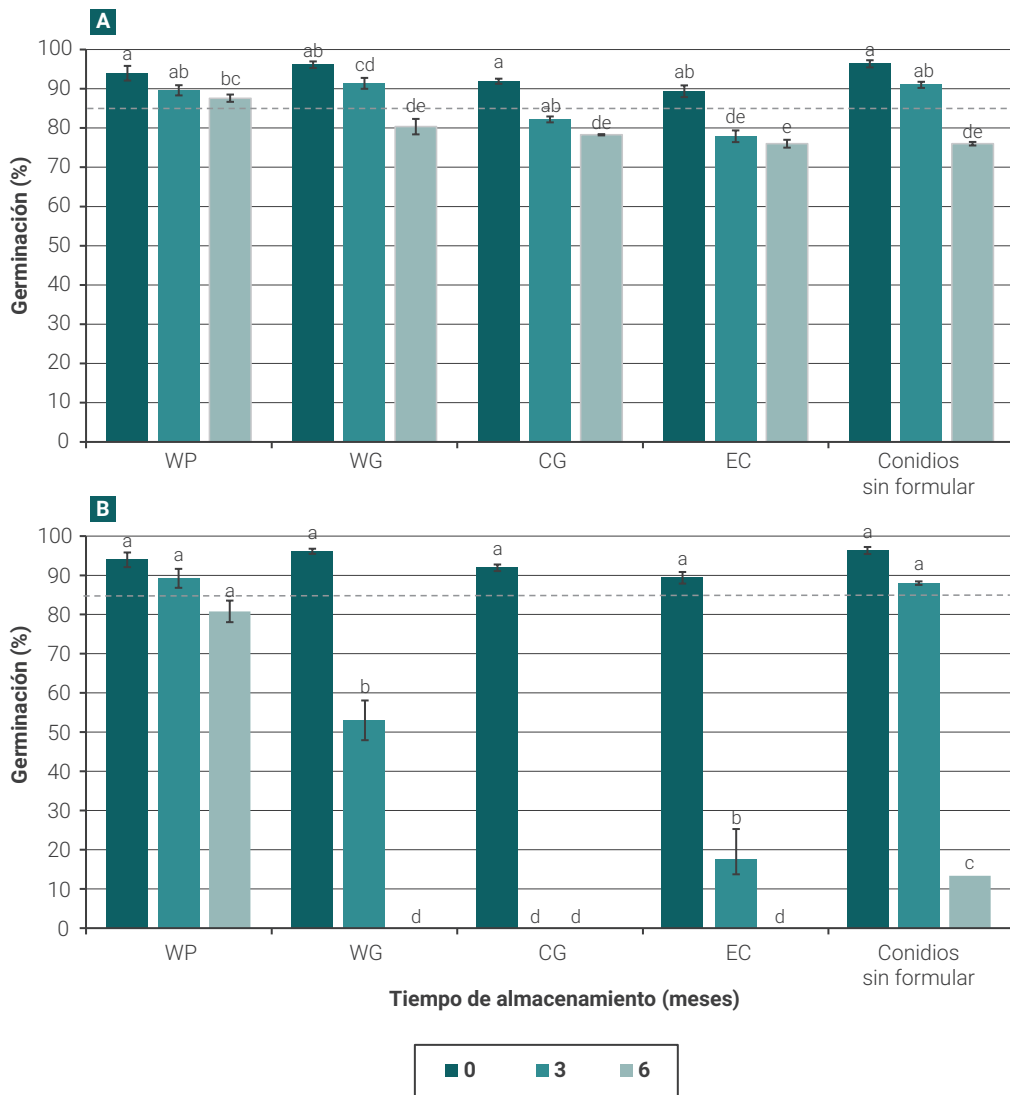


Figura 1. Porcentajes de germinación del hongo *T. asperellum* formulado con cuatro sistemas de liberación vs. conidios sin formular (Control) y almacenados durante seis meses a 4 °C (A) y 30 °C (B). (WP) Polvo mojable, (WG) Gránulo dispersable, (CG) Gránulo cubierto, (EC) Concentrado emulsionable. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según prueba de Tukey (95%). Realizado para publicación.

\*La línea punteada en la figura A y B, muestra el límite aceptable para la germinación (%).

## Análisis para la selección del sistema de liberación de conidios de *T. asperellum*

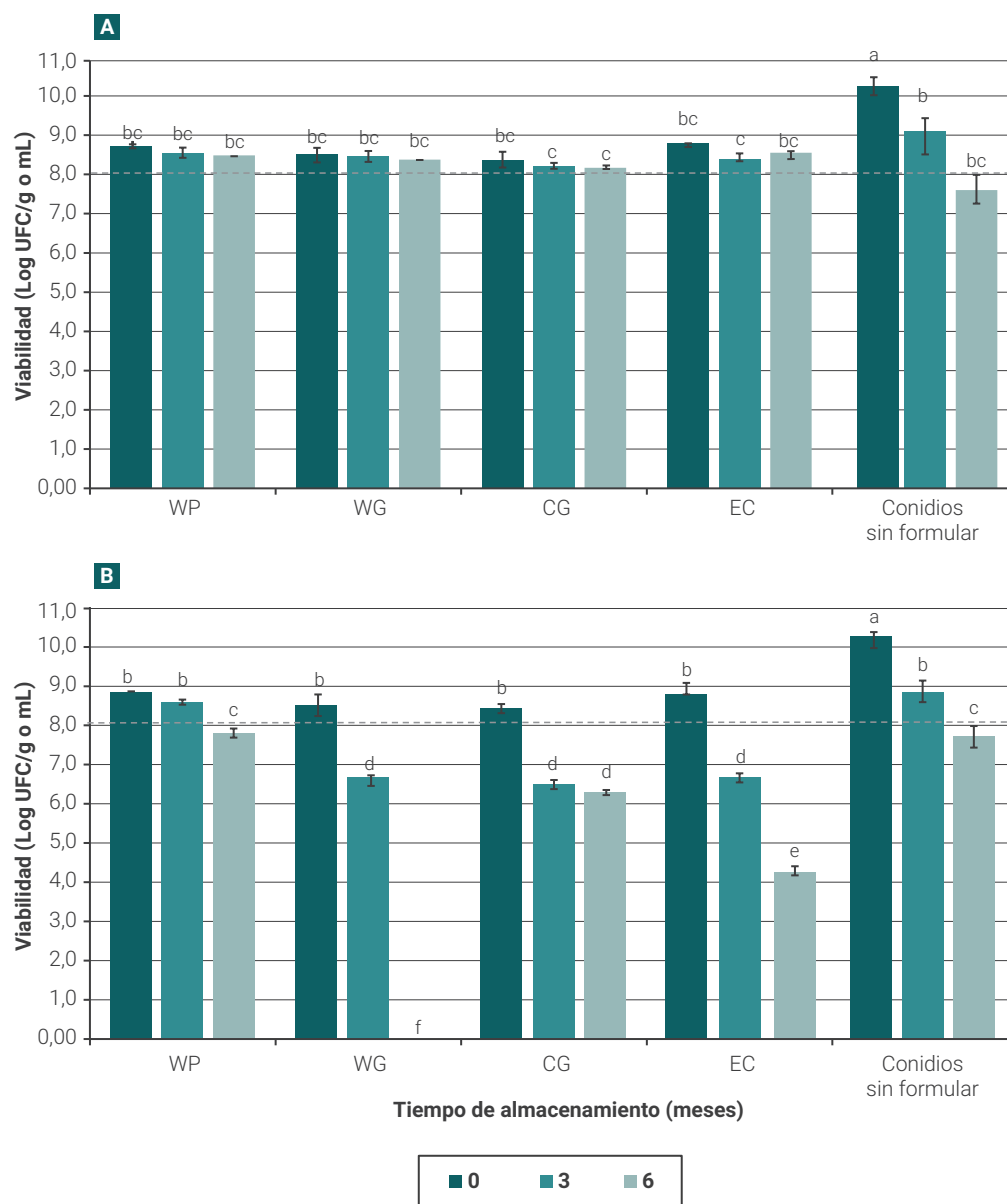
Para la selección del sistema de liberación más estable se utilizaron dos criterios de calificación. El primero correspondió a la estabilidad en almacenamiento definida por las variables sin cambio estadísticamente significativo durante el tiempo de almacenamiento y el segundo criterio se denominó conformidad con los límites de aceptación, referente a variables que estuvieron dentro de los límites de aceptación antes y durante el tiempo de almacenamiento. Se utilizó un sistema binario de calificación en el que se asignó un valor de uno (1) cuando se cumplió el criterio y un valor de cero (0) en caso de no conformidad. Las variables fueron jerarquiza-

das según importancia asignando un peso relativo expresado en porcentaje, el cual fue multiplicado por valor de la suma de la calificación obtenida en los dos criterios evaluados por variable. La puntuación total para cada prototipo se calculó como la suma de las puntuaciones para cada factor ponderadas según su importancia relativa.

## RESULTADOS

### Estabilidad microbiológica

La germinación de los cuatro prototipos de formulación almacenados en refrigeración (4 °C) se redujo significativamente ( $F = 32,5$ ;  $gl = 68$ ;  $p < 0,0001$ ) durante el almacenamiento con respecto al valor inicial inmediatamente después de la manu-



**Figura 2.** Viabilidad (UFC/g o ml) de *T. asperellum* formulado con cuatro sistemas de liberación vs. conidios sin formular (Control) almacenados durante seis meses a 4 °C (A) y 30 °C (B). (WP) Polvo mojable, (WG) Gránulo dispersable, (CG) Gránulo cubierto, (EC) Concentrado emulsionable. Tratamientos con letras diferentes son significativamente diferentes según prueba de Tukey (95%). Realizado para publicación.

\*La línea punteada en la figura A y B, muestra el límite aceptable para la germinación (%).

Propiedad	Sistema de liberación	Temp.	Valor medio después de la formulación	Valor medio después del almacenamiento	Límite de aceptación / Fuente	
Densidad apisonada (g/mL)	WP	4 °C	0,73±0,03	0,63±0,00	0,60 – 1,05 g/mL Báez et al., 2019	
		30 °C		0,73±0,03		
	WG	4 °C	0,66±0,04	0,71±0,00		
		30 °C		0,74±0,00		
	CG	4 °C	1,04±0,00	1,04±0,00		
		30 °C		1,04±0,00		
Tamaño de partícula (Porcentaje de retención)	WP	4 °C	80,46±1,21	80,20±0,36	>80% del material <106 µm Báez et al., 2019	
		30 °C		79,50±0,73		
	WG	4 °C	95,64±1,06	89,98±1,19*	>80% del material entre 250 µm-1,7 mm Báez et al., 2019	
		30 °C		96,0±0,71		
	CG	4 °C	100,00±0,00	100,00±0,00	>80% del material entre 250 µm-2,0 mm Báez et al., 2019	
		30 °C		100,00±0,00		
Humedad (%)	WP	4 °C	2,20±0,25	2,79±0,31*	2%5% Báez et al., 2019	
		30 °C		2,82±0,43*		
	WG	4 °C	5,58±0,53	5,22±0,28	4%-8% Villamizar et al., 2010	
		30 °C		4,95±0,34		
	CG	4 °C	6,15±0,13	5,94±0,11*		
		30 °C		5,73±0,23*		
a <sub>w</sub>	WP	4 °C	0,25±0,06	0,28±0,03		0,2-0,7 Báez et al., 2019
		30 °C		0,39±0,02*		
	WG	4 °C	0,59±0,04	0,50±0,03*		
		30 °C		0,48±0,05*		
	CG	4 °C	0,61±0,01	0,47±0,00*		
		30 °C		0,44±0,00*		
pH	WP	4 °C	5,77±0,71	6,22±0,09	5,5-7,5 Báez et al., 2019	
		30 °C		6,13±0,16		
	WG	4 °C	6,57±0,19	6,99±0,02*		
		30 °C		6,96±0,08*		
	CG	4 °C	6,43±0,07	6,84±0,02*		
		30 °C		6,77±0,03*		
Suspendibilidad (%)	WP	4 °C	97,18±3,53	97,90±2,87	> 90% Báez et al., 2019	
		30 °C		97,26±2,36		
	WG	4 °C	97,51±2,36	98,23±1,61		
		30 °C		98,50±1,41		
Humectabilidad (segundos)	WP	4 °C	> 1 min	> 1 min	<1 minuto FAO/WHO, 2002	
		30 °C		> 1 min		
	WG	4 °C	> 1 min	> 1min		
		30 °C		> 1min		

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de las formulaciones sólidas antes y después de seis meses de almacenamiento a 4 °C y 30 °C. Los resultados son el promedio de cinco réplicas ± la desviación estándar (SD). (Temp.) Temperatura de almacenamiento. Realizado para publicación. \*Resultado significativamente diferente del valor inicial inmediatamente después de la formulación.

Propiedad	Temp.	Valor medio después de la formulación	Valor medio después del almacenamiento	Límite de aceptación / Fuente
$a_w$	4 °C	0,40±0,02	0,45±0,01*	0,2-0,7 Báez et al., 2019
	30 °C		0,46±0,02*	
pH	4 °C	5,42±0,04	5,58±0,07*	5,5-7,5 Báez et al., 2019
	30 °C		5,57±0,02*	
Estabilidad de la emulsión (mL)	4 °C	3,00	3,00	Sin formación de crema después de una hora de reposo Mohammad y Attia, 2015
	30 °C			

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del concentrado emulsionable antes y después de seis meses de almacenamiento a 4 °C y 30 °C. Realizado para publicación. \*Resultado significativamente diferente del valor inicial inmediatamente después de la formulación.

Sistema de liberación	Criterios de selección	4 °C					30 °C					Total
		Germinación (30%)	Viabilidad (30%)	Contenido de contaminantes (15%)	Actividad de agua (5%)	Fisicoquímicos (20%)	Germinación (30%)	Viabilidad (30%)	Contenido de contaminantes (15%)	Actividad de agua (5%)	Fisicoquímicos (20%)	
WP	Estabilidad	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	9,0
	Conformidad	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	8,0
	Puntaje ponderado	0,6	0,6	0,3	0,1	0,4	0,3	0	0,3	0,1	0,4	3,1
WG	Estabilidad	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	7,0
	Conformidad	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	7,0
	Puntaje ponderado	0,0	0,6	0,3	0,1	0,4	0	0	0,3	0,1	0,4	2,2
CG	Estabilidad	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	7,0
	Conformidad	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	7,0
	Puntaje ponderado	0,0	0,6	0,3	0,1	0,4	0	0	0,3	0,1	0,4	2,2
EC	Estabilidad	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	7,0
	Conformidad	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	7,0
	Puntaje ponderado	0,0	0,6	0,3	0,1	0,4	0	0	0,3	0,1	0,4	2,2

Tabla 4. Selección del sistema de liberación para conidios de *T. asperellum* mediante análisis combinado de la estabilidad microbiológica y fisicoquímica, durante seis meses de almacenamiento a 4 °C y 30 °C. Realizado para publicación.

factura (fig.1). Los prototipos CG, WG y EC presentaron germinaciones finales entre el 75% y el 85% después de seis meses y el prototipo WP fue el único que mantuvo la germinación por encima del 85%.

Los prototipos almacenados a 30 °C también redujeron significativamente ( $F = 76,2$ ;  $gl = 48$ ;  $p < 0,0001$ ) la germinación; el

WP fue el único producto capaz de germinar después de seis meses de almacenamiento, con resultado del 80%.

La viabilidad inicial de los prototipos estuvo entre  $3,92 \times 10^8$  y  $6,48 \times 10^8$  UFC/g o ml. No se detectaron diferencias significativas ( $F = 8,88$ ;  $gl = 68$ ;  $p > 0,05$ ) entre la viabilidad inicial, intermedia y final de los formulados almacenados a 4 °C (fig. 2).

Por el contrario, la viabilidad de los prototipos almacenados a 30 °C disminuyó progresiva y significativamente ( $F = 145$ ;  $gl = 63$ ;  $p < 0.000$ ) durante el almacenamiento.

En cuanto al contenido de contaminantes, no se evidenciaron colonias diferentes a las típicas de *T. asperellum* en ninguna de las cajas de la dilución  $10^{-4}$  (dilución más baja sembrada), lo que sugiere que la concentración inicial de microorganismos contaminantes fue inferior a  $10^5$  UFC/g o ml; manteniéndose estable durante los 6 meses de almacenamiento.

### Estabilidad fisicoquímica

La densidad apisonada de los tres prototipos sólidos se presenta en la tabla 2. Después de 6 meses de almacenamiento, esta característica se redujo para el formulado WP y se incrementó en el WG, mientras que para el CG no presentó cambio. En cuanto al tamaño de partícula, el 80,46% de las partículas del prototipo WP pasaron a través del tamiz de 106  $\mu\text{m}$ , el gránulo cubierto presentó un tamaño entre 250  $\mu\text{m}$  y 2 mm y el gránulo dispersable entre 250  $\mu\text{m}$  y 1,70 mm, sin cambios durante el almacenamiento (tabla 2).

Aunque el CG presentó una reducción significativa de la humedad después de 6 meses de almacenamiento, los valores obtenidos para este prototipo al igual que los presentados por el WG durante los seis meses de almacenamiento a 4 °C y 30 °C, estuvieron dentro del rango de aceptación (4%-8%) para esta característica. El prototipo WP registró los menores valores de humedad con resultados inferiores al 3% (tabla 2). La actividad de agua de los cuatro sistemas de liberación fue inferior a 0,7 (tabla 2) y pH estuvo entre 5 y 7.

Por un lado, los prototipos WP y WG presentaron suspendibilidad estable durante los seis meses de almacenamiento a las dos temperaturas evaluadas, con valores entre el 94% y 99%. Por otro lado, la humectabilidad de dichos sistemas de liberación estuvo por fuera del estándar de calidad (<1 minuto) desde el momento de su manufactura.

La emulsión formada por el EC presentó crema con un volumen de 3 ml después de una hora de reposo (tabla 3), sin detectarse cambios significativos en el comportamiento del prototipo relacionados con la temperatura o el período de almacenamiento. Este volumen de crema fue superior al volumen de producto reconstituido (2 ml) y el resto del líquido se tornó translúcido, pero manteniendo un color verde intenso y homogéneo en todo el volumen.

### Selección del sistema de liberación de conidios de *T. asperellum*

En la tabla 4 se presentan los puntajes asignados a cada prototipo en cada uno de los criterios evaluados. El sistema de liberación que alcanzó el mayor puntaje ponderado fue el WP con un valor de 3,2 que fue superior al valor de 2,2 alcanzado por los tres prototipos restantes.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Todos los prototipos de formulación evidenciaron una reducción en la capacidad de germinación durante el almacenamiento a las dos temperaturas. Esta pérdida de germinación es consecuencia del efecto negativo de la deshidratación durante los procesos de secado ya que causa daños en la membrana celular y lleva a la muerte durante el almacenamiento

o en el momento de la rehidratación (Borges, 1998; Santos *et al.*, 2012). La composición y proceso de formulación también pudieron jugar un papel importante en la estabilidad de la germinación, como lo demostraron Santos *et al.* (2012) al comparar un polvo para espolvoreo y un gránulo dispersable a base de una cepa de *T. asperellum* y otra de *T. koningiopsis*. Estos autores encontraron que el polvo para espolvoreo fue más estable, con al menos 10 meses de vida útil a 8 °C y 18 °C. Viera *et al.* (2018) también encontraron mayor estabilidad de la viabilidad de *T. asperellum* y *Purpuricillium lilacinus* con formulaciones sólidas (gránulos y polvos) que con un concentrado emulsionable. El límite mínimo de germinación establecido para asegurar que una formulación comercial a base de hongos actúe rápidamente en campo es del 85% (Marín y Bustillo 2002), estándar de calidad que solamente fue mantenido en este estudio por el prototipo WP almacenado a 4 °C.

Todos los prototipos almacenados a temperatura de refrigeración mantuvieron la viabilidad por encima del límite de aceptación ( $>1 \times 10^8$  UFC/g o ml) después de seis meses de almacenamiento. Por el contrario, la viabilidad se vio negativamente afectada cuando se incrementó la temperatura (30 °C), efecto ampliamente descrito para diferentes microorganismos y formulaciones (Melin *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012). La estabilidad bajo condiciones de refrigeración se debe a que las bajas temperaturas reducen la actividad metabólica, evitando la producción de metabolitos tóxicos y el agotamiento de nutrientes, lo que reduce la tasa de mortalidad de los propágulos (Santos *et al.* 2012).

Cabe destacar que para las formulaciones CG y EC almacenadas 6 meses que no presentaron germinación a las 24 horas de incubación, se obtuvieron colonias en la prueba de viabilidad, lo que sugiere que algunos conidios se encontraban viables, pero posiblemente en estados de latencia que retrasaron su germinación.

La estabilidad del prototipo WP podría estar relacionada con su menor contenido de humedad (<3%) ya que bajos niveles han sido recomendados para reducir al mínimo los procesos metabólicos e inducir estados de latencia que mantengan la viabilidad durante el almacenamiento (Inmediato *et al.*, 2017). Dichos estados de latencia son también favorecidos por bajos niveles de actividad de agua (Swaminathan *et al.*, 2016), como los presentados por los prototipos evaluados en el presente estudio, estos que se mantuvieron estables durante el almacenamiento a las dos temperaturas. Este efecto pudo haber sido determinante para el prototipo WP que presentó la menor actividad de agua (0,28) y la mayor estabilidad de la viabilidad.

Los cuatro prototipos mostraron una alta pureza cumpliendo con el límite de aceptación para esta característica, el cual corresponde al <0,1% de la concentración del ingrediente activo (Marín y Bustillo, 2002). Un bajo contenido de contaminantes es deseable, ya que otros microorganismos en la formulación pueden influir negativamente en la vida útil y eficacia del producto. Además, los contaminantes microbianos pueden ser patógenos y representar un riesgo para la salud de los agricultores y los consumidores finales (Ravensberg, 2011). El bajo contenido de contaminantes en los prototipos elaborados en este estudio se podría deber a la pureza del ingrediente activo, el uso de excipientes de calidad farmacéutica y alimenticia y la manufactura bajo condiciones de asepsia.

Los tres sistemas de liberación sólidos presentaron baja humectabilidad, que sugiere hidrofobicidad de los conidios y los excipientes o una baja densidad de la formulación que retarda



su mojado (Helman, 1982). Otro factor pudo ser una alta porosidad, ya que un volumen considerable de aire en los espacios intraparticulares aumenta la flotabilidad de las partículas dificultando su mojado (Villamizar y Cotes, 2003).

El pH determinado en los cuatro prototipos se encontró dentro de los estándares de aceptación, con valores entre 5 y 7 recomendados para no causar efectos negativos en la viabilidad del hongo (Marín y Bustillo, 2002). Los prototipos WP y WG presentaron una suspendibilidad del 90% que se considera adecuada para formulaciones dispersables de aplicación con equipos de aspersión. Sin embargo, otros autores han establecido límites más permisibles como Hidalgo (2014), quien considera que formulaciones de tipo polvo mojable y gránulo dispersable deben presentar suspendibilidad mínima del 60% para asegurar homogeneidad en la aplicación.

Los prototipos sólidos también presentaron homogeneidad del tamaño de la partícula, lo que evitará problemas de segregación o aglomeración durante el empaque y almacenamiento del producto.

La emulsión formada con el producto EC se consideró inestable debido a la alta formación de crema durante el periodo de reposo. La crema es una emulsión rica en fase oleosa que migra a la superficie debido a una menor densidad con respecto al agua y se observa de color blanco lechoso (Masmoudi *et al.*, 2005). El cremado observado en el presente estudio sugiere una inapropiada relación de fases al momento de reconstituir (baja concentración de fase oleosa o EC), la utilización de un tensioactivo inadecuado o una baja concentración de tensioactivo.

El WP obtuvo el puntaje final más alto en el análisis combinado de parámetros de calidad por ser el prototipo que mostró la mejor estabilidad de la germinación, uno de los parámetros más importantes para determinar la vida útil del producto.

La temperatura de almacenamiento fue el factor determinante de la estabilidad de los prototipos de formulación, cuyas propiedades fisicoquímicas se mantuvieron estables a las dos temperaturas evaluadas, pero evidenciaron una drástica reducción de su viabilidad a 30 °C. El polvo mojable (WP) fue seleccionado como el sistema de liberación con mayor potencial para desarrollar un bioproducto a base *T. asperellum* Ta001, el cual mantuvo estable todos los parámetros fisicoquímicos y la viabilidad del microorganismo durante seis meses de almacenamiento bajo condiciones de refrigeración.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan sus agradecimientos a AgResearch Ltd. (Nueva Zelanda) y a todo el personal del Laboratorio de Control Biológico del INIAP (Ecuador) por el apoyo técnico y al Ministry of Foreign Affairs and Trade (MFAT, Nueva Zelanda) por el financiamiento de esta investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

BÁEZ, F.X.; PERDOMO, C.E.; PINCAY, A.K.; TELLO, C.M.; VILLAMIZAR, L.F.; TREVOR, J.; JARONSKI, S.; VIERA, W.F. 2019. Manual de análisis de calidad para formulaciones con base en hongos biocontroladores. Manual N.º 112. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina. Mejía, Ecuador. 45 p.

BETTIOL, W.; RIVERA, M.C.; MONDINO, P.; MONTEALEGRE, J.R.; COLMENÁREZ, Y. 2014. Control biológico de enfermedades de plantas en Argentina. Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. <https://doi.org/10.13140/2.1.2368.5922>

BISSETT, J.; GAMS, W.; JAKLITSCH, W.; SAMUELS, G.J. 2015. Accepted Trichoderma names in the year 2015. *IMA Fungus*, 6(2), 263-295. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2015.06.02.02>

BURGES, H. 1998. Formulation of Microbial Biopesticides: Beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic. Dordrecht, Países Bajos.

DIÁZ, G.; GÓMEZ, A.; GRIJALBA, E.; SANTOS, A.; CRUZ, F.; LEÓN, D.; ALARCÓN, E.; COTES, A. 2018. Desarrollo y escalamiento de plaguicidas. En: COTES, A.M. (Ed.). Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros (Capítulo 12). (Vol. 2). AGROSAVIA. Mosquera, Colombia.

FAO/WHO. 2002. Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. Primera edición. FAO plant production and protection paper 173. FAO, Roma.

FAO. 2004. Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas. Primera edición. Organización Mundial de la Salud y Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 256p. (Disponible: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42968/9253048573.pdf?jsessionid=C3E432FF3BEDC5CE811E842EF8080AEF?sequence=1> verificado: 06 de junio de 2020).

FERNÁNDEZ, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado De Plagas (Costa Rica), (62), 96-100. <http://hdl.handle.net/11554/6578>

HELMAN, J. 1982. Farmacotecnia teórica y práctica. Tomo v. Editorial Continentals S.A. De México. 1687-1728.

HIDALGO, C. 2014. Especificaciones de plaguicidas y equivalencia. Costa Rica. (Disponible: <https://www.croplifela.org/PDF/documentos/Libro-Equivalencias-Plaguicidas.pdf> verificado: 06 de junio de 2020).

IMMEDIATO, D.; IATTA, R.; CAMARDAL, A.; GIANGASPERO, A.; CAPELLI, G. AGUIAR, L.; OTRANTOL, D.; CAFARCHIAL, C. 2017. Storage of Beauveria bassiana Conidia Suspension: A Study Exploring the Potential Effects on Conidial Viability and Virulence against Dermanyssus gallinae. *Annals of Biological Sciences*, 5 (2): 69-76.

KIM, J.J.; XIE, L.; HAN, J.H.; LEE, S.Y. 2014. Influence of Additives on the Yield and Pathogenicity of Conidia Produced by Solid State Cultivation of an *Isaria javanica* Isolate. *Mycobiology*, 42(4), 346-352. doi:10.5941/MYCO.2014.42.4.346

MARÍN, P.; BUSTILLO, Á. 2002. Pruebas Microbiológicas Y Físico - Químicas Para El Control De Calidad De Hongos Entomopatógenos. *Control*, 1-18.

MASMOUDI, H.; LE, D.Y.; PICCERELLE, P.; KISTER, J. 2005. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions, aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int. J. Pharmaceut.* 289: 117-131.

MELIN, P.; HAKANSSON, S.; EBERHARD, T. 2006. Survival of the biocontrol yeast *Pichia anomala* after long-term storage in liquid formulations at different temperatures, assessed by flow cytometry. *J. Appl. Microb.* 100. 264-271 pp.

MOHAMMAD, T.; ATTIA, H. 2015. Eco-friendly Oil-in-Water Emulsion Formulation of Eucalyptus Oil for Controlling Some Important Phytopathogenic Fungi. *American Journal of Experimental Agriculture* 9(1): 1-10. Article N.º AJEA. 18262.

QUIROGA, I.; GÓMEZ, A.; VILLAMIZAR, R. 2011. Estabilidad de formulaciones a base de granulovirus para controlar *tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología* 37 (1): 27-35. (Disponible: <http://www.scielo.org.co/pdf/rcen/v37n1/v37n1a05.pdf> verificado: 06 de junio de 2020).

RAVENSBERG, W. 2011. Progress in biological control. A Roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of Arthropods. Springer Netherlands. Países Bajos.

SANTOS, A.; GARCÍA, M.; COTES, A.; VILLAMIZA, L. 2012. Efecto de la formulación sobre la vida útil de bioplaguicidas a base de dos aislamientos colombianos de *Trichoderma koningii* Th003 y *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 150-156. <https://doi.org/10.1016/J.RIAM.2011.11.002>

SWAMINATHAN, J.; VAN KOTEN, C.; HENDERSON, H.; JACKSON, T.; WILSON, M. 2016. Formulations for delivering *Trichoderma atroviridae* spores as seed coatings, effects of temperature and relative humidity on storage stability. *J Appl Microbiol*, 120: 425-431. doi:10.1111/jam.13006

THANGAVELU, R.; GOPI, M. 2015. Combined application of native *Trichoderma* isolates possessing multiple functions for the control of *Fusarium* wilt disease in banana cv. Grand Naine. *Biocontrol Science and Technology* 25 (10):1147-1164. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2015.1036727>

VIERA, W.; NOBOA, M.; BERMEO, J.; BÁEZ, F.; JACKSON, T. 2018. Parámetros de calidad de cuatro tipos de formulaciones a base de *Trichoderma asperellum* y *Purpuricillium lilacinum* (December). *Enfoque UTE*. 9. 145-153. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute>

VILLAMIZAR, L.; COTES, A.M. 2003. Efecto de las condiciones de cultivo sobre parámetros del modo de acción de *Metarhizium anisopliae*. Revista Colombiana de Entomología 29 (2): 121-126.

VILLAMIZAR, L.; GARCIA, M.; COTES, A.M. 2010. Desarrollo de una formulación a base de *Trichoderma koningiopsis*. En: MORENO, C.; COTES, A.M. (Eds.). Desarrollo de un bioplaguicida a base de *Trichoderma koningiopsis* Th003 y uso en el cultivo de lechuga para el control del moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Sclerotinia minor*). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Corpoica (Agrosavia). Bogotá. 76 p. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12768>

YEDIDIA, I.; SHORESH, M.; KEREM, Z.; BENHAMOU, N.; KAPULNIK, Y.; CHET, I. 2003. Concomitant Induction of Systemic Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in Cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and Accumulation of Phytoalexins. Applied and Environmental Microbiology. 69 (12):7343-7353.

ZHANG, S.; SCHISLER, D.; JACKSON, M.; BOEHM, M.; SLININGE, P.; LIU, Z. 2006. Cold shock during liquid production increases storage shelf – life of *Cryptococcus nodaensi*. 16 (3): 281-293.