ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE LA LEVADURA *Pichia onychis* Lv027 CON EXCIPIENTES Y CARACTERIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN MODIFICADA

ERIKA ANDREA ALARCÓN TORRES

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar por el título de

Microbióloga Industrial

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL

BOGOTÁ, D.C. COLOMBIA

Febrero de 2009

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velá por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE LA LEVADURA *Pichia onychis* Lv027 CON EXCIPIENTES Y CARACTERIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN MODIFICADA

ERIKA ANDREA ALARCÓN TORRES

Laura Fernanda Villamizar D.Sc.
Director

Carlos Andrés Moreno M.Sc.
Codirector

Magda Xiomara García M.S.c
Asesor

Juliana Gómez. M.I.
Jurado

Ivonne Gutiérrez M.Sc.
Jurado

ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE LA LEVADURA *Pichia onychis* Lv027 CON EXCIPIENTES Y CARACTERIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN MODIFICADA

ERIKA ANDREA ALARCÓN TORRES

APROBADO

Ingrid Schuler. Ph.D **Decana Académica**	**Janeth Arías M.Sc.** **Directora de Carreras de Microbiología**

Con amor dedico este trabajo a Dios por darme la sabiduría y fortaleza.

A mis padres Higinio Alarcón y Raquel Torres por su inmenso amor, enseñanzas, confianza y apoyo incondicional.

A mi hermano Julián Alarcón por su cariño, compañía y comprensión.

A mis amigos por sus palabras de apoyo e incondicional amistad.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Alba Marina Cotes Prado Ph.D. Directora del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica, por brindarme la oportunidad de desarrollar el presente trabajo y hacer parte de su excelente grupo de investigación.

A la Doctora Laura Fernanda Villamizar D.Sc. Investigadora del Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica, por su inmensa colaboración, orientación, confianza y dedicación en el desarrollo de este trabajo y por su invaluable contribución en mi formación personal y profesional.

A Carlos Andrés Moreno M.Sc. Investigador del Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica, por su constante orientación, apoyo y acompañamiento en el desarrollo de la presente investigación.

A Magda Xiomara García M.Sc. Investigadora del Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica, por su incondicional orientación y colaboración en el desarrollo de este trabajo y por su valiosa amistad.

A Adriana Santos, Estudiante de Microbiología Industrial de la Pontificia Universidad Javeriana y tesista del Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica, por su constante ayuda y por su amistad incondicional.

A todos los investigadores, estudiantes y auxiliares del Laboratorio de Control Biológico del CBB de Corpoica, por todas sus enseñanzas, colaboración y amistad.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron en la realización del presente trabajo.

Febrero, 2009.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

1. INTRODUCCIÓN 22

2. MARCO TEORICO Y REVISIÓN DE LITERATURA 25

2.1. USO DE LEVADURAS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO 25

2.1.1. Mecanismos de acción 26

2.1.2. Generalidades de las levaduras 27

2.1.2.1. Clasificación taxonómica de *Pichia onychis* 29

2.1.2.2. Características de *Pichia onychis* 30

2.2. BIOPLAGUICIDAS COMERCIALES A BASE DE LEVADURAS 30

2.3. BIOPLAGUICIDAS 32

2.3.1. Formulación de bioplaguicidas 32

2.3.2. Tipos de formulación 34

2.3.2.1. Formulaciones líquidas 35

2.3.2.2. Formulaciones sólidas 35

2.3.3. Ingredientes comunmente utilizados en las formulaciones 37

2.4. GRANULADOS 38

2.4.1. Proceso de granulación 39

2.4.2. Características de los granulados 39

2.4.2.1. Tamaño de partícula 40

2.4.2.2. Fluidez 42

2.4.2.3. Voluminosidad 42

2.4.2.4. Humedad 42
2.4.2.5. Humectabilidad 43
2.4.2.6. pH 43
2.4.2.7. Porosidad 44
2.4.2.8. Desintegración 45
2.4.2.9. Estabilidad 45
2.5. ESTABILIDAD DE BIOPLAGUICIDAS EN ALMACENAMIENTO 46
2.6. PATÓGENOS DE LA SUPERFICIE FOLIAR 47
2.6.1. Generalidades de *Botrytis cinerea* 48
2.6.1.1. Taxonomía y características de *Botrytis cinerea* 49
2.6.1.2. Ciclo de la enfermedad 50
3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN 54
3.1. Justificación de la investigación 54
3.2. Formulación del problema 58
4. OBJETIVOS 59
4.1. Objetivo general 59
4.2. Objetivos específicos 59
5. MATERIALES Y MÉTODOS 60
5.1. MICROORGANISMO BIOCONTROLADOR 60
5.1.1. Colección de trabajo de Lv027 60
5.2. RECUPERACIÓN DEL MICROORGANISMO PATÓGENO 61
5.3. PRODUCCION DE LA LEVADURA Lv027 62
5.3.1. Separación de la biomasa de la levadura Lv027 62

5.4 ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 CON LOS AUXILIARES DE FORMULACIÓN 62
5.5. AJUSTE DE LA FORMULACIÓN DEL PROTOTIPO GRANULADO . 64
5.6. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO OPTIMIZADO 65
5.6.1. Caracterización fisicoquímica 65
5.6.1.1. Determinación del pH 65
5.6.1.2. Humedad 66
5.6.1.3. Humectabilidad 66
5.6.1.4. Desintegración 67
5.6.1.5. Voluminosidad 67
5.6.1.6. Porosidad 68
5.6.1.7. Fluidez estática 68
5.6.1.8. Suspendibilidad 69
5.6.1.9. Tamaño de partícula 70
5.6.2. Caracterización microbiológica 71
5.6.2.1. Contenido de contaminantes 71
5.6.2.2. Concentración 72
5.6.2.3. Viabilidad 72
5.7 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL GRANULADO BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO 73
5.7.1. Estabilidad microbiológica 74
5.7.2. Estabilidad de la actividad biocontroladora 74
5.7.2.1. Preparación de los inóculos de levadura y de *B. cinerea* 75
5.7.2.3. Inoculación de los pétalos 75
5.7.2.3. Evaluación de la actividad biocontroladora 76

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 78
6.1. PRODUCCION DE Lv027 78
6.2. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 CON LOS AUXILIARES DE FORMULACIÓN 79
6.3. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO 87
6.3.1. Caracterización fisicoquímica 88
6.3.1.1. pH 88
6.3.1.2. Humedad 89
6.3.1.3. Humectabilidad 91
6.3.1.4. Desintegración 94
6.3.1.5. Voluminosidad 96
6.3.1.6. Porosidad 98
6.3.1.7. Fluidez estática 100
6.3.1.8. Suspendibilidad 103
6.3.1.9. Tamaño de partícula 107
6.3.1.10. Determinación del contenido de polvos finos 110
6.3.2. Caracterización microbiológica 112
6.3.2.1. Concentración 112
6.3.2.2. Contenido de contaminantes 113
6.3.2.3. Viabilidad 114
6.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL GRANULADO MODIFICADO BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO 115
6.4.1. Estabilidad microbiológica 115
6.4.2. Estabilidad de la actividad biocontroladora 138
7. CONCLUSIONES 156

8. RECOMENDACIONES 157

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 158

10. ANEXOS 174

ÍNDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Aislamiento de la levadura Lv027 en Agar YM. 61
Figura 2. Crecimiento de *B. cinerea* Bo007 en Agar PDA..... 61
Figura 3. Levadura Lv027 liofilizada formulada y sin formular 65
Figura 4. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 después de tres meses de almacenamiento a 8ºC con los excipientes de formulación del prototipo granulado..... 81
Figura 5. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 después de tres meses de almacenamiento a 18ºC con los excipientes de formulación del prototipo granulado..... 82
Figura 6. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 después de tres meses de almacenamiento a 28ºC con los excipientes de formulación del prototipo granulado..... 84
Figura 7. Granulado modificado a base de la levadura Lv027..... 87
Figura 8. Comportamiento de la concentración de la levadura Lv027 en la suspensión obtenida al reconstituir el bioplaguicida del lote 1, durante 180 minutos de reposo. 104
Figura 9. Comportamiento de la concentración de la levadura Lv027 en la suspensión obtenida al reconstituir el bioplaguicida del lote 2, durante 180 minutos de reposo. 104
Figura 10. Distribución del tamaño de partícula para los lotes 1 y 2 del granulado a base de la levadura Lv027 109
Figura 11. Comportamiento de la viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 8°C 121
Figura 12. Comportamiento de la viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 18°C 122
Figura 13. Comportamiento de la viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 28°C 123

Figura 14. Viabilidad de la levadura Lv027 formulada después de tres meses de almacenamiento en las tres temperaturas evaluadas..... 124
Figura 15. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular empacada con vacío y sin vacío después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C..... 125
Figura 16. Viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular empacada con vacío y sin vacío, después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C..... 135
Figura 17. Actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 8°C..... 140
Figura 18. Actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 18°C..... 142
Figura 19. Actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 28°C..... 143
Figura 20. Pérdida de la eficacia de la actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular empacada con vacío y sin vacío después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C..... 145
Figura 21. Enfermedad causada por *B. cinerea* en pétalos de rosa..... 153

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Productos a base de levaduras registrados actualmente en el mundo 32
Tabla 2. Tratamientos del estudio de compatibilidad de la levadura Lv027 con auxiliares de formulación 63
Tabla 3. Tratamientos del estudio de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento. 74
Tabla 4. Tratamientos del estudio de evaluación de la actividad biocontroladora 76
Tabla 5. Características físico-químicas del granulado a base de la levadura Lv027. 112
Tabla 6. Valores de F calculados y críticos para las hipótesis planteadas para cada tratamiento en el estudio de estabilidad microbiológica. 119
Tabla 7. Comparación de los resultados de pérdida de viabilidad (UFC/g) del granulado y la biomasa sometidos a diferentes procesos de secado y empaque y almacenados durante tres meses a 8°C, 18°C y 28°C..... 137
Tabla 8. Valores de F calculados y críticos para las hipótesis planteadas para cada tratamiento en el estudio de estabilidad de la actividad biocontroladora. 139

ÍNDICE DE ANEXOS

Pág.

Anexo 1. Viabilidad de la levadura Lv027 (UFC/g) en la prueba de compatibilidad después tres meses de almacenamiento a 8°C..... 174
Anexo 2. Viabilidad de la levadura Lv027 (UFC/g) en la prueba de compatibilidad después tres meses de almacenamiento a 18°C..... 175
Anexo 3. Viabilidad de la levadura Lv027 (UFC/g) en la prueba de compatibilidad después tres meses de almacenamiento a 28°C..... 176
Anexo 4. Pérdida de viabilidad (%) de la levadura Lv027 en la prueba de compatibilidad después tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C..... 177
Anexo 5. Análisis estadístico aplicado a los datos de pérdida de viabilidad en la prueba de compatibilidad después de tres meses de almacenamiento a 8°C..... 178
Anexo 6. Análisis estadístico aplicado a los datos de pérdida de viabilidad en la prueba de compatibilidad después de tres meses de almacenamiento a 18°C..... 179
Anexo 7. Análisis estadístico aplicado a los datos de pérdida de viabilidad en la prueba de compatibilidad después de tres meses de almacenamiento a 28°C..... 180
Anexo 8. Caracterización del granulado modificado en las pruebas de pH, humedad, humectabilidad y desintegración..... 181
Anexo 9. Caracterización del granulado modificado en las pruebas de voluminosidad y porosidad. 182
Anexo 10. Caracterización del granulado modificado en la prueba de fluidez estatica 183
Anexo 11. Caracterización del granulado modificado en la prueba de suspendibilidad del lote 1..... 184

Anexo 12. Caracterización del granulado modificado en la prueba de suspendibilidad del lote 2..... 185
Anexo 13. Variación en la unidad exponencial de la concentración inicial después de tres horas de reposo en la prueba de suspendibilidad del granulado..... 186
Anexo 14. Caracterización del granulado modificado en la prueba de tamaño de partícula..... 187
Anexo 15. Caracterización del granulado modificado en la prueba de contenido de polvos finos. 188
Anexo 16. Concentración del granulado modificado. 189
Anexo 17. Pureza del granulado modificado..... 190
Anexo 18. Viabilidad (UFC/g) de la levadura Lv027 formulada como un granulado, empacada al vacío y almacenada a 8°C, 18°C y 28°C. 191
Anexo 19. Viabilidad (UFC/g) de la levadura Lv027 formulada como un granulado, empacada sin vacío y almacenada a 8°C, 18°C y 28°C. ... 192
Anexo 20. Viabilidad (UFC/g) de la levadura Lv027 sin formular, empacada con vacío y almacenada a 8°C, 18°C y 28°C..... 193
Anexo 21. Viabilidad (UFC/g) de la levadura Lv027 sin formular, empacada sin vacío y almacenada a 8°C, 18°C y 28°C..... 194
Anexo 22. Grados de libertad obtenidos para la comparación de igualdad de tendencias entre lotes en la prueba de estabilidad de la viabilidad de la levadura Lv027 almacenada a 8°C, 18°C y 28°C 195
Anexo 23. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la viabilidad del granulado empacado al vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C..... 196
Anexo 24. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la viabilidad del granulado empacado sin vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C..... 197

Anexo 25. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la viabilidad de la biomasa sin formular empacada al vacío y almacenada a 8°C, 18°C y 28°C. 198
Anexo 26. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la viabilidad de la biomasa sin formular empacada sin vacío almacenada a 8°C, 18°C y 28°C. 199
Anexo 27. Viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 8°C. 200
Anexo 28. Viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 18°C. 201
Anexo 29. Viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 28°C. 202
Anexo 30. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 203
Anexo 31. Análisis estadístico aplicado a los datos de pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 204
Anexo 32. Análisis estadístico aplicado a los datos de viabilidad inicial y final de la levadura Lv027 formulada y sin formular después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 206
Anexo 33. Eficacia del granulado a base de la levadura Lv027 empacado al vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C sobre *Botrytis cinerea*. 208
Anexo 34. Eficacia del granulado a base de la levadura Lv027 empacado sin vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C sobre *Botrytis cinerea*. 209
Anexo 35. Eficacia de la biomasa sin formular de la levadura Lv027 empacada al vacío y almacenada a 8°C, 18°C y 28°C sobre *Botrytis cinerea*. 210

Anexo 36. Eficacia de la biomasa sin formular de la levadura Lv027 empacada sin vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C sobre *Botrytis cinerea.* 211
Anexo 37. Grados de libertad obtenidos para la comparación de igualdad de tendencias entre lotes en la prueba de estabilidad de la actividad biocontroladora de la levadura Lv027 almacenada a 8°C, 18°C y 28°C. 212
Anexo 38. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la actividad biocontroladora del granulado empacado al vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C. 213
Anexo 39. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la actividad biocontroladora del granulado empacado sin vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C. 214
Anexo 40. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la actividad biocontroladora de la biomasa de Lv027 empacada con vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C. 215
Anexo 41. Parámetros necesarios para estimar el valor de F calculado en la estabilidad de la actividad biocontroladora de la biomasa de Lv027 empacada sin vacío y almacenado a 8°C, 18°C y 28°C. 216
Anexo 42. Eficacia de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 8°C. 217
Anexo 43. Análisis estadístico aplicado a los datos de eficacia de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 8°C. 218
Anexo 44. Eficacia de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 18°C. 220
Anexo 45. Análisis estadístico aplicado a los datos de eficacia de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 18°C. 221

Anexo 46. Eficacia de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 28°C. 223
Anexo 47. Análisis estadístico aplicado a los datos de eficacia de la levadura Lv027 formulada y sin formular durante tres meses de almacenamiento a 28°C. 224
Anexo 48. Pérdida de eficacia de la levadura Lv027 formulada y sin formular después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 226
Anexo 49. Análisis estadístico aplicado a los datos de pérdidas de eficacia de la levadura L027 formulada y sin formular después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. 227

RESUMEN

El principal problema para lograr la comercialización de microorganismos biocontroladores, es el desarrollo de formulaciones estables durante el período de almacenamiento, que mantengan la viabilidad y la actividad biocontroladora de las células. En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA, se desarrolló una formulación granulada a base de la levadura *P. onychis* (Lv027), la cual presentó pérdidas significativas de viabilidad, tras seis meses de almacenamiento. Dicha pérdida fue atribuida a un efecto negativo de los auxiliares de formulación sobre las células de la levadura. Por tal razón y con el propósito de optimizar este prototipo, el presente trabajo pretendió evaluar la compatibilidad de la levadura *P. onychis* Lv027 con los auxiliares de formulación utilizados en el prototipo granulado, así como determinar las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas de dos lotes de granulado modificado y evaluar su estabilidad durante tres meses de almacenamiento. La levadura Lv027 fue compatible con todos los excipientes empleados, excepto con el codificado como Lb-01, el cual causó una pérdida de la viabilidad, por lo que fue excluido de la formulación. Posteriormente, se elaboraron dos lotes de granulado con la nueva formulación, los cuales presentaron las siguientes características para cada lote respectivamente: un pH de 6,0 y 5,6, una humedad del 5,4% y 5,0%, una humectabilidad de 77,0 seg y 44,7 seg, una desintegración de 2,4 min y 2,2 min, una voluminosidad de 2,5 mL/g y 2,9 mL/g, una porosidad del 14,4% y 10,7%, una fluidez estática (ángulo de reposo) de 33,5° y 31,8°, una variación inferior a una unidad exponencial en la concentración celular en la prueba de la suspendibilidad, un tamaño de partícula entre 850 µm y 2000 µm y un contenido de polvos finos del 3,8% y del 2,3%. En cuanto a las características microbiológicas, el granulado modificado presentó una concentración promedio de 10^{11} células/g y un contenido de contaminantes de 10^{3} UFC/g para los dos lotes, cumpliendo con los parámetros de calidad establecidos. La viabilidad del granulado no se mantuvo estable durante el almacenamiento, sin embargo la formulación, el empaque al vacío y el almacenamiento a 8°C fueron las condiciones que mejor estabilizaron a la levadura *P. onychis* Lv027, con una pérdida de viabilidad del 13,3% de las unidades logarítmicas. Así mismo, la actividad biocontroladora fue inestable durante el tiempo de almacenamiento, existiendo una posible relación entre la actividad biocontroladora y la viabilidad de las células, cuando se emplea el patosistema *Botrytis cinerea* - pétalos de rosa. Finalmente, los resultados obtenidos permiten concluir que la modificación de la formulación no mejoró la estabilidad del producto.

ABSTRACT

The principal problem to achieve the biocontrol microorganisms marketing is to develop formulations highly stable during storage period, able to maintain the viability and biocontrol activity of the cells. In the Biological Control Laboratory of CORPOICA's Biotechnology and Bioindustry Center, a granulated formulation based on the yeast *P. onychis* (Lv027) was developed, wich presented significant viability losses, after six months of storage. These losses were attributed to a negative effect of the formulation excipients over the yeast cells. In order to improve this prototype, the present study pretended to evaluate the compatibility of the yeast *P. onychis* Lv027 with the granulated formulation excipients, as well as, to determine the physicochemical and microbiological properties of two lots of modified product and to evaluate its stability during three months of storage. The yeast Lv027 was compatible with all the previously used exicipients, except with the codified as Lb-01, which caused a viability loss, and in consequence that was excluded of the formulation. Then, two lots of granulate were elaborated with the new formulation, which presented the following characteristics for each lot respectively: a pH of 6,0 and 5,6, a humidity of 5,4% and 5,0%, a humectability of 77,0 seconds and 44,7 seconds, a disintegration of 2,4 min and 2,2 min, a voluminosity of 2,5 mL/g and 2,9 mL/g, a porosity of 14,4% and 10,7%, a fluidity (resting angle) of 33,5° and 31,8°, a variation lower than one exponential unit in the cellular concentration in the test of the suspendibility, a particle size between 850 µm and 2000 µm and a thin powders content of of 3,8% and 2,3%. For the microbiological characteristics, the modified granulated presented an average concentration of 10^{11} cells/g and a content of contaminants of 10^{3} UFC/g for both lots, fulfilling the quality parameters established. The viability of the granulate was not stable under storage, however, the formulation, the vacuum packing and the storage temperature of 8°C were the conditions that better stabilized the yeast *P. onychis* Lv027 with a viability loss of 13,3% of the logarithmic units. The biocontrol activity also was unstable during storage, suggesting a possible relation between the biocontrol activity and cells viability, when pathosystem *Botrytis cinerea* - rose petals are used. Finally, the obtained results allow to conclude that the modification of the formulation did not improve the stability of the product..

1. INTRODUCCIÓN

Para el manejo integrado de plagas se aplican un conjunto de herramientas de control que son eficaces desde el punto de vista biológico, ecológico y económico; para regular poblaciones de plagas o patógenos por debajo del nivel de daño económicamente aceptable. Una de las herramientas del manejo integrado de plagas es el control biológico (Serrano & Galindo, 2007).

Actualmente el control biológico se utiliza como una alternativa ecológica para limitar el impacto de insectos plagas y de agentes patógenos causantes de enfermedad, especialmente en el sector agrícola (Atlas & Bartha, 2002). Este método de control hace uso de agentes bióticos o sus productos para lograr tal fin (Llácer *et al*., 2000). Dentro de los microorganismos biocontroladores de plagas se encuentran agentes patógenos para insectos, para nematodos, para malezas y microorganismos antagonistas para hongos fitopatógenos; todos estos con potencial para desarrollar bioplaguicidas (Gómez & Villamizar, 2000).

Entre las ventajas de estos productos se encuentran su compatibilidad con la naturaleza, la baja toxicidad para plantas, animales, humanos y la poca o nula probabilidad de inducir resistencia (Gómez & Villamizar, 2000).

Uno de los principales problemas fitosanitarios a nivel mundial, son las enfermedades postcosecha, cuyo inicio se favorece con las lesiones mecánicas en la piel de los frutos, como cortes y picaduras de insectos. Las pérdidas durante la etapa de postcosecha de frutas y hortalizas generadas por patógenos son considerables y pueden llegar hasta el 50% de la producción. Generalmente estas enfermedades son prevenidas mediante la

aplicación de fungicidas químicos sobre la superficie de los frutos, sin embargo, esta práctica está prohibida en varios países, ya que representa un riesgo para la salud del consumidor, como consecuencia de los residuos que pueden permanecer sobre la superficie de los frutos y considerando que muchos de los fungicidas utilizados presentan efectos carcinogénicos, teratogénicos, alta residualidad y toxicidad aguda, un período largo de degradación, contaminación ambiental y otros efectos negativos en animales y humanos. Por dichas razones, el control biológico utilizando levaduras surge como una alternativa promisoria para el manejo postcosecha de diferentes fitopatógenos (Bautista, 2006).

Las levaduras se ubican como organismos ideales para el control biológico de patógenos, debido a que pueden ser aisladas de las superficies de los frutos y hortalizas; además, dentro de este grupo de microorganismos, existen cepas con alta actividad antagónica, que pueden establecerse en los sitios de herida, protegiendo los frutos (Chanchaichaovivat *et al*., 2007). Algunas especies de levaduras son antagonistas ideales de fitopatógenos de frutas y hortalizas, debido a que son genéticamente estables, efectivas a bajas concentraciones, tienen requerimientos nutricionales comunes, tienen la capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas, son efectivas frente a un amplio rango de patógenos, no producen metabolitos que puedan comprometer la salud humana y no son patógenos de vegetales, animales o del hombre. Las levaduras utilizadas para el control de fitopatógenos tienen como principal modo de acción, la competencia por nutrientes y espacio, siendo poco común la producción de antibióticos (García, 2002; Chanchaichaovivat *et al*., 2007).

Una buena formulación es la base para el éxito de un bioplaguicida de origen microbiano; la posibilidad de obtener productos adecuados depende de las propias características del microorganismo y su relación con los

componentes de la formulación y el ambiente de almacenamiento (Engormix, 2008).

Para el desarrollo de nuevos productos de origen biológico se deben tener en cuenta diferentes aspectos: definir un medio de cultivo óptimo y el mejor sistema para la obtención masiva de inóculo, que permita una buena relación costo - rendimiento en la producción; establecer ensayos de producción a pequeña escala; garantizar la estabilidad del producto; determinar las condiciones de almacenamiento; poder utilizar la maquinaria estándar de cualquier explotación agrícola para su aplicación y ser efectivo a unas dosis parecidas a las utilizadas para los agroquímicos. Una vez se desarrolle una formulación, es necesario realizar bioensayos de laboratorio, invernadero y campo que confirmen la efectividad del producto una vez formulado (Engormix, 2008).

El objetivo de una formulación es aumentar la estabilidad durante el almacenamiento y después de la aplicación. Las propiedades físicas y biológicas de la formulación deben permanecer estables por un tiempo mínimo de 12 meses, pero es recomendable que se mantengan durante 18 meses para permitir su comercialización (Engormix, 2008).

2. MARCO TEORICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. USO DE LEVADURAS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO

El control biológico se define como la reducción de la densidad del inóculo o la actividad productora de enfermedad de un patógeno o parásito en su estado activo o latente, por uno o más organismos antagónicos, en forma natural o por manejo del habitante, hospedero o de los propios microorganismos (Agrios, 2005).

El uso de agentes bióticos o sus productos para combatir enfermedades, tiende a interferir de alguna manera con el ciclo biológico del patógeno, o a estimular la reacción de la planta atacada, favoreciendo la creación de barreras físicas, químicas o bioquímicas, de modo que hayan alcanzado niveles suficientes para retrasar, disminuir o impedir el desarrollo del patógeno cuando éste entre en contacto con la planta (Llácer *et al.*, 2000).

Los estudios respecto al uso de levaduras como agentes de biocontrol son relativamente limitados y su énfasis ha sido en el control de patógenos en el filoplano. Sin embargo, las levaduras han sido reportadas como microorganismos potencialmente antagonistas de patógenos en postcosecha, para lo cual ya existen algunos tratamientos que previenen el deterioro de las frutas principalmente. Las levaduras *Cryptococcus albidus, Candida oleophila, Candida laurentii, Candida saitoana y Debaryomyces hansenii,* son representativas como agentes para el control de patógenos en la superficie de heridas de cítricos y manzanas, tales como *Botrytis cinerea, Penicillium expansum y Penicillium digitatum*. La levadura *Pichia anomala* con alta actividad antagónica en granos de trigo, inhibiendo el crecimiento de *Penicillium roqueforti* (Druvefors *et al.*, 2005).

2.1.1. Mecanismos de acción

Dentro de los principales modos de acción de las levaduras contra fitopatógenos se encuentran**:**

- **Antibiosis**

La secreción de sustancias antibióticas o metabolitos tóxicos por parte de los microorganismos, es un fenómeno natural y frecuente. Estos metabolitos actúan en bajas concentraciones (menores a 10 ppm) y son capaces de interferir en la germinación, el crecimiento y la esporulación de microorganismos patógenos (Bautista, 2006).

Levaduras como *Saccharomyces sp* y *Zygosaccharomyces sp* han presentado este mecanismo de acción frente a *Rhizoctonia fragariae* y *Sclerotinia sclerotiorum*, al igual que *Pichia membranifaciens* contra *Botrytis cinerea* (García, 2002; Khaled & Sivasithamparam, 2006).

- **Competencia**

Puede definirse como el desigual comportamiento de dos o más organismos ante un requerimiento común, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los dos organismos, reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es que haya “escasez” de un elemento, si hay exceso no hay competencia. La competencia más común es por nutrientes, oxígeno o espacio (Khaled & Sivasithamparam, 2006).

La rápida colonización y la supervivencia de las levaduras en la filósfera, requiere el uso de los nutrientes y el espacio disponibles para su pronta proliferación, reduciendo así el crecimiento y desarrollo del patógeno, la incidencia de la infección y el establecimiento del patógeno en más tejidos de las frutas y vegetales (Bautista, 2006).

Algunas investigaciones acerca de la competencia por espacio de las levaduras, mencionan que éstas son efectivas colonizadoras de la superficie de las plantas y se destacan por la producción de materiales extracelulares (polisacáridos), que restringen el espacio para la colonización de otros microorganismos (Khaled & Sivasithamparam, 2006).

Levaduras como *Pichia guilliermondii, C. oleophila, Cryptococcus laurentii, Metschnikovia polcherrima, Candida saitoana, Rhodotorula glutinis* emplean este mecanismo frente a hongos como *B. cinerea, P. expansum* y *P. italicum* (García, 2002; Khaled & Sivasithamparam, 2006).

- **Interacción directa**

La acción que puede ejercer el agente biocontrolador sobre el patógeno se debe a una necesidad de crecimiento. Se ha descrito en la literatura que la acción de levaduras sobre patógenos, provoca la desintegración de las paredes celulares de éstos. Tal es el caso de la levadura antagonista *Pichia guillermondii* para el control de *P. italicum* en cítricos, como también la lisis de las hifas de *Botrytis cinerea* en postcosecha de manzanas (Bautista, 2006); al igual que levaduras como *P. anomala, P. membranifaciens, C. laurentii* y *C. oleophila* contra *B. cinerea, P. expansum, P. roqueforti, R. stolonifer* y *A. niger* (García, 2002; Khaled & Sivasithamparam, 2006).

2.1.2. Generalidades de las levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares durante todo o parte de su ciclo de vida, las células tienen forma esférica, ovalada o alargada. La longitud de las levaduras varía entre 4.5 a 21 micras dependiendo del tipo de célula. Su ancho es menos variable y fluctúa entre 2.5 y 10 micras. Las micro estructuras de una célula de levadura están conformadas básicamente por la pared celular, membrana citoplasmática, núcleo, vacuolas, mitocondrias,

glóbulos grasos, volutina o cuerpos polifosfatados y el citoplasma (Madigan *et al.,* 2001).

Los principales componentes de la pared celular de las levaduras son (1-3)-β-D-glucano (50%), que también contiene algunos enlaces (1-6)-β- (5%); manoproteína, de la cual la mayor parte son carbohidratos; (1-6)-β-D-glucano, que también contiene algunos enlaces (1-3)-β- (14%), es un constituyente relativamente menor (15%); y quitina (0.6 a 9%) que está presente en bajo nivel (Santos *et al.*, 2000).

Las levaduras se reproducen asexualmente, ya sea por gemación o fisión. En cuanto a la gemación, el protoplasma de la célula se encuentra cubierto por una membrana delgada, la cual empuja la pared de la célula para formar una yema que va a dar origen a una célula hija. Esta yema crece hasta causar el estrangulamiento de la base y la célula hija puede a la vez producir una yema mientras está adherida a la célula madre, formando así una cadena de células. Durante este proceso el núcleo se divide en dos, uno pasa a la yema y el otro permanece en la célula madre. En el caso de la fisión, la célula madre se alarga, el núcleo se divide y ocurre por estrangulamiento, una simple partición de la pared celular (Alexopoulos *et al.*, 1996). También pueden reproducirse sexualmente por medio de la formación de ascosporas o basidiosporas (Kurtzman & Fell, 1999).

Las levaduras son organismos cosmopolitas, que se pueden encontrar en climas húmedos y secos, en los templados, cálidos y fríos. Pueden ser recuperadas del aire, agua marina, agua dulce y del suelo. Usualmente crecen alrededor de un amplio rango de valores de pH, permitiendo colonizar lugares donde haya ocurrido actividad fermentativa por parte de bacterias. La máxima temperatura de crecimiento es de 45° a 48ºC, observado en especies de levaduras que habitan el tracto intestinal de animales y del

hombre. También su hábitat puede ser a menudo rico en fuentes simples de carbono orgánico, líquido o con una humedad alta, ácido u ocasionalmente alcalino y nutricionalmente complejo, condiciones que pueden encontrarse en los tejidos de plantas, restos vegetales, exudados de raíces, hojas y flores entre otros (Kurtzman & Fell, 1999).

El género *Pichia* se reproduce asexualmente por brotación multilateral sobre una base angosta. Algunas especies pueden formar artroconidias. Las células son esféricas, elipsoidales o elongadas y ocasionalmente pueden ser afiladas. Algunas especies pueden producir pseudohifas e hifas verdaderas (Kurtzman & Fell, 1999).

Las ascas pueden producir de una a cuatro ascosporas que tiene forma saliente de sombrero, hemiesferoidales o esferoidales. Generalmente las ascas son delicuescentes, pero ocasionalmente son persistentes. Las especies son homotálicas ó heterotálicas (Kurtzman & Fell, 1999).

2.1.2.1. Clasificación taxonómica de *Pichia onychis*

REINO*:*	*Fungi*	
DIVISIÓN:	*Ascomycota*	
CLASE:	*Saccharomycetes*	
ORDEN:	*Saccharomycetales*	
FAMILIA*:*	*Saccharomycetaceae*	
GÉNERO:	*Pichia*	
ESPECIE:	*Pichia onychis*	(NCBI, 2008)

2.1.2.2. Características de *Pichia onychis*

Las células de *P. onychis* son ovoides con un tamaño aproximado de 2 µm a 4.5 µm de ancho y 2.8 µm a 7.8 µm de largo. Pueden presentarse individualmente o en parejas. Las colonias son de tamaño pequeño, color beige, brillantes y relucientes. Es posible observar la presencia de pseudomicelio simple y escasamente ramificado, pero esta especie nunca forma un micelio verdadero (Kurtzman & Fell, 1999).

La reproducción sexual ocurre por ascas. Las ascas no son conjugadas y producen de una a cuatro ascosporas con forma de sombrero, éstas son liberadas rápidamente después de su formación. Las ascosporas pueden observarse en Agar Extracto de Malta al 5%, Agar Extracto de Malta-Extracto de Levadura (YM) o Agar V8, tras diez días de incubación a 25º C. La reproducción vegetativa ocurre por la formación de brotes multilaterales (Kurtzman & Fell, 1999).

P. onychis se caracteriza por fermentar azúcares como la glucosa y la sacarosa y asimilar otros como la maltosa, la celobiosa, la trehalosa, la rafinosa y la D-xilosa, también puede asimilar otros compuestos como el glicerol y el etanol, así como el gluconato, el lactato, el citrato y el succinato (Kurtzman & Fell, 1999).

2.2. BIOPLAGUICIDAS COMERCIALES A BASE DE LEVADURAS

A pesar del alto potencial biocontrolador por parte de las levaduras, tan solo 5 bioplaguicidas a base de éstas, tienen registro comercial a nivel mundial y ninguno de ellos a base de la especie *Pichia onychis.*

Productos a base de levaduras como Aspire®, cuyo principio activo es la cepa *Candida oleophila I-182* (Ecogen, Langhorme, PA) y Yield plus®, a base de *Cryptococcus albidus*, se encuentran comercialmente disponibles para el biocontrol de mohos en frutas como manzanas y cítricos en postcosecha (Druvefors *et al.,* 2005; Elmer & Reglinski, 2006).

Aspire® es quizá el producto más importante a base de levaduras para el control de enfermedades en postcosecha, por ser el primero de esta clase en obtener un registro comercial y de venta. De acuerdo a la EPA, la levadura *Candida oleophila I-182,* inhibe el crecimiento de hongos cuando es aplicada después de la cosecha y puede ser utilizado en frutas, vegetales, plantas de invernadero y ornamentales. Estudios demostraron que no es tóxica o patógena para los animales y que no causa ningún efecto adverso (Burges, 1998; Copping, 1998; EPA, 2008).

También se han desarrollado productos a base de levaduras con la adición de sustancias bioactivas. Tal es el caso de dos productos denominados Bio-Coat®, resultado de la mezcla de *Candida saitoana* con sales de quitosan y Biocure®, una mezcla de *Candida saitoana* con enzimas líticas para el control de pudriciones causadas en manzanas, naranjas y limones por *P. expansum, B. cinerea* y *P. digitatum.* Estas formulaciones combinan las propiedades antifúngicas de las sales de quitosán y enzimas líticas con la actividad biocontroladora de la levadura (Elmer & Reglinski, 2006).

Shemer® es un producto registrado para su uso en Israel, cuyo principio activo es una levadura identificada como *Metschnikowia fructicola*, siendo efectivo contra un amplio rango de patógenos como *Aspergillus sp, Botrytis sp, Penicillium sp* y *Rhizopus sp,* en frutas como uvas, fresas y batatas (Elmer & Reglinski, 2006; Agro Green, 2008).

A pesar de los abundantes estudios en el tema, sólo cinco bioplaguicidas a base de levaduras, se encuentran actualmente con registro comercial a nivel mundial (Tabla 1) (Wisniewski *et al.,* 2007).

Tabla 1. Productos a base de levaduras registrados actualmente en el mundo

Producto	Principio activo	Presentación
Aspire®	*Candida oleophila I-182*	Granulado dispersable
Bio-Coat®	*Candida saitoana* con quitosán	Mezcla de polvos finos con pellets
Biocure®	*Candida saitoana* con enzimas líticas	Pellets
Shemer®	*Metschnikowia fructicola*	Granulado dispersable
Yield plus®	*Cryptococcus albidus*	Polvo

2.3. BIOPLAGUICIDAS

2.3.1. Formulación de bioplaguicidas

El desarrollo de un bioplaguicida implica el cumplimiento de diversas etapas que garanticen la obtención de un producto seguro, eficaz y confiable. Dichas etapas comprenden el aislamiento del microorganismo, la evaluación de su actividad biológica, su producción masiva, los estudios de preformulación y formulación, la estandarización de procesos, la elaboración de fórmulas maestras de producción, la determinación de dosis y formas de aplicación, loa estudios de toxicidad, los ensayos de campo, la determinación de los mecanismos de biocontrol, los estudios de impacto ambiental, la caracterización molecular, los estudios de mercado y el patentamiento o registro entre otros (Gómez & Villamizar, 2000).

Una etapa importante en el desarrollo de los bioplaguicidas es la preformulación, la cual se define como el conjunto de actividades organizadas conducentes a la determinación de las características del

principio activo y de los cambios químicos, físicos y microbiológicos que éste puede sufrir, sólo o al combinarlo con los auxiliares de formulación necesarios para la obtención del producto final (Gómez & Villamizar, 2000; Allen *et al*., 2005).

En la etapa de preformulación se diseña el preformulado, se caracteriza el principio activo y los excipientes, se realizan estudios de estabilidad del principio activo solo y combinado con los excipientes, se seleccionan los excipientes inocuos, se elaboraran los prototipos y se caracterizan; En esta caracterización de prototipos, se definen las características por evaluar y se establecen los límites de aceptación para éstas, finalmente se realizan estudios de estabilidad y se seleccionan los preformulados más adecuados (Allen *et al*., 2005).

A continuación de la etapa de preformulación, se desarrolla la etapa de formulación; la cual busca establecer la combinación correcta de excipientes, que junto con el principio activo formen un producto seguro, confiable y eficaz. En esta etapa se optimiza el prototipo, se determina su vida útil, se estandariza el proceso y se realizan las pruebas de control de calidad pertinentes (Allen *et al*., 2005).

En toda formulación se distinguen dos tipos de componentes: el principio activo responsable de la actividad biocontroladora (mohos, levaduras, bacterias, virus o nemátodos) y los excipientes. Estos últimos comprenden: el vehículo que puede ser sólido o líquido y los coadyuvantes que ayudan a mejorar o modificar la acción del ingrediente activo, todos los excipientes deben ser inertes frente al microorganismo y frente a las plagas (Galán & Támez, 1993).

Los coadyuvantes pueden cumplir tres funciones principales, primero podrían ser usados para optimizar la actividad del ingrediente activo; segundo, podrían mejorar las características del producto durante la aplicación y por último, podrían ser usados para mantener la integridad física y la estabilidad del microorganismo durante el tiempo de almacenamiento y después de la aplicación (Gómez & Villamizar, 2000).

Dentro de los coadyuvantes más utilizados están los tensioactivos, los cuales modifican la mojabilidad del producto permitiendo preparar suspensiones estables, mejoran las propiedades de extensibilidad de las formulaciones asegurando una aplicación más homogénea y son indispensables en la formulación de emulsiones. Dentro de los tensioactivos más utilizados encontramos el Tween y el Span, entre otros. En las formulaciones sólidas son utilizados los agentes de fluidez para mejorar el flujo de los polvos y evitar la soldadura de las partículas durante largos períodos de almacenamiento, generalmente los compuestos usados son los silicatos de aluminio y de sodio. Los adherentes son empleados para asegurar la permanencia del bioplaguicida ya aplicado, evitando su arrastre por la lluvia, rocío o viento; dentro de los más conocidos están las celulosas, la gelatina, las gomas, el carragenano, las dextrinas y los polímeros orgánicos (Galán & Támez, 1993).

2.3.2. Tipos de formulación

Hay una amplia variedad de formulaciones, las cuales pueden ser líquidas y sólidas. Dentro de los productos sólidos se encuentran los polvos para espolvoreo, polvos para reconstituir, gránulos para aplicación directa, gránulos dispersables en agua, cápsulas y comprimidos. Dentro de las formulaciones líquidas se encuentran suspensiones en agua o aceite y emulsiones (Burges, 1998).

2.3.2.1. Formulaciones líquidas

Suspensiones acuosas: son esencialmente suspensiones de organismos en líquidos (Burges, 1998).

Emulsiones: los líquidos emulsionables están constituidos por un principio activo suspendido en un vehículo oleoso acompañado de los coadyuvantes necesarios, de manera que al mezclar con agua, se forme una emulsión estable (Gómez & Villamizar, 2000). Toda emulsión forma un sistema de dos fases; el agua o fase dispersante y el líquido emulsionable o fase dispersa. Las emulsiones contienen del 1 al 3% de agentes de suspensión, del 3 al 8% de surfactante, del 1 al 5% de dispersante y del 35 al 85% de vehículo acuoso u oleoso (Galán & Támez, 1993). Las emulsiones reducen la sedimentación de partículas durante el almacenamiento y en el tanque de aspersión, porque la flotabilidad del aceite contrarresta la alta densidad relativa de las partículas (Burges, 1998).

2.3.2.2. Formulaciones sólidas

Polvos para espolvoreo: son aplicados directamente sobre las plantas o sobre el suelo, el principio activo se encuentra disperso en un vehículo inerte sólido. Los hongos son comúnmente formulados en esta forma (Gómez & Villamizar, 2000). Las concentraciones en materia activa son generalmente bajas del 1 al 20% (Galán & Támez, 1993). Los polvos están basados en diluyentes inertes o vehículos, normalmente de baja capacidad absorbente, las partículas de polvo están en un rango de tamaño de 5 a 20 mm, los polvos típicamente contiene menos del 10% de un organismo por unidad de peso (Burges, 1998).

Polvos para reconstituir o polvos mojables: son productos capaces de ser mojados y de mantenerse en suspensión en un vehículo líquido durante el período de tiempo requerido para su aplicación (Gómez & Villamizar, 2000). Cuando un polvo es puesto en un líquido, el líquido tiene que penetrar la superficie y sobrepasar la tensión superficial de la interfase líquida-sólida, los surfactantes ayudan a reducir esta tensión y permiten que el líquido desplace las partículas de aire alrededor (Galán & Támez, 1993).

Formulaciones encapsuladas: Las microcápsulas contienen los organismos y son comparadas con los gránulos**,** dentro de los materiales de encapsulación se encuentran la gelatina, al almidón, la celulosa y varios tipos de polímeros. Las cápsulas dan una buena protección frente a factores medioambientales, como la luz solar y químicos en la superficie de las hojas (Burges, 1998).

Gránulos, Comprimidos (Pellets) y Cápsulas: este grupo de formulaciones se aplican directamente a las plantas o al suelo, los gránulos presentan tamaños de partícula que oscila entre 0.2 y 1.5 mm, contienen de un 5 a un 20% de principio activo, de un 80 a un 95% de soporte y del 1 al 5% de adherente (Galán & Támez, 1993). Este tipo de formulación se emplea frecuentemente para el control de insectos cuyo ciclo de vida transcurre la mayor parte del tiempo en el suelo (Gómez & Villamizar, 2000). Hay tres tipos de gránulos: (1) los microorganismos son adheridos a la superficie externa de un transportador granular; (2) los microorganismos son asperjados en un transportador granular; (3) los microorganismos son incorporados dentro de una pasta o polvo transportador utilizado como matriz. El tipo tres es el más común con microorganismos nitrificantes. Estos productos no presentan riesgo de inhalación, no son de fácil flujo en el viento y pueden ser medidos fácilmente o pesados en una balanza, en contraste con los polvos (Burges, 1998).

Gránulos dispersables en agua: La presentación comercial del producto es igual a la de los productos granulados, pero a diferencia de estos, los gránulos dispersables deben reconstituirse en agua para su aplicación, con un equipo común de aspersión (Higuera, 2003).

2.3.3. Ingredientes comunmente utilizados en las formulaciones

Vehículos, diluyentes o aditivos de volumen: Los vehículos más comunes son frecuentemente líquidos inertes, geles o sólidos. Estos incluyen vehículos inorgánicos como agua, vermiculita, arcilla, sulfato de calcio, suelo o tierra mineral; o vehículos orgánicos como aceite vegetal, compost, aserrín, turba, salvado de trigo, maíz, suero y polímeros naturales purificados o sintéticos (Burges, 1998; Rawe *et al.,* 2006).

Estabilizadores de membrana: Muchos productos contienen organismos deshidratados o congelados, los cuales son reactivados después de la aplicación al suelo. Ambos métodos, deshidratación y congelación, pueden causar daños irreparables a la membrana del organismo o causar su muerte. Algunos de los compuestos utilizados como estabilizadores de membrana son la trehalosa, la sacarosa, la maltosa y el sorbitol (Burges, 1998).

Inhibidores de crecimiento y contaminación: Algunos compuestos son utilizados para detener el crecimiento de los organismos y mantenerlos en estado de latencia, de igual forma para inhibir el crecimiento de contaminantes, entre estos se encuentran antibióticos como Ciclohexamida, Cloranfenicol, Cristal violeta, Azida sódica y Rosa de bengala entre otros (Burges, 1998).

Sistemas tampón: Los sistemas tampón son de especial importancia en los productos, porque mantienen balanceado el pH de una formulación y de esta

manera evitan el crecimiento de contaminantes y permiten un almacenamiento prolongado. Los tampones usados frecuentemente son los fosfatos y carbonatos (Burges, 1998; Rawe *et al.,* 2006).

Dispersantes: Son sustancias que facilitan la desintegración de agregados o gránulos después de su aplicación. Materiales como almidones, celulosa microcristalina, amilasa, ácido algínico, silicato de aluminio, polisacáridos de soya, entre otros son frecuentemente utilizados (Darr, 1981).

Lubricantes: En algunos procesos el incremento del tamaño del agregado y la manipulación hacen necesaria la adición de lubricantes para disminuir el impacto de la fricción, la cual puede causar daño al organismo. Los lubricantes comunes son el talco, el aceite mineral, el aceite vegetal hidrogenado, el ácido bórico, el ácido esteárico, el estearato de calcio, el palmitato o estearato de glicerol, el monoestearato de polietileno, el polietilenglicol, el lauril sulfato de sodio, el benzoato de sodio, el ácido atípico y la DL-Leucina (Gennaro, 1995; Burges, 1998).

Componentes de Cubierta: Para mejorar las propiedades de la superficie y la flotabilidad o para retrasar la imbibición en el agua, muchos granulados y polvos son frecuentemente cubiertos con algunos compuestos como sacarosa, gelatina, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, polietilenglicol e hidroxipropilmetilcelulosa (Burges, 1998).

2.4. GRANULADOS

Las formulaciones granulares contiene el principio activo en un medio sólido adecuado para llevar a cabo la aplicación directa. Un producto granular debe ser seco, fluir libremente sin tendencia a aglomerarse, con índice de polvos

bajo, tamaño uniforme de las partículas y presentar estabilidad del principio activo (Ramírez, 1982).

La composición básica de un granulado comprende el ingrediente activo, los agentes estabilizantes que se añaden para evitar las pérdidas del ingrediente activo durante el almacenamiento, los agentes humectantes para mejorar la eficacia, la lixiviación y la percolación en el suelo, un agente antiaglomerante para conservar la fluidez del material, un agente aglutinante y un vehículo diluyente inerte, que puede ser mineral u orgánico (Ramírez, 1982).

2.4.1. Proceso de granulación

La granulación es un proceso donde las partículas de polvo son transformadas en gránulos (Voight & Bornschein, 1982). Los granulados pueden obtenerse tanto por vía húmeda como por vía seca (Darr, 1981). Los métodos por vía seca son aquellos que no utilizan líquidos para la agregación de las partículas de polvo y los métodos por vía húmeda son aquellos donde a la mezcla de polvo se le agrega un líquido, para obtener una masa húmeda que pueda deformarse con poca presión. Los métodos de granulación húmeda son los más utilizados industrialmente, pues los granulados obtenidos de este modo, muestran una gran solidez (Darr, 1981). Los pasos de granulación vía húmeda comprenden el pesaje, la mezcla, la granulación y el secado (Gennaro, 1995).

2.4.2. Características de los granulados

El proceso de granulación provee al granulado propiedades físicas importantes para predecir el comportamiento y eficiencia del mismo. Dentro de las propiedades de los granulados que hay que tener en cuenta para su evaluación se encuentran: el tamaño de partícula, fluidez, porosidad, voluminosidad, humedad, humectabilidad, pH, desintegración y estabilidad

(Helman, 1982). Estas características son definidas en la caracterización de prototipos en la etapa de preformulación (Allen *et al*., 2005).

2.4.2.1. Tamaño de partícula

El tamaño y distribución de las partículas de un granulado es una propiedad física que permite establecer la frecuencia de los diversos tamaños de partículas encontrados en una formulación (Voight & Bornschein, 1982). Del tamaño y distribución de las partículas dependen en mayor o menor grado, algunas características como la velocidad de disolución, la uniformidad del contenido, el color, la textura y la estabilidad (Cohen, 1998).

Además, la humectabilidad y el tiempo de desintegración del producto al reconstituirlo, también pueden ser afectados por el tamaño de los gránulos, dado que el tamaño de los mismos son importantes en la dispersión acuosa (Helman, 1982).

El flujo y las propiedades de empaque también son influidas por el tamaño de partícula, razón por la cual es necesario producir granulados con tamaños lo más uniformemente posible (Helman, 1982; Martín & Bustamante, 1993).

Esta característica de la formulación debe determinarse, optimizarse, monitorearse y controlarse, sobre todo en los primeros estudios de preformulación, en los que se toman decisiones con respecto a la forma apropiada del gránulo. Los métodos más comunes para determinar el tamaño de las partículas se clasifican en técnicas directas o indirectas (Gennaro, 1995).

Las técnicas directas miden el tamaño de las partículas por medio de una escala de calibración, como la microscopía y el tamizado. Las mediciones

indirectas se basan en alguna característica de la partícula que se pueda relacionar con su tamaño, por ejemplo, la velocidad de sedimentación, la permeabilidad y las propiedades ópticas (Gennaro, 1995).

El tamizado es el método más utilizado, sencillo y de bajo costo para determinar el tamaño de partícula. La técnica consiste en una clasificación por tamaños, seguida por la determinación del peso y el porcentaje de cada fracción. El granulado se coloca en un tamiz con aberturas uniformes y al aplicar algún tipo de movimiento o vibración al tamiz, las partículas más pequeñas que las aberturas pasan a través de éste, de modo que cada fracción se detiene en el tamiz que no puede atravesar (Gennaro, 1995).

El tamizado mecánico se realiza con máquinas que poseen un juego de tamices de diversa amplitud de malla, apilados uno sobre otro y ordenados según una escala sucesiva de amplitud de malla. El material por tamizar se mueve por el tamiz superior, atraviesa los restantes tamices y queda distribuido en diversas fracciones. Las partículas cuyo tamaño sea menor que la luz de las mallas del correspondiente tamiz, van cayendo al tamiz siguiente. Estas partículas constituyen el material fino y las que quedan en el tamiz constituyen el material grueso (Voight & Bornschein, 1982).

Dos de los inconvenientes encontrados frecuentemente en el tamizado, es la obtención de tamices con aberturas uniformes y el atascamiento de partículas en las aberturas del tamiz cuando la malla es muy fina (Gennaro, 1995).

Después del tamizado de las partículas, éstas se pueden clasificar en intervalos, puesto que en cada tamiz se encuentra una porción del material. La distribución de las partículas se puede mostrar en un gráfico de barras o histograma, en que el ancho de las barras representa el intervalo de tamaño

y la altura, la frecuencia de aparición de cada intervalo (Martín & Bustamante, 1993).

2.4.2.2. Fluidez

La fluidez de un producto es la capacidad del mismo de fluir verticalmente bajo condiciones establecidas. Esta característica es importante en los sistemas mecánicos de alimentación, puesto que si el material no presenta un flujo adecuado, pueden presentarse inconvenientes en la manipulación y en las etapas de llenado. El tamaño de partícula, la densidad, la forma, la textura y la porosidad, son propiedades que pueden afectar la fluidez (Gennaro, 1995).

2.4.2.3. Voluminosidad

La voluminosidad es el volumen que ocupa una masa sólida (Helman, 1982). Esta característica es primordial en el llenado de recipientes y en el volumen de los mismos. A medida que el tamaño de partícula disminuye, incrementa la voluminosidad (Voight & Bornschein, 1982).

La voluminosidad está influenciada directamente, por las propiedades físicas y químicas de los auxiliares de la formulación, de igual forma por la interacción de los mismos, siendo estos dependientes de condiciones ambientales (Gennaro, 1995).

2.4.2.4. Humedad

La humedad es una de las características más importantes de una formulación, puesto que una humedad mayor al 80% proporciona

condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos como bacterias, que pueden llegar a competir con el agente biológico y reducir su viabilidad (Cenicafé, 1997). Humedades alrededor del 5% disminuyen la tasa metabólica de los microorganismos, evitando la acumulación de metabolitos tóxicos y el agotamiento de nutrientes y aumentando la vida útil del producto por largos períodos de tiempo (Contreras, 2005).

2.4.2.5. Humectabilidad

Determina el tiempo que tarda un producto sólido en humedecerse completamente. Mide el tiempo transcurrido entre el momento de agregar la muestra al agua y el instante en que ésta desaparece de la misma (Cenicafé, 1997). Esta característica determina la facilidad con que el producto puede ser reconstituido y depende de las características hidrofílicas de los auxiliares de formulación y por lo tanto, de su capacidad de disolución en el agua (Contreras, 2005).

La presencia de sustancias hidrófobas en la formulación dificulta la humectación de un producto, contrario a las sustancias hidrófilas que se disuelven fácilmente en el agua (Helman, 1982).

2.4.2.6. pH

Mediante el pH se determina la acidez o la alcalinidad de una formulación (Cenicafé, 1997). El pH es un parámetro importante en una formulación, ya que éste puede interferir con la estabilidad del microorganismo que es utilizado como principio activo (Contreras, 2005). El pH es definido en términos de la actividad del ión hidronio en solución (Hanna instruments, 2004).

2.4.2.7. Porosidad

La porosidad de un producto está dada por los poros internos o espacios capilares. Para su determinación se mide el volumen ocupado por el material y se calcula restando al volumen real de las partículas sólidas, el volumen de los espacios entre las partículas (Martín & Bustamante, 1993).

La penetración del agua en un producto con propiedades superficiales iguales depende de la porosidad. Varía según las características físicas, los constituyentes y las fuerzas de aglomeración que se aplican en el momento de la fabricación del producto (Garzón, 2002).

La cantidad de agua empleada en la granulación y el tiempo de mezcla, son algunos factores que disminuyen la porosidad y el tamaño de partícula. Razón por la cual, las técnicas empleadas en el proceso de granulación, los cambios en los componentes de la formulación y los equipos empleados, pueden ser evaluados con esta característica de los productos (Helman, 1982).

La porosidad de un granulado depende de la distribución de tamaño, de la forma de las unidades que lo componen y de la rugosidad de sus superficies. La presencia de partículas gruesas y finas, producen granulados de menor porosidad que los que se obtienen con gránulos totalmente uniformes, ya que las partículas finas tienden a llenar los intersticios que hay entre las grandes (Helman, 1982).

Esta característica determina la humectabilidad y la fragilidad del granulado (Martín & Bustamante, 1993).

2.4.2.8. Desintegración

La desintegración es la medida de la capacidad de disgregación de un granulado en un medio líquido en un tiempo determinado (Cohen, 1998), poniendo en libertad las partículas de polvo que lo constituyen (Helman, 1982).

El tiempo o velocidad de desintegración depende mucho de su composición química, pero también influyen otros factores como la humectación, la solubilidad de los componentes de la formulación, el tamaño y forma de los gránulos, la porosidad, (Helman, 1982) además, de los agentes desintegrantes, aglutinantes y lubricantes (Gennaro, 1995).

Los desintegrantes pueden clasificarse en tres grupos: los que aumentan la capilaridad, absorben humedad y esponjan; combinaciones con desprendimiento de gas y sustancias que aumentan la humectabilidad (Voight & Bornschein, 1982).

2.4.2.9. Estabilidad

La estabilidad de un producto puede definirse como la capacidad de una formulación particular en un sistema de envase específico, de mantenerse dentro de sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas y toxicológicas. Es el tiempo desde la fecha de fabricación y envasado, hasta que su actividad química o biológica no sea menor que un nivel predeterminado de potencia y sus características no cambien en forma apreciable (Gennaro, 1995).

Muchos factores afectan la estabilidad de un producto: la estabilidad de los principios activos, la interacción de los principios activos y excipientes, el

proceso de fabricación, el sistema de envase y las condiciones ambientales halladas durante transporte, almacenamiento, manipulación y el tiempo transcurrido entre la fabricación y el uso (Gennaro, 1995).

Un hecho nocivo relacionado con el tiempo es una disminución en la actividad de la formulación por debajo de algún límite especificado arbitrariamente, otro evento nocivo es la aparición de una sustancia tóxica, formada como producto de degradación durante el almacenamiento de la formulación (Gennaro, 1995).

2.5. ESTABILIDAD DE BIOPLAGUICIDAS EN ALMACENAMIENTO

La estabilidad físicoquímica, microbiológica y de la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas durante el almacenamiento, son factores indispensables para que dichos productos puedan ser comercializados. Durante el almacenamiento, los microorganismos presentes en un bioplaguicida pueden sufrir alteraciones debido a factores del proceso de manufactura del producto, como el medio de cultivo utilizado para la producción masiva del microorganismo, los procesos de congelamiento, de secado y la utilización de agentes protectores de secado. Además, el microorganismo también puede ser afectado por la interacción de éste con los auxiliares de formulación y por las condiciones de almacenamiento que incluyen la temperatura, la exposición a la luz, la atmósfera, la humedad relativa e incluso el material y el tipo de envase que sea utilizado (Abadías *et al.*, 2001).

La posibilidad de llevar a cabo la utilización de agentes biocontroladores a nivel comercial está determinada en gran medida por la estabilidad de las formulaciones, debido a que la utilización y aplicación de los

microorganismos se hace más segura y fácil si se encuentran formulados, también las formulaciones optimizan la vida útil de un producto, así como la eficacia del mismo (Abadías *et al.*, 2003).

El mayor obstáculo para lograr la comercialización de microorganismos biocontroladores, es el desarrollo de formulaciones estables durante el almacenamiento, las cuales mantengan la viabilidad de la célula y la actividad biocontroladora similar a las de las células frescas (Abadías *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2002).

El almacenamiento a bajas temperaturas y en un ambiente libre de humedad, son condiciones que disminuyen la actividad metabólica de los microorganismos, de esta forma previene la acumulación de metabolitos tóxicos y la utilización de nutrientes, manteniendo la estabilidad de las características microbiológicas durante el almacenamiento (Costa *et al.*, 2002).

La viabilidad del bioplaguicida es probablemente la característica más afectada durante el almacenamiento, este hecho es corroborado por varios estudios en los cuales se ha demostrado que el tiempo y la temperatura de almacenamiento afectan la viabilidad de los microorganismos y también la actividad biocontroladora, que es la propiedad más importante del microorganismo que constituye el principio activo en un producto (Melin *et al.*, 2006).

2.6. PATÓGENOS DE LA SUPERFICIE FOLIAR

Se conocen más de 100.000 especies de hongos que son estrictamente saprófitos, los cuales se desarrollan en la materia orgánica muerta. Más de

10.000 especies de hongos causan enfermedad en plantas. Todas las plantas son atacadas por algunas clases de hongos y cada hongo parásito puede atacar una o varias clases de plantas (Agrios, 2005).

Existe una gran cantidad de hongos que afectan a las partes aéreas de los vegetales. Patógenos biotróficos o parásitos obligados como los mildeos polvosos y patógenos necrótrofos como *Botrytis cinerea, Sclerotinia sclerotiorum* de Bary y *Cladosporium fulvum,* son causantes de enfermedad en numerosos cultivos de hortalizas y frutales (Elad *et al.,* 2000).

2.6.1. Generalidades de *Botrytis cinerea*

Las enfermedades producidas por el género *Botrytis* son probablemente las más comunes y ampliamente distribuidas en hortalizas, plantas ornamentales y frutales cultivados en campo o en invernadero alrededor del mundo. Estas enfermedades aparecen en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones del fruto, pero también como pudriciones del tallo, ahogamiento de las plántulas, manchas foliares, pudriciones de tubérculos, bulbos y raíces (Agrios, 2005).

Botrytis cinerea (Forma teleomórfica: *Botryotinia fuckeliana*), agente causal del moho gris, infecta más de 200 especies vegetales distintas, generando importantes pérdidas económicas antes y después de la recolección, puesto que el patógeno puede atacar el cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo (Benito *et al*., 2000; Elmer & Reglinski, 2006).

B. cinerea es un hongo cosmopolita que se desarrolla como saprófito sobre materia orgánica muerta o material herbáceo en proceso de descomposición, o como patógeno sobre plantas vivas (Agrios, 2005). Las bajas temperaturas y altas humedades relativas, son factores que favorecen la germinación de los conidios y el crecimiento del micelio, conllevando a la infección de *B.*

cinerea en las partes susceptibles de las plantas. Las temperaturas óptimas para la infección de este hongo se encuentran entre 10ºC y 25ºC (Elad *et al*., 2004).

Por otro lado, los esclerocios de *B. cinerea* pueden ser considerados estructuras importantes, ya que son los responsables de la supervivencia del patógeno cuando las condiciones del medio ambiente son adversas. La formación de los esclerocios está influenciada por la temperatura, la luz, el pH y la nutrición. Hay tres pasos fundamentales para su formación: iniciación, desarrollo y maduración, siendo prerrequisito que haya una gran cantidad de hifas aglomeradas (Elad *et al.,* 2004).

2.6.1.1. Taxonomía y características de *Botrytis cinerea*

REINO	*Fungi*
DIVISIÓN	*Ascomycota*
CLASE	*Leotiomycete*
ORDEN	*Heliotiales*
FAMILIA	*Sclerotiniaceae*
GENERO	*Botrytis*
ESPECIE	*Botrytis cinerea*

(NCBI, 2008)

Los conidióforos de *B. cinerea* se pueden encontrar solos o agrupados. Los conidios se encuentran en forma de racimo, más o menos rectos en la zona apical, son de color café claro en la zona del ápice. La última agrupación de conidióforos está integrada a las células terminales conidiogénicas, encontrándose hinchada en forma cilíndrica, esférica o subesférica, holoblástica o poliblástica e hialina. Los conidios son lisos y pegados por un fino dientecillo, se encuentran solos o aglomerados, son casi hialinos, no se

encuentran septados u ocasionalmente se encuentran de 1-2 septados en un cultivo siendo de forma ovalada, elíptica o aglobada. En masas, los conidios se pueden observar de color café (Elad *et al.,* 2004).

En medios de cultivo, *B. cinerea* presenta colonias esparcidas inicialmente blancas, que con el tiempo se tornan grises y polvosas. El micelio está inmerso o superficial, las hifas son ramificadas, septadas e hialinas. Forma esclerocios tanto en sustratos naturales como artificiales, necesita de la exposición a la luz del día o radiación UV para esporular (Zapata, 2003).

2.6.1.2. Ciclo de la enfermedad

B. cinerea es un parásito facultativo en numerosas especies de plantas comerciales y malezas, sobreviviendo como saprófito en residuos de éstas. Este hongo inverna en forma de esclerocios o micelio sobre los restos de tejido vegetal en descomposición o en estructuras senescentes (Agrios, 2005).

La mayoría de infecciones se inician a partir del micelio que crece saprofíticamente contiguo al material vegetal o de conidios entre el material vegetal y la superficie del fruto. Los conidios se desarrollan a partir de los esclerocios en los tallos y micelio presentes en las hojas muertas y frutos momificados, siendo éstas las fuentes más importantes de inóculo (Elad *et al.,* 2004).

Los conidios tienen la capacidad de permanecer sobre la superficie de la planta sin penetrar efectivamente el tejido del hospedero, lo que se denomina residencia en el filoplano. En esta fase pueden permanecer hasta que se presenten las condiciones ambientales propicias o hasta que el tejido entre en una etapa susceptible (envejeciendo o muerte). Los conidios expuestos a

las superficies secas no germinan rápidamente o simplemente no lo hacen; por el contrario, aquellos que se encuentran en una superficie saturada de agua germinan fácilmente (Elad *et al.,* 2004).

Los conidios de *B. cinerea* pueden ser producidos sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire. Una vez que el conidio ha alcanzado la superficie del hospedero inicia el ciclo de infección que puede considerarse dividido en varias fases (Benito *et al*, 2000):

1. Adherencia y germinación de los conidios sobre la superficie del hospedero.

2. Penetración en el tejido vegetal, a través de heridas o aberturas naturales, directamente por la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas).

   La infección de los tejidos de la planta por el patógeno requiere la expresión coordinada de una serie de enzimas que degradan la capa protectora de las células vegetales de las superficies. Estas incluyen cutinasas, exo y endo poligalacturonasas, pectin-metilestereasas, celulasas, β-glucosidasas, xilanasas, arabinasas, β-galactosidasas, β-manosidasas, α-galactosidasas. La acción de estas enzimas permite degradar la cutina y las paredes celulares del hospedero.

3. Establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como

consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta.

4. En muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar el patógeno que permanece localizado en áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias.

5. Transcurrido un tiempo, el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta en algunas lesiones primarias e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante, determinando la colonización y maceración del tejido infectado en un breve período de tiempo. El patógeno produce una nueva generación de conidios sobre el tejido infectado, los cuales pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

El hongo se establece en los pétalos de la flor, los cuales son particularmente susceptibles cuando comienzan a envejecer y ahí produce abundante micelio. Cuando el clima es húmedo y fresco, el micelio del hongo produce numerosos conidios que ocasionan más infecciones, pero el micelio también se desarrolla, penetra e invade el resto de la inflorescencia, la cual se llena y cubre con un intrincado moho de color gris blanquecino o café claro (Agrios, 2005).

Posteriormente el hongo avanza hacía el pedicelo, el cual se pudre y permite que las yemas y las flores cuelguen. En caso de que algún fruto llegue a desarrollarse, el hongo se propaga entre los pétalos hacia los frutos verdes o maduros y ocasiona la pudrición basal de los frutos que entran en contacto con los que no han sido infectados. Los frutos infectados y los tallos se ablandan y se vuelven húmedos y más tarde los tejidos que han sido

invadidos adquieren un color café claro. Conforme se pudren los tejidos, la epidermis del fruto se rompe y el hongo produce numerosos cuerpos fructíferos. Entonces, los tejidos se arrugan y deshidratan y el hongo produce esclerocios de color negro sobre la superficie o hundidos en el tejido (Agrios, 2005).

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1. Justificación de la investigación

Los riesgos toxicológicos y medioambientales ocasionados por el uso masivo de plaguicidas sintéticos han conducido al desarrollo de herramientas y estrategias como el control biológico, las cuales pueden considerarse toxicológicamente seguras y compatibles con el ambiente (Chan & Tian, 2005).

Las levaduras pueden considerarse microorganismos de biocontrol promisorios, ya que poseen varias propiedades importantes que permiten su uso para tal fin: son organismos cosmopolitas, pueden ser recuperados de ambientes como la superficie de plantas o rizoplano del suelo (Kurtzman & Fell, 1998). En su mayoría no son patógenas y no producen micotoxinas o esporas alergénicas, son capaces de utilizar un amplio rango de nutrientes, crecer a una baja actividad de agua y a bajos niveles de oxígeno; además, ejercen diferentes modos de acción como antagonistas (Fredlund *et al*., 2002).

El control biológico de plagas y agentes patógenos mediante el uso de bioplaguicidas, es actualmente una alternativa promisoria de control, dada sus ventajas de sostenibilidad ambiental. El mercado mundial de bioplaguicidas representa alrededor del 1% del total del mercado de plaguicidas. El bajo nivel de su utilización puede atribuirse a factores tales como el rechazo por parte de la agricultura convencional, las inadecuadas formulaciones comúnmente desarrolladas, la inconsistencia de algunos resultados producidos en campo, su corta vida útil, su falta de competitividad económica en relación con los fungicidas químicos, su alta especificidad y su

escaso mercadeo. Sin embargo, presentan ventajas tales como su baja toxicidad hacia organismos no blanco (Cotes, 2002).

Para la obtención de un producto estable, existen dos etapas fundamentales en el desarrollo del mismo, como lo son la preformulación y la formulación. Durante la preformulación se evalúa la compatibilidad del principio activo con los excipientes, se desarrollan prototipos, se determinan las características físicoquímicas, biológicas y microbiológicas y se selecciona él o los prototipos adecuados. Posteriormente en la etapa de formulación se optimiza él o los prototipos seleccionados en la preformulación (Allen *et al.*, 2005).

Uno de los principales problemas de los bioplaguicidas es su estabilidad, la cual se define como la capacidad de una formulación particular en un específico contenedor o sistema de empaque de mantener sus especificaciones físicas, químicas, microbiológicas, terapéuticas y toxicológicas dentro de los límites permisibles (Gennaro, 1995).

La estabilidad de un formulado también puede ser definida como el tiempo entre su manufactura y empaque y el momento en que su actividad química o biológica, es menor que el nivel predeterminado en la etiqueta, el momento en que sus características físicas cambian considerablemente (Gennaro, 1995).

Muchos factores afectan la estabilidad de un producto, incluyendo la estabilidad del ingrediente activo, el potencial de interacción entre los ingredientes activos e inactivos, el proceso de manufactura, la forma de dosificación, el contenedor y las condiciones ambientales encontradas durante el transporte, almacenamiento, manipulación y largo tiempo entre la manufactura y el uso (Gennaro, 1995).

Un bioplaguicida para ser competitivo con otros productos para el control de plagas, debe tener como mínimo una vida de almacenamiento de 1.5 años. Esta vida de almacenamiento depende principalmente de factores como la temperatura y el sistema de empaque, entre otros (Burges, 1998).

Un aislamiento de la levadura *Pichia onychis* codificada como Lv027, fue seleccionado por el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica, teniendo en cuenta su alta actividad biocontroladora contra *Botrytis alli* en cebolla de bulbo (Jiménez & Neisa, 1999). En posteriores estudios la levadura Lv027 presentó porcentajes de protección del 93.3% a temperatura ambiente y del 92.40% a temperatura de refrigeración, contra *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate (García, 2001).

Fuentes (2001) evaluó la actividad biocontroladora de la levadura Lv027 contra *Altermaria alternata* en postcosecha de tomate encontrando un 90% de reducción en la severidad a temperatura ambiente y del 76% a temperatura de refrigeración.

Durante los años 2001 al 2005, se desarrollaron con este aislamiento dos prototipos de formulación. Inicialmente se diseñó un bioplaguicida líquido formulado como una suspensión de la levadura en una base oleosa autoemulsificable, la cual presentó estabilidad de la viabilidad durante el almacenamiento, con pérdidas del 7,8% después de cinco meses a 8ºC y del 15,4% a 18º y 28ºC. Sin embargo, este formulado mostró una pérdida significativa de la actividad biocontroladora con una disminución en el porcentaje de protección del 90,8% frente a *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate (Gutiérrez, 2001). Posteriormente se desarrolló un producto sólido granulado, que mostró estabilidad de su actividad biocontroladora durante seis meses de almacenamiento, con un porcentaje de protección del 77% cuando fue almacenado a 8ºC, pero presentó una pérdida de la viabilidad del

21%, 37,2% y 62,42% después de seis meses de almacenamiento a 8º, 18º y 28ºC respectivamente. Dicha pérdida de viabilidad fue atribuida a un efecto nocivo del proceso de secado y de la temperatura de almacenamiento (Higuera, 2003). Estos prototipos, granulado y concentrado emulsionable, fueron modificados en su composición con miras a mejorar su estabilidad. Sin embargo, después de los ajustes mostraron una actividad biocontroladora estable durante seis meses de almacenamiento, pero una pérdida significativa de la viabilidad. El granulado modificado presentó pérdidas en la viabilidad del 20,29%, 35,37% y 46,3% cuando fue almacenado a 8º, 18º y 28ºC respectivamente durante seis meses y el concentrado emulsionable presentó una pérdida de viabilidad del 18,04%, 18,71% y del 37,13% cuando se almacenó seis meses a dichas temperaturas respectivamente. La reducción de la viabilidad de las células bajo condiciones de almacenamiento, sugiere un efecto negativo de alguno de los auxiliares de formulación sobre la levadura (Contreras, 2005).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los dos prototipos (granulado y concentrado emulsionable), el laboratorio de Control Biológico de Corpoica seleccionó el prototipo granulado para continuar con los estudios del bioplaguicida a base de la levadura Lv027. Esta selección fue básicamente debido a que el concentrado emulsionable le concedía un aspecto grasoso al fruto de tomate después de su aplicación, alterando las características organolépticas del mismo (Contreras, 2005).

El prototipo granulado fue evaluado en campo contra *Alternaria dauci* en cultivos de cilantro y se observó una eficacia del 83 % (Villamizar *et al.,* 2004).

Teniendo en cuenta el alto potencial del prototipo granulado a base de la levadura *Pichia onychis* para controlar diferentes patógenos en diferentes

condiciones de precosecha y postcosecha y la necesidad de contar con un bioplaguicida eficiente, que mantenga estables sus características durante el almacenamiento, se decidió continuar con el desarrollo y optimización de la formulación, con miras a aumentar su estabilidad física, química, microbiológica y su actividad biocontroladora.

3.2. Formulación del problema

En el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA se desarrolló una formulación granulada a base de la levadura *Pichia onychis* (Lv027), la cual presentó pérdidas significativas de viabilidad, tras seis meses de almacenamiento. Dicha pérdida fue atribuida a un efecto negativo de los auxiliares de formulación sobre las células de la levadura. De acuerdo a lo anterior y teniendo en cuenta los promisorios resultados de control de varios patógenos obtenidos con esta formulación, surgió la necesidad de evaluar de manera individual, el efecto de los auxiliares de formulación en la viabilidad del agente biocontrolador, con miras a determinar si alguno de ellos afecta la estabilidad de las células durante el almacenamiento. Posteriormente, estos resultados fueron utilizados para modificar la composición de la formulación, generando un nuevo bioplaguicida, que debió ser caracterizado y estudiada nuevamente su estabilidad bajo condiciones de almacenamiento.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la compatibilidad de la levadura *Pichia onychis* Lv027 con excipientes y caracterizar la formulación modificada

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la compatibilidad de la levadura *Pichia onychis* con los excipientes utilizados en la formulación original del prototipo granulado

- Caracterizar fisicoquímica y microbiológicamente la formulación modificada

- Determinar la estabilidad de la formulación modificada bajo condiciones de almacenamiento

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria), ubicado en el Centro de Investigación Tibaitatá, Cundinamarca.

5.1. MICROORGANISMO BIOCONTROLADOR

La cepa de la levadura Lv027 identificada como *Pichia onychis*, fue proporcionada por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico (Laboratorio de Control Biológico, CORPOICA). Esta levadura fue previamente seleccionada por su alta actividad biocontroladora contra *Botrytis alli* en cebolla de bulbo y posteriormente por su alta actividad biocontroladora contra *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate (García, 2001).

5.1.1. Colección de trabajo de Lv027

La cepa Lv027 se inoculó en cajas de Petri con medio Agar Extracto de malta - extracto de levadura (YM) y se incubó durante 48 horas a 25ºC. Posteriormente, ésta fue crioconservada siguiendo el procedimiento operativo estándar (POE) desarrollado en el laboratorio de Control Biológico de CORPOICA. Para tal fin se preparó una solución crioconservante con glicerol al 10% y peptona al 0,1%, la cual fue autoclavada a 15 libras de presión, 120º C por 15 minutos. En dicha solución se preparó una suspensión de la levadura de 48 horas de edad, en condiciones de esterilidad, la suspensión fue dividida en alicuotas de 1 mL en tubos Eppendorf previamente rotulados. Los tubos fueron almacenados en ultracongelador a -70ºC.

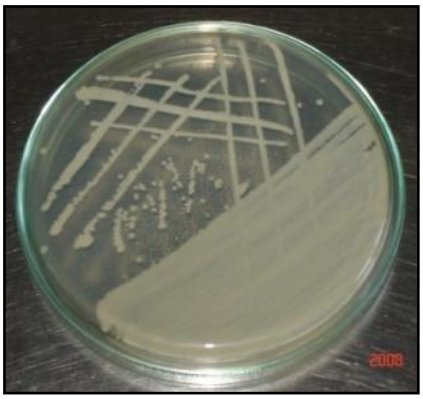

Figura 1. Aislamiento de la levadura Lv027 en Agar YM**.**

5.2. RECUPERACIÓN DEL MICROORGANISMO PATÓGENO

La cepa del hongo fitopatógeno Bo007 identificada como *Botrytis cinerea*, fue proporcionada por el Banco de Germoplasma de Microorganismos con Interés en Control Biológico (Laboratorio de Control Biológico, CORPOICA).

La cepa Bo007 se recuperó en medio de cultivo PDA y se dejó en incubación por 15 días a 22ºC. Esta cepa fue empleada en el montaje de los bioensayos para evaluar la actividad biocontroladora.

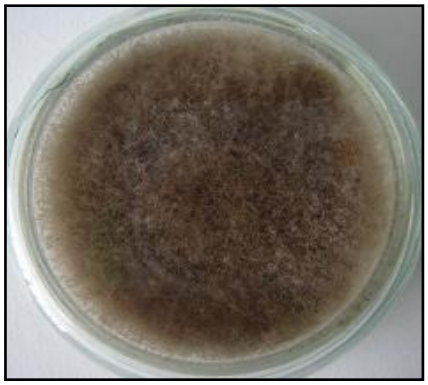

Figura 2. Crecimiento de *B. cinerea* Bo007 en Agar PDA**.**

5.3. PRODUCCION DE LA LEVADURA Lv027

Se preparó el medio de cultivo MLXOM previamente estandarizado en el Laboratorio de Control biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica con pH ajustado a 4,5, para lo que se empleó una solución de hidróxido de sodio (0,1 M). Posteriormente, el medio fue alicuotado en volúmenes de 200 mL en 8 erlenmeyers de 1 L para la producción y un erlenmeyer de 500 mL con 320 mL de medio para preparar el inóculo de la fermentación. Se taparon los erlenmeyers con tapón de algodón para luego ser autoclavados a 15 libras de presión, 120º C por 15 minutos. El siguiente paso de la producción fue la preparación del inóculo haciendo raspado de una caja con el aislamiento Lv027 y ajustando a una concentración de $1x10^7$células/mL, estos 320 mL de inóculo fueron alicuotado en los 8 erlenmeyers cada uno con 40 mL de inóculo. Dichos erlenmeyers fueron dejados en agitación en un shaker a 150 rpm durante 96 horas. Transcurrido este tiempo se realizó recuento en cámara para la determinación de la concentración final (Díaz *et al.*, 2005).

5.3.1. Separación de la biomasa de la levadura Lv027

Se distribuyó uniformemente el contenido de los 8 erlenmeyers en 4 frascos de 200 mL y se centrifugaron a 5000 rpm durante 30 minutos en una centrífuga refrigerada marca Sorvall. Terminada la centrifugación se procedió a eliminar el sobrenadante y recuperar la biomasa húmeda.

5.4 ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 CON LOS AUXILIARES DE FORMULACIÓN

Una vez obtenida la biomasa húmeda, ésta se mezcló de manera independiente con cada uno de los auxiliares de formulación previamente

autoclavados (Tabla 2), en relación 1:1 (P/P). Cada tratamiento se depositó en bandejas de aluminio y se liofilizó durante 48 horas a -50°C.

Tabla 2. Tratamientos del estudio de compatibilidad de la levadura Lv027 con auxiliares de formulación

Código	Tratamiento
T 1	Biomasa + Di-01
T 2	Biomasa + Di-03
T 3	Biomasa + De-01
T 4	Biomasa + De-05
T 5	Biomasa + Ps-01
T 6	Biomasa + De-03
T 7	Biomasa + Lb-01
Control	Biomasa

Las mezclas liofilizadas con una humedad inferior al 5%, fueron tamizadas por extrusión manual a través de una malla con un tamaño de poro de 100 µm debidamente flameada y el polvo obtenido fue colectado en cajas de Petri previamente esterilizadas y rotuladas.

Se pesaron 0,1 g de cada tratamiento y se colocaron en viales de vidrio estériles y secos, los cuales se taparon con un tapón de caucho y un agrafe. Posteriormente se almacenaron a tres temperaturas distintas (8°, 18° y 28°C). Se contó con 9 muestras por tratamiento, por temperatura.

Antes de iniciar el almacenamiento y cada mes durante tres meses, se tomaron 3 muestras por tratamiento, por temperatura de almacenamiento y se hicieron diluciones seriadas hasta 10^{-8}. Se sembraron 0,1 mL de las diluciones $10^{-6,}$ 10^{-7} y 10^{-8} en medio Agar Extracto de levadura – Extracto de malta (YM) y posteriormente las cajas inoculadas se incubaron por 48

horas a 25ºC. Transcurrido este tiempo, se realizó la lectura de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) y el resultado se expresó como UFC /g de muestra.

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANAVA y una prueba de comparación múltiple de medidas de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

5.5. AJUSTE DE LA FORMULACIÓN DEL PROTOTIPO GRANULADO

Con los resultados obtenidos en la prueba de compatibilidad, el grupo de tecnología del Laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria de CORPOICA, modificó la formulación del granulado a base de la levadura *P. onychis.*

Posteriormente se elaboraron dos lotes de granulado utilizando la fórmula modificada. Para la elaboración de los mismos, se realizó la producción de dos lotes de la levadura Lv027 con la metodología descrita en el numeral 5.3. La mitad de la biomasa húmeda obtenida se mezcló con los auxiliares de formulación previamente autoclavados en las cantidades establecidas para el prototipo modificado. La masa húmeda se granuló por extrusión manual a través de una placa perforada de 1 mm de diámetro. El granulado fue colectado en bandejas de aluminio para su posterior secado por liofilización a -50ºC durante 48 horas. La biomasa húmeda restante de la producción se liofilizó sin formular y se utilizó como tratamiento control.

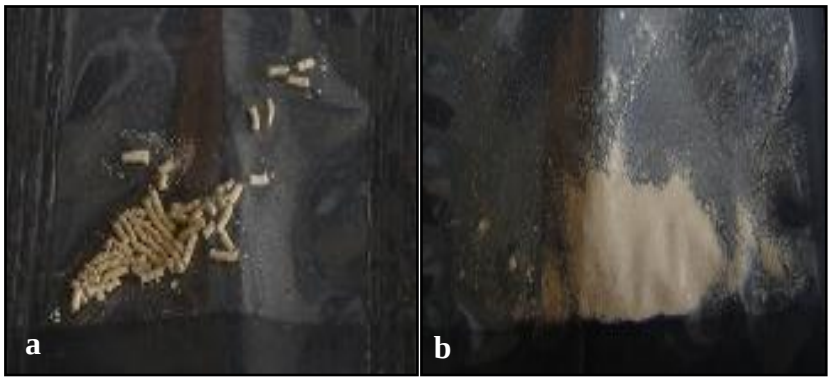

Figura 3. Levadura Lv027 liofilizada. a) Levadura formulada y b) Levadura sin formular.

5.6. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO OPTIMIZADO

5.6.1. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

5.6.1.1. Determinación del pH

Se preparó la muestra de análisis que consistió en 10 g de granulado reconstituido en 100ml de agua destilada. El pH se determinó mediante lectura en un potenciómetro marca Hanna Instruments (Hi-8314) previamente calibrado con soluciones tampón, la determinación se realizó por triplicado utilizando tres muestras diferentes de cada lote de granulado (Biotécnica, 2008).

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, donde se establece que el valor de pH debe estar entre 5 y 7 (Biotécnica, 2008).

5.6.1.2. Humedad

El porcentaje de humedad se determinó colocando 0,5 g del granulado en el plato de una balanza halógena determinadora de humedad marca Ohaus modelo alfa 1-4. El resultado se observó en la pantalla del equipo una vez terminó de secar la muestra. La humedad se determinó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado (Biotécnica, 2008).

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, donde se establece que la humedad debe ser inferior al 6% (Biotécnica, 2008).

5.6.1.3. Humectabilidad

Esta característica es la medida del tiempo que tarda el gránulo en humedecerse completamente. Para esto se agregaron 5 g de producto en un vaso de precipitado de 250 mL con 200 mL de agua. El producto se dejó caer suavemente sobre el líquido y con un cronómetro se midió el tiempo transcurrido desde que se agregó la muestra, hasta que ésta desapareció totalmente de la superficie. La humectabilidad se determinó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado (Biotécnica, 2008).

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que establece que la humectabilidad debe ser inferior a 30 segundos (Biotécnica, 2008).

5.6.1.4. Desintegración

Para determinar el tiempo que tarda el producto en desintegrarse, se pesaron 5 g del producto y se adicionaron en un vaso de precipitado de 250 mL con 200 mL de agua. Con ayuda de una plancha termo magnética marca Arec heating magnetic stirrer y una barra magnética de 4 cm de largo, se mantuvo una agitación constante en la velocidad de 500 rpm. Se determinó con un cronómetro el tiempo que el producto tardó en desintegrarse totalmente. La determinación se realizó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado (Biotécnica, 2008).

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que establece que la desintegración debe ser inferior a 5 minutos (Biotécnica, 2008).

5.6.1.5. Voluminosidad

La voluminosidad se determinó pesando 100 g del granulado (W) y dejándolos caer libremente en una probeta de 250 mL. Se registró el volumen ocupado por el material (V) y la voluminosidad se calculó mediante la fórmula: (Biotecnica, 2008).

$$\text{Voluminosidad} = V / W$$

La voluminosidad se determinó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado.

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de

Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que sugiere que la voluminosidad debe ser menor de 3 mL/g (Biotécnica, 2008).

5.6.1.6. Porosidad

Para determinar la porosidad se agregaron 100 g del granulado en una probeta de 250 mL ajustada a una base plana con bandas elásticas y se registró el volumen inicial (Vi) ocupado por el material. Posteriormente, el material se apisonó elevando la probeta hasta la altura máxima permitida por las bandas elásticas y se dejó caer libremente sobre la base. La operación se repitió hasta que el volumen del material no presentó cambios, en ese momento se midió el volumen final (Vf) ocupado por el producto. La porosidad se determinó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado.

El porcentaje de porosidad se calculó mediante la fórmula: (Biotécnica, 2008).

$$\% \text{ Porosidad} = [1 - ((Vf / W) / (Vi / W))] * 100$$

Para la evaluación de ésta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que establece que la porosidad debe ser inferior al 30% (Biotécnica, 2008).

5.6.1.7. Fluidez estática

Para determinar la fluidez se pesaron 100 g del producto y se dejaron fluir libremente por un embudo con un orificio de salida de 1,5 cm de diámetro, ubicado a 10 cm de una superficie horizontal, se destapó el orificio de salida

del embudo dejando caer libremente el producto y luego se determinó el radio y la altura del cono formado por el material. Con estos resultados se calculó el ángulo de reposo mediante la fórmula: (Biotécnica, 2008).

$$\text{Tan } \alpha = a / r$$

Donde: a = altura del cono, r = radio del cono
La fluidez se determinó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado.

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación establecido por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, del laboratorio de Control Biológico de CORPOICA, donde la fluidez estática debe ser inferior a 45° (Biotécnica, 2008).

5.6.1.8. Suspendibilidad

La suspendibilidad se evaluó reconstituyendo 1 g de producto en 1000 mL de agua, suspensión que se dividió en 3 probetas de 250 mL. Las probetas se dejaron en reposo y cada media hora durante tres horas se introdujo una pipeta sin crear turbulencia, para retirar 1 mL del tercio inferior, medio y superior de cada probeta. Se determinó la concentración de células en cada una de las muestras mediante recuento en cámara de Neubauer. El recuento en cámara se realizó por triplicado para cada muestra. Los resultados de concentración de la suspensión de cada tercio de la probeta, fueron comparados y de esta forma se determinó si el granulado reconstituido en agua, mantuvo una concentración homogénea en todo el recipiente (Biotécnica, 2008).

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que indica que la concentración en las tres alturas no debe variar en más de una unidad logarítmica (Biotécnica, 2008).

5.6.1.9. Tamaño de partícula

La determinación del tamaño de partícula se llevó a cabo mediante el método de gravimetría (Biotécnica, 2008), el cual consiste en pesar una muestra y hacerla pasar a través de una serie de tamices de un tamaño de poro conocido. Posteriormente se pesó el material retenido en cada tamiz.

Se pesaron 100 g de muestra y se colocaron en el último tamiz de una columna de éstos, ordenados según el tamaño de poro de forma ascendente de abajo hacia arriba, con el colector en la base. La columna de tamices se ubicó en un Shaker vibratorio marca Kern modelo Rx-86, el equipo se dejó operar durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los tamices se retiraron del equipo y el material retenido en cada tamiz se pesó. Se elaboró una distribución de frecuencias para determinar el rango de tamaño de partícula en el cual se encontró la mayor parte del material. La determinación se realizó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado (Biotécnica, 2008).

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que sugiere que el 60% o más de la muestra debe estar en un tamaño comprendido entre 0,8 y 3 mm (Biotécnica, 2008).

5.6.1.10. Determinación de partículas finas

Se pesaron 120 g de muestra y se colocaron en el último tamiz de una columna de éstos, ordenados según el tamaño de poro de forma descendente de arriba hacia abajo, con el colector en la base (850µm-500µm -250µm -150µm -100µm-colector). La columna de tamices se ubicó en un Shaker vibratorio, el equipo operó durante 45 minutos. Transcurrido este tiempo, los tamices se retiraron del equipo y el material retenido en cada tamiz se pesó. La determinación se realizó por triplicado a tres muestras diferentes de cada lote de granulado.

Para la evaluación de esta característica se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, donde describe que no mas del 4% de la muestra debe tener tamaño inferior a 250 µm (Biotécnica, 2008).

5.6.2. Caracterización microbiológica

5.6.2.1. Contenido de contaminantes

Para la determinación de los contaminantes se tomó 1 muestra de 0,1 g de cada lote de producción, cada muestra se reconstituyó en 9 mL de Tween 80 al 0,1%, se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-8} y se sembró por triplicado en superficie 0,1 mL de las diluciones 10^{-6}, 10^{-7} y 10^{-8} en los medios YM, PDA y NUTRITIVO. Posteriormente los medios inoculados se incubaron: NUTRITIVO por 24 horas a 30°C para recuento de bacterias, YM por 48 horas a 28°C para recuento de levaduras y PDA por 5 días a 25°C para el recuento de hongos. Transcurrido este tiempo, se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) diferentes a las de interés (*P.*

onychis Lv027) en cada medio de cultivo y se reportó la sumatoria de UFC contaminantes de los tres medios de cultivo. El resultado se expresó como UFC contaminantes /g de granulado.

Para la evaluación de la pureza se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que determina que las unidades formadoras de colonias (UFC) contaminantes debe ser inferior a 10^6/g de granulado (Biotécnica, 2008).

5.6.2.2. Concentración

Para la determinación de la concentración celular, se tomó 1 muestra de 0,1 g de cada lote de producción, cada muestra se reconstituyó en 9 mL de Tween 80 al 0,1%, se prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-4} y se hizo el montaje de la cámara de Neubauer. En el objetivo de 40x del microscopio, se hizo el conteo de células tomando 16 datos de cada cuadrante de la cámara y se utilizó la siguiente fórmula para determinar el recuento.

$$FUC = \bar{X} * 16 * 10^4 * \text{factor de dilución} = \text{células / mL}$$

El límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, para la concentración celular es de 1-2 $x10^{10}$ células / g de granulado (Biotécnica, 2008).

5.6.2.3. Viabilidad

Para la determinación de la viabilidad se empleó la técnica de recuento en placa en Agar YM. Para ello se tomó 1 muestra de 0,1 g de cada lote de granulado, cada muestra se reconstituyó en 9 mL de Tween 80 al 0,1%, se

prepararon diluciones seriadas hasta 10^{-8} y se sembraron por triplicado en superficie 0,1 mL de las diluciones 10^{-6}, 10^{-7} y 10^{-8} en medio YM. Posteriormente los medios inoculados se incubaron por 48 horas y transcurrido este tiempo, se contaron las Unidades Formadoras de Colonias (UFC). El resultado se expresó como UFC/g de granulado.

Para la evaluación de la viabilidad se tuvo en cuenta el límite o rango de aceptación determinado por el laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas, Biotécnica de CORPOICA, que determina que la viabilidad mínima del granulado debe ser de 10^{10} UFC/g de producto (Biotécnica, 2008).

5.7 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL GRANULADO BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

Se pesaron 20 muestras de 0,1 g de biomasa sin formular y el mismo número de muestras de granulado a partir de cada lote de producción (lotes 1 y 2). Estas muestras se empacaron en bolsas de polietileno. La mitad de las bolsas de cada tratamiento fueron selladas al calor en atmósfera con oxígeno y la otra mitad se selló al vacío (Tabla 3), empleando una Selladora de vacío marca Van der Stahl Scientific, de esta forma se evaluó el efecto del empaque en presencia y ausencia de oxígeno sobre la viabilidad de la levadura. Las 20 muestras empacadas al vacío y sin vacío de cada tratamiento se almacenaron a tres temperaturas (8º, 18º y 28ºC), durante tres meses.

Tabla 3. Tratamientos del estudio de estabilidad bajo condiciones de almacenamiento**.**

Código	Tratamiento
T 1	Biomasa de Lv027 formulada (granulado) y empacada al vacío
T 2	Biomasa de Lv027 formulada (granulado) y empacada sin vacío
T 3	Biomasa de Lv027 sin formular y empacada al vacío
T 4	Biomasa de Lv027 sin formular y empacada sin vacío

5.7.1. Estabilidad microbiológica

La estabilidad microbiológica del granulado (viabilidad) se determinó mensualmente durante tres meses, utilizando la técnica de recuento en placa en Agar YM descrita anteriormente en el numeral 5.6.2.3. Los tratamientos consistieron en la levadura Lv027 sin formular como tratamiento control y el granulado, empacados con vacío y sin vacío y el resultado se expresó como UFC /g de granulado o de levadura liofilizada.

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza ANAVA y una prueba de comparación múltiple de medidas de Tukey con un nivel de confianza del 95%.

5.7.2. Estabilidad de la actividad biocontroladora

La estabilidad de la actividad biocontroladora del granulado y de la levadura sin formular fue evaluada mediante el montaje de bioensayos mensuales durante tres meses, empleando el patosistema modelo *Botrytis*-pétalos de rosa variedad vendela. Se utilizaron las muestras del granulado y la biomasa liofilizada almacenadas a las tres temperaturas, mencionadas anteriormente para el estudio de estabilidad microbiológica.

El bioensayo se llevó a cabo mediante una modificación realizada a la metodología estandarizada por Zapata y Beltran (2007) en el Laboratorio de Control Biológico de CORPOICA.

5.7.2.1. Preparación de los inóculos de levadura y de *Botrytis cinerea*

Con las diluciones preparadas en el estudio de estabilidad microbiológica, se prepararon suspensiones de cada tratamiento ajustando las suspensiones de levadura a $5{,}0x10^7$ células/mL y se preparó una suspensión de *Botrytis cinerea* (Bo007) a una concentración de $1{,}0x10^3$ conidios/mL haciendo raspado de un cultivo de 15 días de edad.

5.7.2.3. Inoculación de los pétalos

Para el montaje del bioensayo se utilizaron pétalos de rosa variedad Vendela. Se seleccionaron pétalos del interior de la flor con un tamaño similar y se colocaron cinco pétalos en una cámara húmeda. Cada cámara húmeda (unidad experimental) consistió en una cubeta plástica con papel absorbente estéril humedecido en el fondo y sobre éste una malla plástica en la cual se apoyaron los pétalos. Los pétalos se inocularon con 10 µL de la suspensión que contenía las células de la levadura por inoculación puntual en el centro del pétalo con ayuda de una micropipeta. Pasadas 24 horas se aplicaron de igual forma, 10 µL del patógeno. Las unidades experimentales se taparon y se dejaron en incubación en completa oscuridad a temperatura ambiente (18 +/- 2ºC) durante doce días.

El testigo patógeno consistió en pétalos inoculados con 10 µL de la suspensión de conidios de Bo007 (*B. cinerea),* el testigo absoluto consistió en pétalos sin ninguna aplicación.

5.7.2.3. Evaluación de la actividad biocontroladora

La actividad biocontroladora se determinó calculando la incidencia y el porcentaje de eficacia del granulado a base de la levadura Lv027, empleando los tratamientos descritos en la Tabla 4.

Tabla 4. Tratamientos del estudio de evaluación de la actividad biocontroladora

Código	Tratamiento
T 1	Inóculo de Lv027 liofilizada formulada empacada al vacío y Bo007
T 2	Inóculo de Lv027 liofilizada formulada empacada sin vacío y Bo007
T 3	Inóculo de Lv027 liofilizada sin formular empacada al vacío y Bo007
T 4	Inóculo de Lv027 liofilizada sin formular empacada sin vacío y Bo007
T 5	Inóculo de Lv027 fresca y Bo007
T 6	Inóculo de Bo007
Control	Pétalos sin inóculo

El porcentaje de incidencia fue expresado como el porcentaje de pétalos que presentan enfermedad y se determinó contando el número de pétalos con enfermedad y empleando la siguiente fórmula: (Biotécnica, 2007).

$$PI\ (\%) = (\text{Número de pétalos enfermos} / \text{Total de pétalos}) * 100$$

El porcentaje de eficacia se calculó empleando la siguiente fórmula: (Moreno, 2003).

$$E\ (\%) = ((a-b) / a) * 100$$

Donde a corresponde a la incidencia del testigo patógeno y b a la incidencia de la enfermedad en un tratamiento dado.

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza KRUSKAL WALLIS con un nivel de confianza del 95%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. PRODUCCION DE Lv027

La producción masiva de la levadura *Pichia onychis* Lv027 fue realizada por fermentación en medio líquido MLXOM, previamente estandarizado en el laboratorio de Control Biológico del Centro de Biotecnología y Bioindustria (CBB) de Corpoica. Después de 4 días de incubación, la biomasa fue separada mediante centrifugación y se obtuvo una pasta húmeda de color café claro con una concentración promedio de $9,5x10^{10}$ células/g y una viabilidad promedio de 10^{11} UFC/g de biomasa.

El resultado obtenido para la viabilidad de la biomasa fue ligeramente superior al valor de concentración determinado mediante el recuento de células, lo que sugiere que la totalidad de las células producidas en la fermentación, eran viables y aptas para el desarrollo de estudios y productos. Resultados similares reportó Higuera (2003) quien obtuvo una concentración celular de $2,8x10^{11}$ células/g y una viabilidad de $3,8x10^{11}$UFC/g para el mismo aislamiento de *P. onychis* evaluado en el presente trabajo.

Contreras (2005) también observó en su estudio, que el resultado de viabilidad de la levadura *Pichis onychis* expresado como UFC/g fue muy similar al resultado obtenido en el recuento de células, siendo los dos del orden de 10^{10}. Este estudio concluyó que se obtuvo una buena concentración de células en la fermentación y éstas en su mayoría fueron viables, lo cual es muy importante, ya que se requiere un alto rendimiento celular, pero si un gran número de células no son viables, el principio activo no es apto para la elaboración del producto.

6.2. ESTUDIO DE COMPATIBILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 CON LOS AUXILIARES DE FORMULACIÓN

La biomasa húmeda se mezcló de manera individual en relación 1:1 (P/P), con cada uno de los excipientes utilizados para elaborar la formulación actual del granulado, considerándose cada mezcla como un tratamiento, y adicionalmente se contó con un testigo absoluto o control consistente en biomasa pura (Tabla 2).

Para determinar la compatibilidad de los excipientes con la levadura Lv027, se evaluó la viabilidad de las células de cada tratamiento durante 3 meses de almacenamiento y se determinó la pérdida de viabilidad con respecto al tiempo.

Después de tres meses de almacenamiento, para todos los tratamientos se observó una reducción de la viabilidad a las tres temperaturas evaluadas (Figuras 4-6). La pérdida de viabilidad a temperatura de refrigeración para el tratamiento T1, biomasa de la levadura Lv027 mezclada con el excipiente Di-01 fue del 0,1%, seguida de una pérdida del 4,6% para este mismo tratamiento almacenado a temperatura ambiente y obteniéndose la mayor pérdida de viabilidad a 28°C con un 13,9%. Con respecto al tratamiento T2 correspondiente a la mezcla de la levadura con el excipiente Di-03, se presentaron pérdidas de viabilidad del 8,5% cuando fue almacenado a 8°C, del 14,9% a 18°C y del 11,0% a 28°C. Para el tratamiento T3 (levadura mezclada con De-01) se obtuvieron pérdidas del 9,1%, 11,4% y 13,3% a 8°C, 18°C y 28°C respectivamente. En el tratamiento T4 (mezcla de levadura con el desintegrante De-05) se presentaron pérdidas del 6,3% a temperatura de refrigeración, del 7,6% a temperatura ambiente y del 8,6% a 28°C. Para el tratamiento T5 compuesto por la mezcla de la levadura con el auxiliar Ps-01, las pérdidas fueron del 0,7%, 8,0% y 18,0% a 8°C, 18°C y 28°C

respectivamente. El excipiente De-03 mezclado con biomasa, codificado como tratamiento T6, no presentó pérdida de viabilidad después de tres meses de almacenamiento a temperatura de refrigeración, al igual que la muestra almacenada a temperatura ambiente, caso contrario al resultado obtenido a 28°C, el cual presentó una reducción de la viabilidad del 5,4%. En el tratamiento T7 en el cual la levadura fue mezclada con el auxiliar Lb-01, se obtuvieron pérdidas del 0,7%, del 8,6% y del 32,3% cuando fue almacenado a 8°C, 18°C y 28°C respectivamente. Finalmente, para el tratamiento testigo o biomasa pura sin adición de ningún excipiente, las pérdidas de viabilidad fueron del 3,1% a 8°C, del 16,2% a 18°C y del 8,9% cuando el almacenamiento fue a 28°C (Anexo 4).

La temperatura tuvo una influencia determinante sobre la viabilidad de las células y en la mayoría de los tratamientos se observó que a mayor temperatura, mayor pérdida de viabilidad. Este efecto de la temperatura de almacenamiento fue descrito previamente en el trabajo de Higuera (2003) con la levadura Lv027, donde se obtuvieron reducciones de la viabilidad del 11%, 12% y 59%, para la biomasa pura de la levadura *P. onychis* cuando fue almacenada a 8°C, 18°C y 28°C respectivamente.

Los resultados de viabilidad no presentaron homogeneidad de varianzas, por lo que fueron transformados mediante el cálculo de su logaritmo decimal, para llevar a cabo el análisis estadístico y de esta forma poder comparar los tratamientos. La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la pérdida de viabilidad de la levadura para los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T7 y el control, lo que sugiere que estos excipientes no ejercieron un efecto negativo sobre las células de la levadura, durante 3 meses de almacenamiento a 8°C (Anexo 5). Sin embargo, los tratamientos T2, T3 y T4 presentaron pérdidas de viabilidad que fueron numéricamente superiores a la obtenida con la levadura pura;

resultado que podría indicar que existe alguna interacción entre estas sustancias y el microorganismo biocontrolador. Este posible efecto de los excipientes T2, T3 y T4 no fue significativo, pero debe tenerse en cuenta, ya que podría ser más notorio e inclusive afectar significativamente la viabilidad de la levadura, si el tiempo de contacto es mayor y por tal razón, podría repercutir en la vida útil del bioplaguicida.

El tratamiento T6 presentó una pérdida de viabilidad significativamente inferior ($P < 0,05$) en comparación con el testigo (Figura 4 y Anexo 5), lo que sugiere que este excipiente podría estabilizar a la levadura Lv027 durante el almacenamiento a 8°C. Dicho efecto estabilizador de un componente del bioplaguicida es deseable, ya que estos compuestos pueden jugar un papel determinante en la vida útil del producto, haciendo que ésta sea mayor cuando dichos excipientes hacen parte de la formulación.

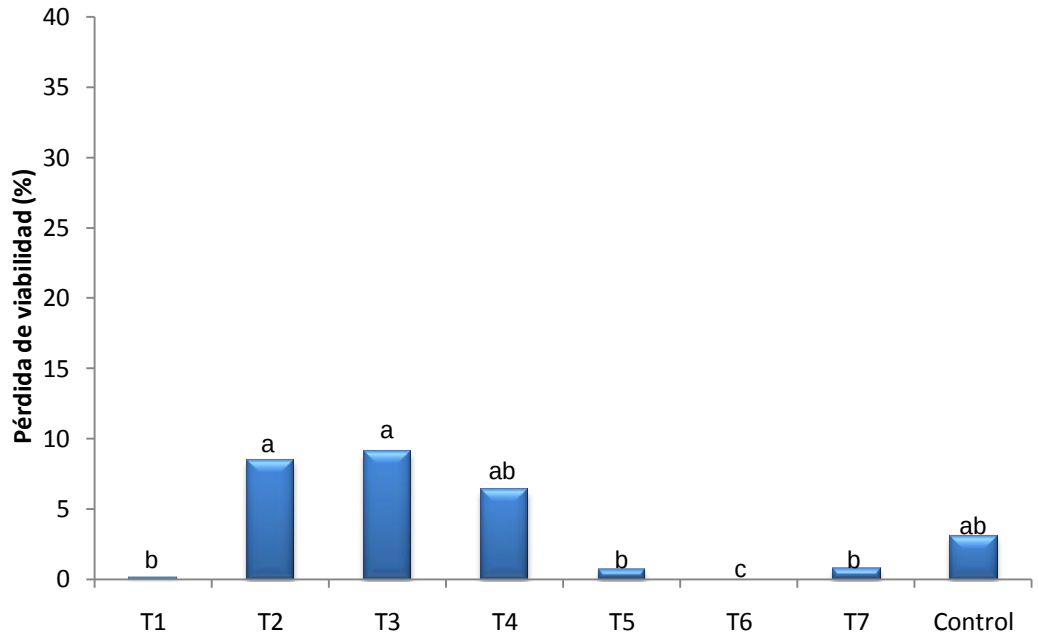

Figura 4. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 después de tres meses de almacenamiento a 8ºC, sola y mezclada con los excipientes de formulación del prototipo granulado. Viabilidad transformada mediante el cálculo de su logaritmo decimal. T1: Lv027+Di-01, T2: Lv027+Di-03, T3: Lv027+De-01, T4: Lv027+De-05, T5: Lv027+Ps-01, T6: Lv027+De-03, T7: Lv027+Lb-01. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

A 18ºC se presentó un comportamiento similar al obtenido a 8ºC, ya que no se detectó un efecto negativo de los auxiliares de formulación sobre las células, considerando que la pérdida de viabilidad de los tratamientos T2, T3, T4, T5 y T7 no fue estadísticamente diferente de la presentada por la biomasa pura o tratamiento control.

El tratamiento T6 al igual que a 8ºC y adicionalmente el tratamiento T1, presentaron una pérdida de viabilidad significativamente inferior ($P < 0,05$) con respecto a la del tratamiento control (Figura 5 y Anexo 6), sugiriendo que a dicha temperatura, estos dos excipientes probablemente brindaron estabilidad a las células durante los tres meses de almacenamiento.

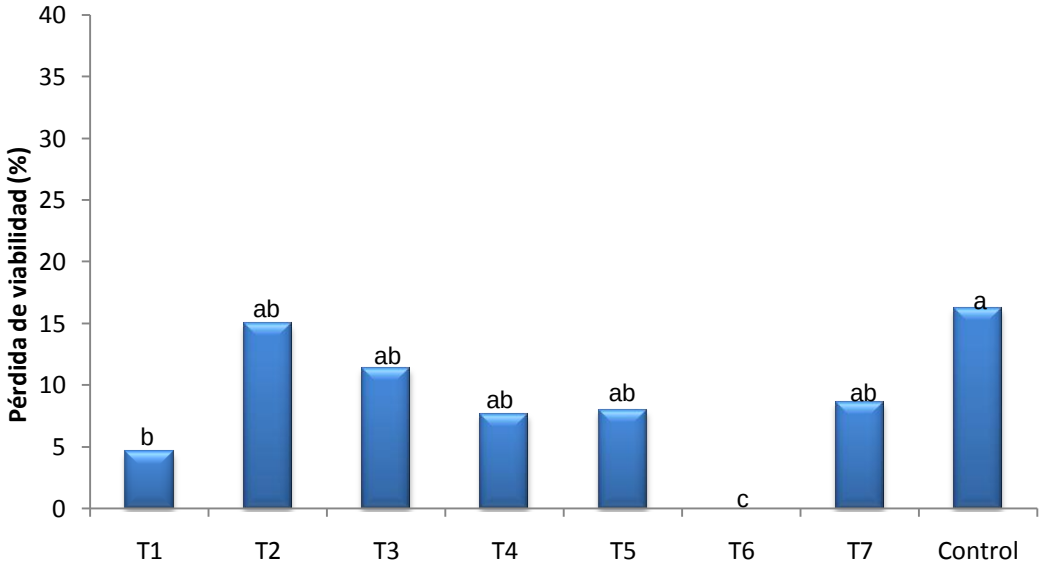

Figura 5. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 después de tres meses de almacenamiento a 18ºC, sola y mezclada con los excipientes de formulación del prototipo granulado. Viabilidad transformada mediante el cálculo de su logaritmo decimal. T1: Lv027+Di-01, T2: Lv027+Di-03, T3: Lv027+De-01, T4: Lv027+De-05, T5: Lv027+Ps-01, T6: Lv027+De-03, T7: Lv027+Lb-01.Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Cuando los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6 fueron almacenados a 28ºC, se observó que la pérdida de viabilidad de la levadura no fue

estadísticamente diferente de la obtenida con el tratamiento testigo (Figura 6 y Anexo 7), lo que confirma que los excipientes evaluados, no ejercieron un efecto tóxico sobre la levadura, pudiéndose concluir que a esta temperatura, estos auxiliares de formulación fueron compatibles con el microorganismo.

La reducción de la viabilidad presentada por el tratamiento T7 almacenado a 28°C, fue estadísticamente superior a la obtenida con el tratamiento testigo, sugiriendo este resultado, que el excipiente correspondiente al tratamiento en mención, presentó un efecto negativo sobre las células de la levadura cuando fueron almacenados a dicha temperatura. Esto podría estar relacionado con un efecto tóxico de dicha sustancia sobre las células, el cual no fue observado a 8°C y 18°C. Este efecto se presentó a la mayor temperatura evaluada, la cual permite evidenciar los procesos de degradación para detectar rápidamente un comportamiento que podría presentarse en un lapso mayor de tiempo, si el almacenamiento se realiza a una temperatura menor. Por tal razón, con base en los resultados de este estudio, se sugirió que el excipiente Lb-01 fuera excluido de la formulación, ya que éste posiblemente tendrá un efecto tóxico a largo plazo sobre la levadura Lv027 y podría ser la causa de que en estudios previos se haya presentado baja estabilidad de la viabilidad de la formulación durante el almacenamiento (Higuera, 2003; Contreras, 2005).

El excipiente codificado como Lb-01 es un estearato, utilizado comúnmente en formulaciones sólidas como agente de fluidez. Boyland *et al.* (1986) recomiendan almacenar en frío compuestos como el estearato de calcio, de magnesio y de zinc, ya que estas sustancias son de fácil degradación. Es posible que en el presente estudio, se haya producido algún grado de descomposición química del excipiente Lb-01 cuando fue almacenado a 28°C y sus compuestos de degradación podrían tener un efecto tóxico sobre las células de la levadura, razón por la que posiblemente se observó una

pérdida significativa de la viabilidad, cuando el tratamiento se almacenó a la mayor temperatura.

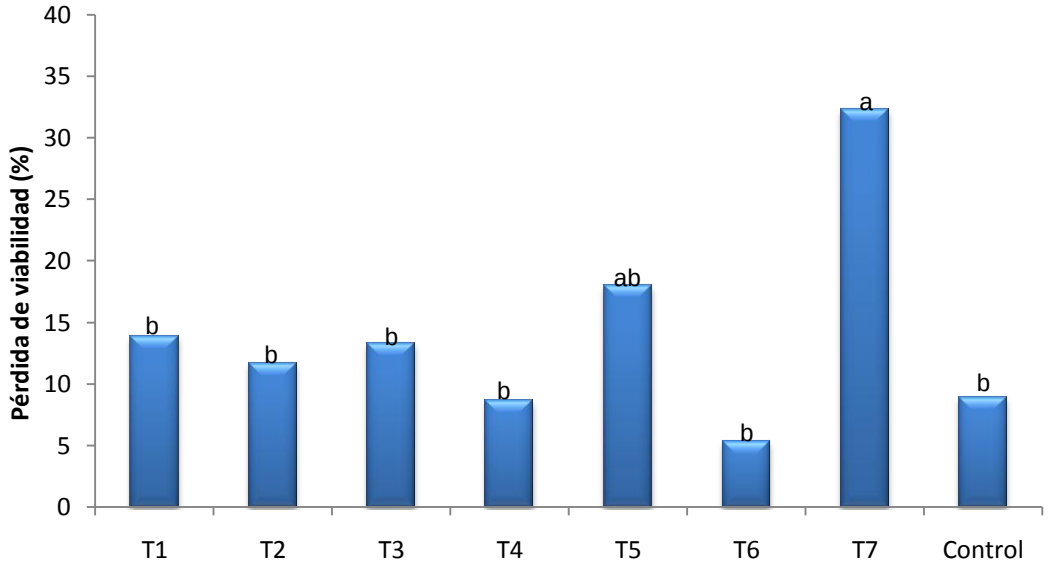

Figura 6. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 después de tres meses de almacenamiento a 28ºC, sola y mexclada con los excipientes de formulación del prototipo granulado. Viabilidad transformada mediante el cálculo de su logaritmo decimal. T1: Lv027+Di-01, T2: Lv027+Di-03, T3: Lv027+De-01, T4: Lv027+De-05, T5: Lv027+Ps-01, T6: Lv027+De-03, T7: Lv027+Lb-01.Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según prueba de Tukey (95%).

Adicionalmente, los estearatos presentan un carácter básico en sus propiedades químicas (Boyland *et al.,* 1986), parámetro que también podría afectar la viabilidad de las células de la levadura, ya que el pH óptimo para este microorganismo se encuentra en un rango de 3.5 a 5.0 (Membré *et al*., 1999). Teniendo en cuenta que el pH del medio puede influir sobre la expresión de genes y regular el transporte de protones, la degradación de los aminoácidos, la adaptación a condiciones ácidas o básicas y aún la virulencia (Carrillo, 2003), es posible que la alcalinidad producida por el excipiente Lb-01 en el medio también haya afectado la viabilidad de la levadura durante el estudio.

Los excipientes correspondientes a los tratamientos 3 y 4 que presentaron una pérdida de viabilidad numéricamente superior a la obtenida con el control cuando se evaluó la compatibilidad a 8°C, son azúcares empleados frecuentemente en la industria farmacéutica, dentro de los que se encuentran la lactosa, la dextrosa y la sacarosa entre otros (Kelber, 2007). Algunos de estos azúcares son de carácter higroscópico, es decir, que tienen la capacidad de absorber y retener humedad de la atmósfera (Boyland *et al.,* 1986). Este tipo de compuestos cuando son mezclados con la biomasa, podrían aumentar la humedad de la mezcla mediante la absorción de agua presente en la atmósfera, afectando de esta manera la viabilidad de las células durante el almacenamiento. Dicho efecto se debe a que la alta humedad mantiene activo el metabolismo celular, permitiendo la producción de metabolitos tóxicos, que pueden perjudicar la viabilidad de las células, provocando una autolisis de las mismas durante el almacenamiento (Sabaratnam & Traquair, 2002).

El tratamiento T6 corresponde a una mezcla de levadura con azúcares y carbohidratos. La levadura almacenada con este excipiente presentó una pérdida de viabilidad significativamente inferior con respecto a la del tratamiento control, cuando fue almacenada a las tres temperaturas evaluadas, permitiendo concluir que este compuesto confirió estabilidad a las células de la levadura. Este efecto podría atribuirse a que algunos azúcares empleados en la elaboración de bioplaguicidas, pueden actuar como protectores de secado, es decir, estabilizando las células durante el proceso de deshidratación, y en consecuencia haciéndolas más tolerantes al almacenamiento. Por ejemplo, Shabana *et al.* (2003) observaron que la sacarosa adicionada a las células de *Fusarium oxysporum* antes del secado, protegió a este microorganismo durante el proceso y extendió su supervivencia durante el almacenamiento. Dicho efecto se atribuyó a que la sacarosa puede estabilizar la membrana celular reemplazando las moléculas

de agua presentes en la bicapa lipídica, evitando el colapso de la membrana celular durante el proceso de deshidratación. En otro trabajo, Melin *et al.* (2006) encontraron que la trehalosa estabilizó las proteínas y la bicapa lipídica cuando el agua fue removida durante el proceso de secado de *Pichia anomala.*

Las menores pérdidas de viabilidad se presentaron cuando los tratamientos fueron almacenados a temperatura de refrigeración. El almacenamiento bajo condiciones de refrigeración podría estabilizar las células, debido a que bajas temperaturas disminuyen el metabolismo celular y de esta forma, se previene la producción de metabolitos tóxicos (Sabaratnam & Traquair, 2002). Caso contrario ocurrió cuando las muestras fueron almacenadas a 28°C, temperatura en la que se obtuvieron las mayores pérdidas de viabilidad. La disminución de la viabilidad a altas temperaturas puede deberse al daño que éstas causan sobre los componentes celulares, afectando principalmente estructuras a nivel de pared celular (Jackson *et al.*, 2006).

Una de las condiciones adversas que pudo afectar la viabilidad de las células durante el almacenamiento, fue que éste se realizó en viales de vidrio sellados bajo condiciones aeróbicas. Abadías *et al.* (2001) demostraron que el almacenamiento en presencia de oxígeno, permite que este compuesto interactúe con los sistemas membranosos de las células, afectando la iniciación de la síntesis del DNA y en consecuencia la viabilidad de las mismas.

Otra variable a tener en cuenta cuando se determina la viabilidad de las células después de que éstas son sometidas a condiciones de almacenamiento, es la solución de rehidratación que se emplea. En este estudio se utilizó Tween 80 al 0,1% (P/V), solución que posiblemente causó un choque osmótico en las células al momento de su reconstitución para la

evaluación de la viabilidad. Este choque osmótico ocasiona una pérdida de la viabilidad celular, adicional a la causada por el almacenamiento y el proceso de secado (Higuera, 2003). Por esta razón, se recomienda evaluar diferentes soluciones de rehidratación para el desarrollo de este tipo de pruebas, con el fin de determinar si la pérdida de viabilidad que se presenta se debe al tratamiento o a otra condición de estrés.

Finalmente, con los resultados obtenidos en el presente estudio, el grupo de Tecnología del laboratorio de Control Biológico del CBB de CORPOICA, modificó la formulación del granulado a base de la levadura Lv027, generando un nuevo prototipo de bioplaguicida que no incluye el excipiente Lb-01 en su composición, ya que a éste se atribuyó una posible incompatibilidad con la levadura.

6.3. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO

La determinación de las características fisicoquímicas y microbiológicas del granulado se llevó a cabo inmediatamente después de la formulación de dos lotes independientes de producto.

Figura 7. Granulado modificado a base de la levadura Lv027.

6.3.1. Caracterización fisicoquímica

6.3.1.1. pH

El pH de los dos lotes de granulado fue determinado mediante una medición potenciométrica. Esta característica es importante porque interfiere en la estabilidad del microorganismo empleado como principio activo en una formulación; ya que aunque los microorganismos pueden crecer en un margen más o menos amplio de pH (alrededor de un óptimo), los valores extremos pueden ser nocivos (afectando la membrana, el transporte de solutos, e inhibiendo enzimas) y ocasionar que cambien su metabolismo, limitando su desarrollo e incluso causar su propia inhibición (Scragg, 2002).

El granulado presentó un pH de 6,0 ± 0,1 para el lote 1 y de 5,6 ± 0,3 para el lote 2 (Tabla 5 y Anexo 8). Los dos valores de pH se encuentran en el rango de aceptación determinado por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que establece que el valor de pH para bioplaguicidas sólidos a base de hongos debe estar entre 5 y 7 (Biotécnica, 2003), rango empleado para evaluar los dos lotes de granulado objeto de este estudio.

Otra referencia que da soporte al uso de este rango de pH, es la del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE) que recomienda para los productos biológicos, que el pH se mantenga en un rango entre 5 y 7 para proteger la integridad de las células (Cenicafé, 1997).

Para los prototipos iniciales del granulado a base de la levadura *P. onychis* optimizado en el presente estudio, Higuera (2003) obtuvo un pH de 6,4 y posteriormente Contreras (2005) un pH de 6,5. Estos valores también se encontraron dentro del rango mencionado anteriormente, al igual que los

valores obtenidos en este estudio, por lo que se espera que esta característica no ejerza ningún efecto negativo sobre las células. Asímismo, mantener el pH en un rango óptimo para el organismo inoculante, ayuda a prevenir el crecimiento de contaminantes en el producto (Burges, 1998).

Estos resultados indican que los excipientes empleados en la formulación, permiten obtener un pH apropiado para el producto sin afectar las células de la levadura; teniendo en cuenta que *P. onychis,* principio activo del granulado evaluado, es un microorganismo que se desarrolla adecuadamente cuando el pH es ácido en un rango aproximadamente de 4 a 6 (Neelakantam *et al.*, 2005).

El pH es un parámetro importante a tener en cuenta en la etapa de almacenamiento, debido a que sus cambios pueden inhibir el crecimiento del principio activo y alterar sus características fisiológicas y de actividad biocontroladora (Friesen *et al.*, 2006), por ello se recomienda que este parámetro sea evaluado en posteriores estudios de estabilidad.

6.3.1.2. Humedad

La humedad es un parámetro muy influyente en la estabilidad de productos cuyo principio activo es un microorganismo. Bajas humedades, alrededor del 5%, disminuyen la tasa metabólica de los microorganismos evitando la acumulación de metabolitos tóxicos y el agotamiento de nutrientes (Abadías *et al.,* 2003; Sabaratnam & Traquair, 2002), conservando de esta manera la viabilidad y virulencia y aumentando la vida útil de los bioproductos durante el almacenamiento (Lawrie *et al*., 2001).

Por ejemplo, Higuera (2003) atribuyó las pérdidas de viabilidad del granulado a base de la levadura *P. onychis,* a la alta humedad presente en el producto

antes del almacenamiento, la cual fue del 9,4%, por lo que sugirió reemplazar el secado en estufa por otro proceso de secado para obtener una humedad menor al 5%. Posteriormente, Contreras (2005) continuó con la optimización del granulado a base de la levadura *P. onychis* y empleó como proceso de secado la liofilización, logrando una humedad del 5,7%. Este valor es próximo al recomendado por varios autores como Wraigth *et al.* (2001), quienes sugirieron que los biopreparados se deben almacenar a humedades inferiores al 5%, lo cual se consigue con un adecuado proceso de secado.

La humedad del granulado modificado en el presente trabajo fue determinada antes de iniciar el almacenamiento, presentando valores del 5,4 ± 0,3% y del 5,0 ± 0,2% para los lotes 1 y 2 respectivamente (Tabla 5 y Anexo 8), valores que están dentro del rango de aceptación determinado para este producto por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que establece que la humedad debe ser de 5,0 ± 1,0% (Biotécnica, 2008).

La baja humedad del granulado elaborado en este estudio podría ser atribuida al proceso de liofilización, siendo éste un proceso muy eficiente para la remoción de agua y poco nocivo para los microorganismos cuando se utiliza un adecuado protector de secado ya que éste estabiliza las células durante el proceso de deshidratación y en consecuencia las hace más tolerantes al almacenamiento (Shabana *et al.,* 2003; Li & Tian, 2007).

Con los bajos porcentajes de humedad presentados por el granulado es posible sugerir que éste no tendrá problemas de manipulación, durante su empaque y aplicación, dado que las humedades elevadas favorecen la compactación del producto en los envases durante el almacenamiento e

impiden el flujo libre del mismo en el momento de la reconstitución, quedando el producto adherido al fondo del recipiente (Helman, 1982).

En conclusión, la humedad del granulado fue apropiada y se espera que no haya compactación de los gránulos, ni se presenten efectos negativos sobre la viabilidad y actividad de la levadura. Sin embargo, un factor importante a tener en cuenta es que algunos excipientes empleados comúnmente en las formulaciones son de carácter higroscópico y pueden alterar el contenido de humedad del producto, ya que la humedad de éstos fluctúa y se extiende para equilibrarse con la humedad relativa del ambiente (Burges, 1998), por ello se recomienda que este parámetro sea evaluado durante el almacenamiento del producto para determinar el comportamiento del mismo a largo plazo.

6.3.1.3. Humectabilidad

La humectabilidad es la característica que determina el tiempo que tarda un producto sólido en humedecerse completamente (Cenicafé, 1997). Esta propiedad determina la facilidad con la que el producto puede ser reconstituido y depende de las características hidrofílicas de los auxiliares de formulación y por lo tanto de su capacidad de disolución en el agua (Mariño 2001; Aulton, 2004).

La humectabilidad de un producto puede determinarse por el ángulo de contacto que forma éste con la superficie del líquido. Para que un líquido humedezca totalmente un producto debe disminuir la energía libre superficial a causa del proceso de inmersión. En la mayoría de los casos en los que interviene el agua, solo puede reducirse el ángulo de contacto mediante la adición de un agente humectante, los agentes humectantes son surfactantes que reducen la tensión superficial y además se adsorben en la superficie del

polvo, lo que reduce el ángulo de contacto y aumenta la dispersabilidad del producto (Aulton, 2004; Ramachandran *et al.*, 2008).

Los lotes 1 y 2 de granulado presentaron tiempos de humectabilidad de 77,0 ± 6,2 seg y de 44,7 ± 1,5 seg respectivamente (Tabla 5 y Anexo 8), valores que están por encima del valor máximo aceptado por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que establece que los granulados dispersables deben humectarse en menos de 30 segundos (Biotécnica, 2003).

Teniendo en cuenta en estudios previos realizados a la formulación original del granulado, Higuera (2003) obtuvo una humectación inmediata y Contreras (2005) un tiempo de humectación de 11,7 segundos, es posible atribuir que el aumento en el tiempo de humectación para el granulado haya sido debido a la modificación que se realizó a la formulación.

Adicionalmente, es posible que el retardo en el tiempo de humectación también pueda ser debido a que los agentes lubricantes empleados en la preparación de formas farmacéuticas con la finalidad de mejorar la fluidez de los granulados y polvos e impedir la adhesión a los punzones de las máquinas de comprimir, son a menudo productos hidrofóbicos que en porcentajes elevados impiden la humectación de las partículas y retardan la velocidad de disolución (Cid, 2008).

En este estudio se empleó un estearato, correspondiente a uno de los agentes de lubricación más utilizados en la industria, el cual puede producir verdaderas catástrofes biofarmacéuticas al impedir la disolución de muchos principios activos en los medicamentos (Cid, 2008). Sin embargo, para el caso del producto en estudio, solo se sobrepasó el límite de tiempo de humectación en unos cuantos segundos, no superándose los 2 minutos para

la humectación completa y posiblemente este tiempo será indiferente para el agricultor cuando realice la reconstitución del bioplaguicida, por lo tanto se sugiere que se modifique el límite de aceptación para esta característica de 30 segundos a 120 segundos.

Para reducir el tiempo de humectación se podría sugerir disminuir la concentración del agente lubricante en la formulación del granulado, dado que parece existir una relación directamente proporcional entre el tiempo de humectación y la cantidad empleada de éste.

Uno de los problemas que se observan al dispersar materiales sólidos en agua es que éstos pueden no humedecerse fácilmente y puede deberse al aire atrapado en el interior de las partículas del mismo (Aulton, 2004). Este efecto se evidenció en el desarrollo de esta prueba, ya que se observó que al adicionar la muestra de granulado en el agua, los gránulos no se humedecieron homogéneamente, algunos cayeron casi inmediatamente al fondo del recipiente, mientras que otros permanecieron en la superficie del agua por un período mayor de tiempo. Este hecho podría deberse a diferencias en la porosidad de cada gránulo, donde los gránulos de baja porosidad se desplazan al fondo por que presentan una mayor densidad y flotan aquellos de menor densidad que tiene un alto número de espacios interparticulares, conteniendo aire en su interior (Helman 1982).

La humectabilidad en un granulado es un aspecto fundamental, ya que el producto debe ser reconstituido en agua para su aplicación, razón por la cual debe humectarse rápidamente para que al momento de su aplicación se forme fácilmente una suspensión homogénea y se asegure la eficiencia del producto (Higuera, 2003).

6.3.1.4. Desintegración

La desintegración es la medida de la capacidad de disgregación de un granulado en un medio líquido en un tiempo determinado (Cohen, 1998), poniendo en libertad las partículas de polvo que lo constituyen y es de gran importancia en la reconstitución del producto (Helman, 1982).

El tiempo o velocidad de desintegración depende en gran medida de la solubilidad de los componentes de la formulación, pero también influyen otros factores como la humectación, el tamaño y forma de los gránulos y la porosidad, entre otros. Por esto, es de gran importancia conocer las características de los materiales, si son hidrófobos o hidrófilos, ya que las partículas hidrófobas por su polaridad, son muy poco afines por el agua, es decir, son hidrorrepelentes. Por el contrario, las hidrofílicas, debido a su alta polaridad se humectan fácilmente (Helman, 1982; Quiroz, 2000).

La desintegración también es afectada por factores como la temperatura, dado que a mayor temperatura, la velocidad de desintegración se incrementa y a temperaturas bajas disminuye. Otro factor es la presión de solvatación, ya que los líquidos ejercen una presión sobre los sólidos y de acuerdo a su naturaleza, lo solvatan o disgregan en menor o mayor medida. El pH, también juega un papel importante, que debido a si un desintegrante tiene características de ácido débil, se solvata fácilmente a un pH superior a 8 promoviendo la desintegración y si es de carácter básico, se solvata en valores de pH menores a 6. Finalmente, la fuerza de compresión determina la velocidad de desintegración, la cual disminuye a medida que aumenta la fuerza empleada para la formación del gránulo. Tal es el caso de que un producto con una dureza muy alta es prácticamente imposible de desintegrar; esto debido a que el agua no puede penetrar para desintegrar al granulado (Quiroz, 2000).

El tipo y la cantidad de algunos de los auxiliares de formulación como los aglutinantes y los lubricantes, también influyen sobre la velocidad de desintegración, ya que un exceso de estos componentes pueden causar problemas en la disgregación de las partículas, porque pueden producir gránulos muy compactos y generar impermeabilización de los mismos, alterando las propiedades de absorción de agua (Gennaro, 1995).

Los lotes 1 y 2 de granulado presentaron tiempos de desintegración de 2,3 ± 0,1 min y de 2,2 ± 0,1 min respectivamente (Tabla 5 y Anexo 8), valores que están por debajo del límite máximo de aceptación determinado por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que estableció que el tiempo de desintegración de un granulado dispersable debe ser inferior a 5 minutos (Biotécnica, 2003), por lo que se puede sugerir que el granulado en estudio presenta una desintegración adecuada, cumpliendo con los estándares de calidad para este tipo de producto. Este comportamiento se podría deber a un eficiente papel del agente desintegrante adicionado a la formulación, el cual es un azúcar que al entrar en contacto con el agua se solubiliza rápidamente, aumentando los espacios intraparticulares en la estructura granular y de esta forma permitiendo la entrada del líquido en ésta y su posterior disgregación (Cid, 2008).

La rápida desintegración también pudo deberse al agente aglutinante empleado en la formulación, el cual se utilizó en una adecuada proporción que permitió la adhesión de las partículas pero no la formación de un gránulo muy duro y por ende, se obtuvo un producto con una apropiada desintegración.

El tiempo de desintegración del granulado modificado objeto del presente trabajo fue inferior a los obtenidos por Higuera (2003) y Contreras (2005),

quienes caracterizaron los prototipos iniciales del granulado a base de la levadura *P. onychis* Lv027, obteniendo desintegraciones de 4,0 minutos y de 4,2 minutos respectivamente. Contreras (2005) efectuó la optimización del granulado elaborado por Higuera (2003) y encontró que el tiempo de desintegración fue similar al obtenido antes de la optimización, a pesar de que en su estudio el granulado fue secado mediante liofilización razón por la cual se esperaba que el tiempo de desintegración fuera menor, debido a que los materiales liofilizados tienden a ser más higroscópicos, lo que favorece la desintegración, comparando con el granulado de Higuera (2003), que fue secado en estufa de aire caliente. Contreras (2005) atribuyó este efecto a que esta característica es afectada por otros factores como el tamaño de los gránulos, los cuales fueron más grandes que los del granulado desarrollado antes de la optimización. Sin embargo, en el presente estudio si se evidenció una disminución del tiempo de desintegración, casi a la mitad del obtenido por Contreras (2005), lo cual podría atribuirse a la modificación que se realizó en la composición de la formulación, gracias a los resultados obtenidos en la prueba de compatibilidad de la levadura con los excipientes.

6.3.1.5. Voluminosidad

El volumen de un granulado se encuentra representado por el espacio que ocupa su masa sólida y por el volumen de los espacios vacíos ocupados por aire, gases o agua y está directamente relacionado con la voluminosidad, dado que ésta es definida como el volumen que ocupa un peso dado de un material (Helman, 1982).

Esta característica está determinada por el tamaño y forma de las partículas, a medida que el tamaño de partícula disminuye, incrementa la voluminosidad e incide sobre la manipulación del producto durante los procesos de llenado de recipientes, la capacidad de los mismos, la facilidad de mezcla y la

densidad global, entre otros factores tecnológicos (Voight & Bornschein, 1982).

Para esta característica, el granulado a base de la levadura *P. onychis* presentó valores de 2,5 ± 0,1 mL/g para el lote 1 y de 2,9 ± 0,1 mL/g para el lote 2 (Tabla 5 y Anexo 9), valores que están por debajo del límite de aceptación determinado por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que estableció que la voluminosidad debe ser inferior a 3 mL/g (Biotécnica, 2003). Por tal razón se puede sugerir que el granulado presenta una voluminosidad adecuada, dado que la industria farmacéutica recomienda voluminosidades inferiores a 3 mL/g para asegurar que el producto no presente problemas de manipulación durante el proceso de manufactura y empaque (Voight & Bornschein, 1982; Martin & Sinko, 2005).

Los bajos valores de voluminosidad obtenidos en el presente estudio pueden ser atribuidos a la eficiente acomodación de las partículas, dado que la forma y el tamaño uniforme de las partículas permiten que éstas se ordenen fácilmente y disminuya el espacio interparticular, lo que trae como consecuencia una disminución de la voluminosidad del producto (Aulton, 2004; Rodríguez *et al*., 2005).

La voluminosidad también es influenciada por las propiedades físicas y químicas de los auxiliares de la formulación, incluyendo en estas la voluminosidad de los mismos (Gennaro, 1995; Valencia, 2000), por ello es recomendable conocer las propiedades de los excipientes a utilizar en el desarrollo de un producto.

Garzón (2002) determinó la voluminosidad de un preformulado a base de *Trichoderma koningiopsis* y encontró valores bajos en un rango de 1,2 mL/g

y 1,3 mL/g, atribuyendo este hecho a que todos los excipientes que se emplearon en la formulación presentan bajos valores de voluminosidad.

Otros autores como Villamizar *et al.* (2005) encontraron para un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella*, valores de voluminosidad muy bajos entre 0,9 mL/g y 1,0 mL/g y atribuyeron estos resultados a la baja voluminosidad del vehículo inerte empleado en la formulación.

Finalmente, se puede sugerir que por los apropiados valores de voluminosidad presentados, el granulado no tendrá problemas de manipulación durante el proceso de producción y envasado.

6.3.1.6. Porosidad

La porosidad de un producto está determinada por los poros internos o espacios capilares presentes en el mismo (Martín & Bustamante, 1993), depende de la forma y distribución del tamaño de las unidades que lo componen, de la rugosidad de sus superficies y de la forma de empaquetamiento de las partículas (Farmacotécnia I, 2004) y varía según las características físicas, los constituyentes y las fuerzas de aglomeración que se aplican en el momento de la fabricación del producto (Garzón, 2002).

De la porosidad depende el flujo de un granulado, en términos generales, todo tipo de granulado está formado por partículas anisotrópicas donde las pequeñas tienden a llenar los espacios que quedan entre las grandes, dando un grado de empaquetamiento más denso y fluido (Farmacotécnia I, 2004).

La industria farmacéutica ha establecido que la porosidad de un producto sólido debe encontrarse por debajo del 30%, para que el producto

desarrollado tenga una resistencia mecánica apropiada, es decir, que no se presenten daños debido a golpes y roces durante el proceso de envase, transporte y almacenamiento. Este valor de porosidad indica también que el producto tendrá la posibilidad de absorber suficiente agua como para que no se presenten problemas de humectabilidad ni de desintegración (Darr, 1981).

La porosidad promedio determinada para el lote 1 del granulado optimizado a base de la levadura *P. onychis* fue del 14,5 ± 1,6% y para el lote 2 del 10,7 ± 2,6% (Tabla 5 y Anexo 9), teniendo en cuenta las desviaciones estándar y los límites de confianza (de 13,3% a 15,6% y de 8,1% a 13,2% para los lotes 1 y 2 respectivamente), se puede inferir que las porosidades de los lotes no son diferentes entre sí, y que los valores están dentro del límite de aceptación determinado por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que basado en lo sugerido para la industria farmacéutica establece que la porosidad debe ser inferior al 30% (Biotécnica, 2003).

La porosidad es una propiedad importante de los granulados, ya que determina la humectabilidad y la fragilidad de los mismos (Martín & Bustamante, 1993), los resultados obtenidos muestran que el granulado evaluado en este estudio, posiblemente posee espacios interparticulares que permitirán la absorción de agua y por lo tanto la desintegración del producto, pero al mismo tiempo la porosidad obtenida es baja, lo que sugiere que el granulado no es frágil y podría resistir cierta manipulación sin fracturarse conservando su tamaño de partícula y sin producir finos los cuales generarían perdidas del producto (Mariño, 2001).

Con los resultados obtenidos de porosidad es posible sugerir que no hay una total uniformidad en el tamaño de las partículas del granulado y que las partículas más pequeñas resbalan entre los espacios de las partículas

grandes y de esta forma disminuye el área vacía, por lo que la porosidad es menor, dado que a mayor cantidad de espacios vacíos mayor porosidad (Allen *et al.*, 2005). Además, las partículas grandes tienden a ser menos porosas porque éstas, son el resultado de una estructura llena y estrecha de partículas pequeñas, como consecuencia, el volumen de los poros es más pequeño (Ramachandran *et al.,* 2008).

La baja porosidad de un producto, como la obtenida en este estudio se debe a la adecuada utilización en cantidad y tipo de aglutinante en la formulación, ya que por medio de éste se lleva a cabo la adhesión de las partículas, para que los gránulos puedan adquirir el tamaño y la dureza requerida (Higuera, 2003).

Para esta característica, Higuera (2003) y Contreras (2005) quienes como se mencionó anteriormente evaluaron los prototipos iniciales del granulado a base de la misma levadura empleada en el presente estudio, encontraron porosidades bajas, del 7,0% y del 9,1% respectivamente y teniendo en cuenta sus límites de confianza, es posible decir que los valores de porosidad de dichos prototipos no son diferentes de los obtenidos en el presente trabajo para el producto optimizado, sugiriendo de esta forma que la modificación de la formulación del granulado no afectó esta característica.

6.3.1.7. Fluidez estática

Uno de los requisitos que debe cumplir un material es el de tener muy buena fluidez (Farmacotécnia I, 2004). La fluidez es un factor importante durante el proceso de manufactura de un producto, ya que determina el tipo de sistema de alimentación mecánica requerido para realizar eficientemente el proceso (Aulton, 2004). La medición del ángulo de reposo es una técnica relativamente simple para estimar las propiedades de flujo de un material,

puede ser fácilmente determinada permitiendo que el producto fluya a través de un embudo y dejándolo caer libremente sobre una superficie; la altura y el diámetro del cono resultante es medido y se calcula el ángulo de reposo, donde la tangente del ángulo es igual al cociente de la altura sobre el radio (Allen *et al.*, 2005; Martin & Sinko, 2005). En términos generales, el ángulo de reposo es empleado para caracterizar el flujo de los granulados. Entre menor sea el ángulo de reposo, mayor será el flujo del material y viceversa (Quiroz, 2000; Farmacotécnia I, 2004).

La fluidez del granulado a base de la levadura *P. onychis* se determinó empleando la técnica del ángulo de reposo y el valor promedio del ángulo obtenido fue de 33,5 ± 1,0° y de 31,8 ± 0,4° para los lotes 1 y 2 respectivamente (Tabla 5 y Anexo 10). Estos valores están por debajo del límite de aceptación determinado por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que estableció que el ángulo de reposo debe ser inferior a 45° (Biotécnica, 2003). En consecuencia, el granulado puede ser clasificado como un producto con flujo libre, dado que los rangos para esta característica son: ≤ 35° Flujo libre, 35°- 45° Ligeramente cohesivo (poco flujo) y > 45° Sin flujo libre (Voight & Bornschein, 1982; Farmacotécnia I, 2004; Biotécnica, 2008).

Los ángulos de reposo obtenidos, pueden ser atribuidos a factores como el tamaño y la forma de las partículas, ya que estos determinan en gran medida las propiedades de flujo de un material (Allen *et al.*, 2005). Las partículas del granulado presentaron un tamaño que osciló entre 850 µm y 2000 µm, lo que permitió que el producto tuviera buen flujo, teniendo en cuenta que las partículas que presentan tamaños inferiores a 75 µm no fluyen libremente debido a su alta cohesión. Por el contrario, las partículas con tamaños en el rango de 250 a 2000 µm tienen muy buen flujo (Aulton, 2004; Farmacotécnia I, 2004) y considerando que el tamaño de partícula del producto final está

determinado por los excipientes, se puede afirmar que éstos también son determinantes en el flujo (Herting & Kleinebudde, 2007).

El flujo libre del granulado señalado anteriormente, también podría deberse a la eficiente disminución de la fuerza de cohesión y de rozamiento efectuada por el agente lubricante, dado que estas sustancias incrementan las propiedades de flujo de las partículas y su acción puede ocurrir por que eliminan la carga estática externa de las partículas, cubren las superficies rugosas de las partículas haciendo que se disminuya la fricción y rugosidad de éstas, aumentan la adsorción de gases y vapores y evitan la cohesión y fricción entre partículas al reducir las fuerzas de interacción de Van der Waals. Sin embargo, es importante tener en cuenta que los lubricantes se deben adicionar a los granulados en cantidades muy pequeñas y controladas, ya que si éstos se agregan en exceso, el flujo del granulado tiende a disminuir porque se aumentan las fuerzas de cohesión del material (Farmacotécnia I, 2004).

La forma de las partículas no se determinó en el presente trabajo, pero es otra variable crítica que afecta las características de flujo y el grado de empaquetamiento de las partículas, dado que las formas esféricas y ovaladas fluyen más fácilmente, mientras que las formas rugosas y fracturadas fluyen poco y las aciculares forman un enrejado que dificultan el flujo. Por esta razón, los granulados formados por partículas lisas o esféricas presentan ángulos de reposo muy bajos (Allaire & Parent, 2004). Por lo mencionado anteriormente se sugiere que esta variable sea tenida en cuenta en posteriores estudios.

Con los resultados obtenidos se puede sugerir que el granulado no tendrá problemas en el llenado de recipientes en un proceso industrial, dado que el ángulo de reposo fue inferior a 35°, mientras que por encima de este valor se

presentan problemas en el proceso porque el producto es ligeramente cohesivo y aún más si el ángulo de reposo es mayor de 45º (Quiroz, 2000).

6.3.1.8. Suspendibilidad

La determinación de la suspendibilidad de las partículas en un sistema heterodisperso es importante, puesto que permite establecer si éstas se encuentran bien distribuidas en la suspensión y por lo tanto si la concentración es homogénea en todo el volumen del producto reconstituido (Contreras, 2005).

Para el granulado evaluado en el presente estudio, en la parte superior de las probetas en donde se colocó el producto reconstituido, se obtuvieron para el lote 1 resultados de concentración celular de $5,7x10^9$, $1,4x10^9$, $1,4x10^9$, $1,3x10^9$, $1,0x10^9$, $1,1x10^9$ y $8,7x10^8$ células/mL, inmediatamente después de reconstituir el producto y pasados 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de reposo respectivamente (Figura 8 y Anexo 11). Para el lote 2 se obtuvo una concentración de $6,6x10^9$ células/mL en el tiempo cero, de $1,5x10^9$ células/mL a los 30 minutos de reposo, de $1,3x10^9$ células/mL a los 60 minutos, de $1,3x10^9$ células/mL a los 90 minutos, de $1,1x10^9$ células/mL a los 120 minutos, de $1,0x10^9$ células/mL a los 150 minutos y de $8,8x10^8$ células/mL a los 180 minutos de reposo (Figura 9 y Anexo 12).

En la zona media de la probeta, las concentraciones obtenidas con el producto del lote 1, después de 0, 30, 60, 90, 120, 150 y 180 minutos de reposo fueron de $5,7x10^9$, $1,8x10^9$, $2,3x10^9$, $1,8x10^9$, $1,8x10^9$, $1,9x10^9$ y $1,9x10^9$ células/mL respectivamente (Figura 8 y Anexo 11). Para el lote 2 las concentraciones fueron de $6,6x10^9$, $2,1x10^9$, $2,2x10^9$, $2,0x10^9$, $1,8x10^9$, $1,8x10^9$ y $1,8x10^9$ células/mL respectivamente en los mismo tiempos de reposo mencionados anteriormente (Figura 9 y Anexo 12).

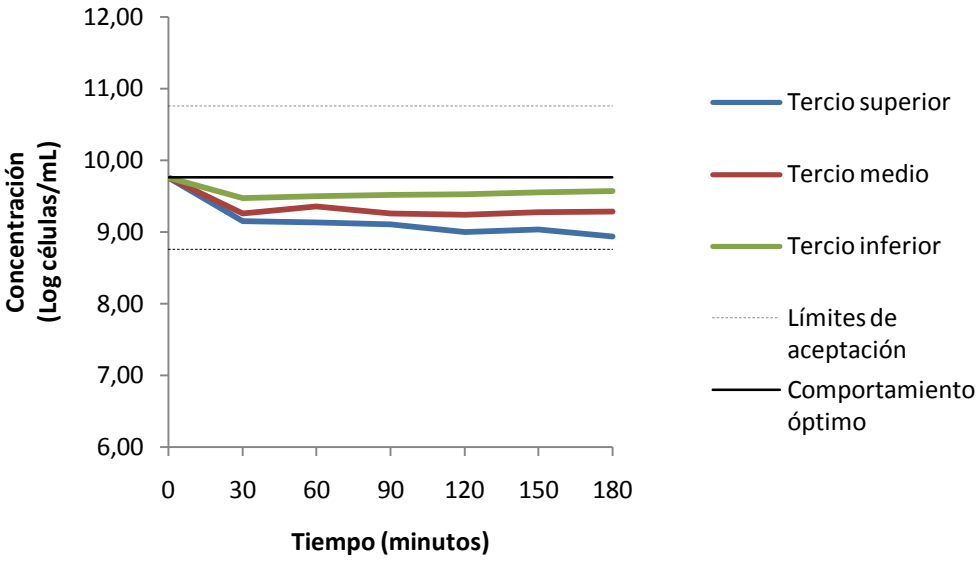

Figura 8. Comportamiento de la concentración de la levadura Lv027 en la suspensión obtenida al reconstituir el bioplaguicida del lote 1, durante 180 minutos de reposo.

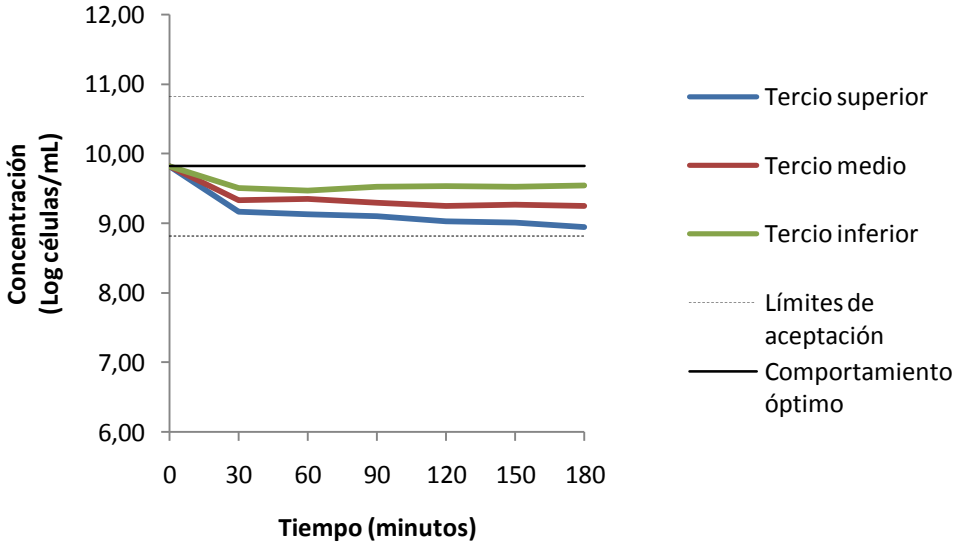

Figura 9. Comportamiento de la concentración de la levadura Lv027 en la suspensión obtenida al reconstituir el bioplaguicida del lote 2, durante 180 minutos de reposo.

En cuanto a la zona del tercio inferior, es decir el fondo de la probeta, para el lote 1 se determinaron concentraciones de $5,7x10^9$ células/mL en el tiempo cero, de $3,0x10^9$ células/mL a los 30 minutos de reposo, de $3,2x10^9$ células/mL a los 60 minutos, de $3,3x10^9$ células/mL a los 90 minutos, de $3,4x10^9$ células/mL a los 120 minutos, de $3,6x10^9$ células/mL a los 150 minutos y de $3,8x10^9$ células/mL a los 180 minutos de reposo (Figura 8 y Anexo 11) y en los mismos tiempos de evaluación concentraciones de $6,6x10^9$, $3,2x10^9$, $3,0x10^9$, $3,4x10^9$, $3,4x10^9$, $3,4x10^9$ y $3,5x10^9$ células/mL para el lote 2 del granulado (Figura 9 y Anexo 12).

Los resultados permiten concluir que a medida que aumenta el tiempo de reposo, disminuye la concentración celular en los tercios medio y superior y aumenta la del tercio inferior. Por tal razón, para establecer la suspendibilidad del producto, se calculó la variación que hubo entre la concentración celular inicial y la concentración final de cada tercio de la probeta, para así determinar si el granulado reconstituido en agua, mantiene o no una concentración homogénea en todo el recipiente (Biotécnica, 2003).

Los resultados de concentración celular que presentaron los dos lotes de granulado después de 3 horas de reposo (180 minutos), permiten concluir que el granulado cumple con el parámetro de calidad establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que indica que la concentración en las tres alturas puede variar máximo en una unidad exponencial con respecto a la concentración inicial (Tabla 5 y Anexo 13) (Biotécnica, 2003).

Estos resultados indican que la concentración de células en las diferentes alturas del volumen de reconstitución no varió de forma considerable después de tres horas de reposo del líquido, esta cualidad es muy importante en el momento de reconstituir y aplicar el producto porque se garantiza la

homogeneidad de la suspensión y por lo tanto, una concentración efectiva de células en todo el volumen de líquido y se evita el esfuerzo de una continua agitación en el tanque durante la aplicación (Higuera, 2003).

La estabilidad de la concentración celular en los tres tercios de la probeta podría ser atribuida a la viscosidad de la suspensión, teniendo en cuenta que la velocidad de sedimentación de las partículas disminuye cuando se incrementa la viscosidad del producto reconstituido. La viscosidad del medio pudo haber sido incrementada por el desintegrante empleado en la formulación, ya que algunos agentes desintegrantes además de facilitar la disolución del producto, generan un aumento en la viscosidad (Helman, 1982). Por dicha razón, la selección y adición adecuada de este agente juega un papel muy importante en la formulación de un bioproducto.

La importancia de la viscosidad de una suspensión para evitar la sedimentación fue observada por Contreras (2005), quien al evaluar la suspendibilidad de un preformulado a base de *P. onychis,* encontró que la viscosidad del producto reconstituido fue baja y se presentaron problemas en la suspendibilidad de la levadura, puesto que el principio activo migró hacia el fondo y se depositó allí debido a la baja viscosidad del sistema, ya que ésta no opuso resistencia a la caída de las partículas en suspensión.

La estabilidad y homogeneidad de la concentración de las partículas también podría ser atribuida a que algún auxiliar incluido en la formulación neutralizó las cargas existentes entre las partículas, creando fuerzas repulsivas que mantuvieron las partículas separadas y evitó la floculación de las mismas, ya que la alta sedimentación puede ser generada por la floculación, debido a las fuerzas atractivas que se crean entre los sólidos como consecuencia de la diferencia de cargas (Helman, 1982).

Finalmente, aunque la concentración celular se mantuvo homogénea en las tres alturas del volumen de producto reconstituido, se observó que en el tercio inferior de la probeta la concentración celular fue mayor con respecto al tercio medio y superior después de 3 horas de reposo y fue evidenciado por la formación de una capa de material que sedimentó en el fondo de las probetas por efecto de la gravedad. Sin embargo, este resultado no genera inconvenientes ya que el sedimento formado se dispersó fácilmente con una suave agitación, permitiendo mejorar aún más la excelente suspendibilidad del granulado y garantizar que en el momento de la aplicación se obtenga el mismo nivel de protección contra el patógeno en toda el área aplicada**.**

6.3.1.9. Tamaño de partícula

El tamaño y distribución de las partículas de un granulado es una propiedad física que permite establecer la frecuencia de los diversos tamaños de partículas encontrados en una formulación (Voight & Bornschein, 1982). Del tamaño y distribución de las partículas dependen en mayor o menor grado, algunas características como la velocidad de disolución, la uniformidad del contenido, el color, la textura y la estabilidad (Cohen, 1998).

Esta característica de la formulación debe determinarse, optimizarse, monitorearse y controlarse, sobre todo en los primeros estudios de preformulación, en los que se toman decisiones con respecto a la forma apropiada del gránulo (Gennaro, 1995).

El método de retención por tamices es uno de los métodos más sencillos para medir el tamaño y la distribución de las partículas. Consiste en hacer pasar 100 g del material a través de una serie de tamices circulares cada uno de diferente tamaño de poro, organizados desde el más grande hasta el más pequeño de manera que uno encaje en el otro herméticamente para

minimizar la pérdida de polvo. Los tamices se someten a vibración constante durante 10 minutos de manera que el material pase por todos los tamices y que al final de la prueba, el material quede disperso en diversas fracciones entre los tamices y que no más del 5% del material quede retenido en el más grueso y no más del 5% pase por el más pequeño (Farmacotécnia I, 2004).

El tamaño de partícula como se mencionó anteriormente, influencia varias características como lo son la velocidad de disolución, ya que las partículas más pequeñas se disuelven mucho más rápido que las partículas grandes, debido a la gran área superficial que poseen. En las suspensiones el tamaño de partícula es muy importante porque influye en la estabilidad física, ya que las partículas de menor tamaño se asocian con un menor grado de sedimentación y las grandes decantan con mayor rapidez. Además, el flujo y las propiedades de empaque también son influidos por el tamaño de partícula, razón por la cual es necesario producir granulados con tamaños lo más uniformemente posible y no tan pequeños (Martín & Bustamante, 1993; Gennaro, 1995; Farmacotécnia I, 2004).

Para determinar la distribución del tamaño de partícula se realizó una distribución de frecuencias con los datos obtenidos con el método gravimétrico. Los resultados obtenidos indicaron que en cada lote de granulado el mayor porcentaje de peso retenido se presentó en el tamiz número 20, cuyo tamaño de poro es de 850 µm, con un 88,4% para el lote 1 y un 82,5% para el lote 2. El siguiente porcentaje de peso retenido se presentó en el tamiz número 35 (500 µm) con un 6,2% y un 14,0% para los lotes 1 y 2 respectivamente, seguidos de los porcentajes de peso en el tamiz número 400 (38 µm) con un 3,9% para el lote 1 y un 2,7% para el lote 2. El menor porcentaje de retención de producto se presentó en el tamiz número 10 (2mm) con un porcentaje del 0,9% y un 0,8% para los lotes 1 y 2 respectivamente y en el colector solamente se obtuvo un 0,6% de retención para el lote 1 y del 0,1% para el lote 2 (Figura 10 y Anexo 14).

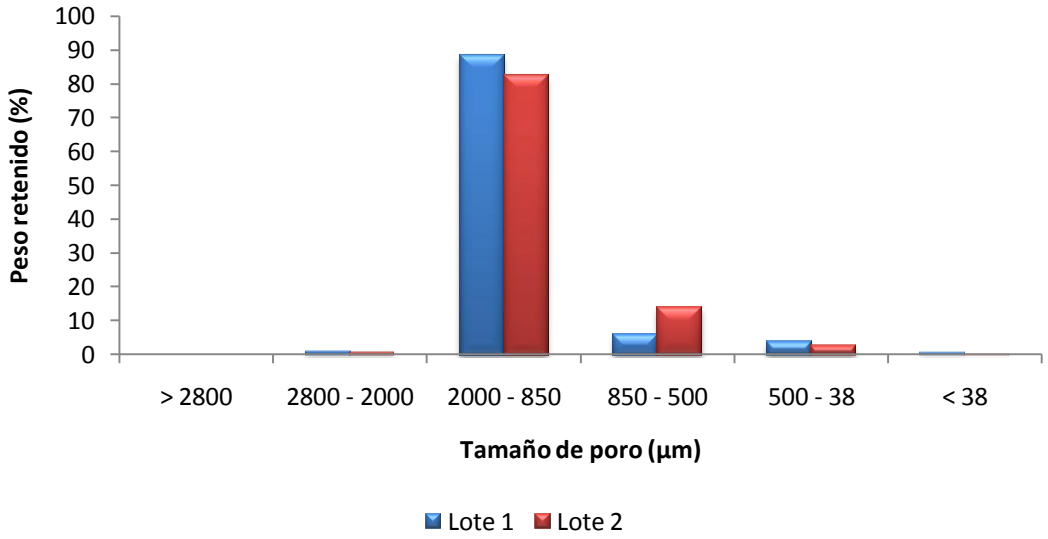

Figura 10. Distribución del tamaño de partícula para los lotes 1 y 2 del granulado a base de la levadura Lv027, determinada por el método gravimétrico.

Teniendo en cuenta que más del 80% del granulado quedó retenido en el tamiz numero 20, el cual presenta un tamaño de poro de 850 µm y que en el siguiente tamiz de forma ascendente, cuyo tamaño de poro era de 2000 µm no hubo retención de producto, es posible afirmar que el tamaño de partícula del granulado oscila entre 850 µm y 2000 µm y de esta forma se puede concluir que éste cumple con el parámetro de calidad establecido para esta característica por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, el cual recomienda que el 60% o más del producto, debe tener un tamaño que oscile entre 0,8 mm y 3 mm (Tabla 5) (Biotécnica, 2003).

Los resultados de tamaño y distribución de partícula obtenidos por el método gravimétrico pueden ser atribuidos a que se empleó la cantidad de líquido adecuada para humedecer la mezcla del principio activo y los auxiliares de formulación. Autores como Hegedús & Pintye-Hódi, (2007) afirman que el factor más influyente en la distribución del tamaño de partícula es la cantidad

de líquido empleada en la etapa de mezclado. A medida que aumenta la humedad de la mezcla, el tamaño del gránulo disminuye (Lin *et al.*, 2008), teniendo en cuenta la relación inversamente proporcional existente entre la humedad y el tamaño, es fundamental emplear la cantidad de líquido necesaria para lograr el tamaño de partícula establecido.

Otro factor al cual se puede atribuir el tamaño de partícula es el diámetro de los orificios de la malla empleada en el proceso de granulación, ya que los granulados por extrusión sobre un tamiz se preparan presionando la masa húmeda a través este, razón por la cual el tamaño de los gránulos es dependiente principalmente de la luz de la malla (Darr, 1981).

Un aspecto importante que cabe mencionar es que a pesar de que el proceso de granulación se realizó manualmente, se logró obtener homogeneidad en el tamaño, permitiendo sugerir que la granulación por extrusión fue eficiente, posiblemente por una adecuada textura de la masa a granular (Higuera, 2003).

6.3.1.10. Determinación del contenido de polvos finos

La determinación del tamaño de las partículas en un producto granulado tiene como propósito asegurar que la mayor proporción de éstas en una formulación se encuentren en un rango granulométrico adecuado, con el fin de minimizar la segregación o separación de las partículas durante el transporte y la manipulación, garantizando de esta manera un flujo uniforme en el equipo de aplicación (FAO/OMS, 2004).

Para esta característica el granulado en estudio presentó un porcentaje de material con tamaño de partícula inferior a 250 µm, del 3,8 ± 0,2% y del 2,3 ± 0,4% para los lotes 1 y 2 respectivamente (Tabla 5). Estos valores se

encuentran dentro del límite de aceptación establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que determina que el material no debe tener más de un 4% con tamaño inferior a 250 µm (Anexo 15) (Biotécnica, 2008).

Adicionalmente, cabe resaltar que de igual forma que en la determinación del tamaño de partícula, en esta prueba se confirmó que más del 80% del material quedó retenido en el tamiz número 20, con un 85,12% para el lote 1 y un 81,74% para el lote 2, confirmando que el tamaño de éste granulado es superior a 850 µm.

La determinación de partículas finas está directamente relacionada con la determinación de pérdidas en el proceso y con los efectos adversos que estas pueden causar en las personas que manipulan los productos. Los polvos finos representan un peligro inhalatorio debido al efecto abrasivo que tienen estas partículas, ya que pueden dañar el epitelio pulmonar, aunque el producto sea inocuo (Crippa *et al.,* 1997). Además, la exposición ocupacional a los polvos puede provocar síntomas alérgicos como el asma (Baur, 1998) e infecciones en las vías respiratorias o en el sistema digestivo (Wohlford *et al*., 1999; WOH, 2006), razones por las cuales los elementos de protección personal son de gran importancia en el uso de este tipo de productos; por ejemplo, las máscaras filtran las partículas y reducen la inhalación de las mismas cuando el operador está cercano a un nube de polvo generada por la manipulación del producto (WOH, 2006).

Con los resultados presentados anteriormente, se puede sugerir que el granulado no tendrá problemas de pérdidas del mismo durante el proceso de manufactura ya que cumple con el estándar de calidad para este parámetro y de igual forma tampoco generará efectos adversos en la salud de las

personas que manipulan el producto, no obstante, se recomienda el uso de los elementos de seguridad correspondientes.

Tabla 5. Características físico-químicas del granulado a base de la levadura Lv027. $\bar{X}$: Promedio, DE: Desviación estándar.

CARACTERÍSTICA		LOTE 1		LOTE 2		
		$\bar{x}$	DE	$\bar{x}$	DE	LÍMITE O RANGO DE ACEPTACIÓN
Voluminosidad (mL/g)		2,5	0,1	2,9	0,1	< 3 mL/g
Porosidad (%)		14,4	1,2	10,7	2,6	< 30 %
Fluidez Estática (Grados °)		33,5	1,0	31,8	0,4	< 45°
Humectabilidad (seg)		77,0	6,2	44,7	1,5	< 30s
Desintegración (min)		2,3	0,1	2,2	0,1	< 5 min
Humedad (%)		5,4	0,3	5,0	0,2	5 ± 1%
pH		6,0	0,1	5,6	0,3	5 a 7
Tamaño de partícula (% de peso 0.8-3 mm)		89,3	0,3	83,2	0,4	≥ 60%
Polvos finos (% de peso con tamaño inferior a 250µm)		3,8	0,2	2,3	0,4	< 4%
Suspendibilidad (variación de la concentración en unidades logarítmicas)	**Tercio superior**	0,8	0,1	0,9	01	< 1
	Tercio medio	0,5	0,1	0,6	0,1	< 1
	Tercio inferior	0,2	0,1	0,3	0,1	< 1

6.3.2. Caracterización microbiológica

6.3.2.1. Concentración

La determinación de la concentración del principio activo en el granulado se evaluó mediante la técnica de recuento en cámara de Neubauer y se expresó como células por gramo de producto.

El granulado presentó una concentración promedio de $1,1x10^{11}$ y de $1,2x10^{11}$ células/g para los lotes 1 y 2 respectivamente (Anexo 16), resultados que se encuentran por encima del valor de concentración mínima establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas-Biotécnica de CORPOICA, que determina que la concentración celular debe ser mayor a $1,0x10^{10}$ células/g de granulado (Biotécnica, 2003). Teniendo en cuenta que la concentración del granulado es 10 veces mayor que la establecida por Biotécnica, es posible sugerir que se diluya un poco la concentración celular de la levadura para hacer más eficiente el proceso de manufactura.

Estos resultados sugieren que el bioproducto tiene el contenido de células de levadura requerido para garantizarle al agricultor, que en el momento de la reconstitución y aplicación del granulado contará con la concentración mínima efectiva (10^7 células/mL) para que el producto ejerza el control eficiente del fitopatógeno.

6.3.2.2. Contenido de contaminantes

Con respecto al contenido de contaminantes, se sabe que todas las producciones microbianas tienen el riesgo de contaminarse y en las artesanales esto puede ocurrir con más frecuencia si no se cumplen las buenas prácticas de producción, debido al gran número de operaciones manuales requeridas. Las contaminaciones pueden conducir a una pérdida de la eficacia del ingrediente activo por un efecto de competencia con los microorganismos contaminantes, los cuales pueden tener un efecto inhibitorio, debido a la producción de metabolitos secundarios. Por tales razones, el reconocimiento y la cuantificación del grado de contaminación en un bioproducto, son importantes para asegurar la calidad e inocuidad del mismo (Jenkins & Grzywacz, 2000; Elósegui, 2006).

Un alto contenido de contaminantes en los bioproductos pueden afectar la estabilidad biológica y microbiológica del principio activo del bioplaguicida, porque durante el tiempo de almacenamiento los microorganismos contaminantes pueden producir mediante procesos de fermentación aeróbica o anaeróbica, metabolitos tóxicos que afectan la viabilidad del ingrediente activo (Burges, 1998).

El granulado a base de la levadura *P. onychis* Lv027, presentó un nivel de contaminantes de $7,6x10^3$ UFC/g para el lote 1 y de $4,6x10^3$ UFC/g para el lote 2 (Anexo 17), valores inferiores al nivel de contaminantes establecido por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que determina que el contenido de contaminantes, debe ser inferior a 10^6 UFC/g de granulado (Biotécnica, 2008).

El nivel de contaminantes presentes en el granulado cumplió con el estándar establecido de calidad, lo que sugiere que posiblemente la viabilidad del principio activo del bioplaguicida no se verá afectada durante la etapa de almacenamiento.

6.3.2.3. Viabilidad

La viabilidad de los dos lotes de granulado modificado se evaluó por medio de la técnica de recuento en placa, obteniéndose un promedio de $1,4x10^9$ UFC/g y de $1,3x10^9$ UFC/g para los lotes 1 y 2 respectivamente, valores que no cumplieron con la viabilidad mínima aceptada por el Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas - Biotécnica de CORPOICA, que determina que para asegurar la calidad del granulado a base de la levadura Lv027, la viabilidad debe ser mínimo de $1x10^{10}$ UFC/g (Biotécnica, 2003).

Resultados similares reportó Contreras (2005), quién obtuvo una viabilidad de $5,4x10^9$ UFC/g empleando la formulación original del granulado a base de la misma levadura empleada en este estudio. Teniendo en cuenta que ambos granulados (con formulación original y modificada) fueron sometidos al mismo proceso de secado (liofilización) durante 48 horas, es posible que la viabilidad haya sido afectada por el proceso de secado o por el largo tiempo empleado para el mismo. Aunque la liofilización le brinda estabilidad a las células de diferentes microorganismos durante el almacenamiento, cuando se emplea un adecuado protector de secado, puede afectar la viabilidad de los mismos por el efecto deletéreo de la congelación (Galindo *et al.*, 2008; Li & Tian, 2007).

Por ejemplo, Abadías *et al.* (2001) reportaron que a pesar de haber empleado agentes protectores como leche descremada en polvo, lactosa, fructosa, glucosa, sacarosa y/o varias combinaciones de ellos, además de diferentes medios de rehidratación, la viabilidad de las células liofilizadas de *Candida sake* fue significativamente afectada, por lo que los autores atribuyeron dicho efecto al proceso de secado empleado.

A pesar de que estos dos lotes de granulado no cumplieron con el valor mínimo de viabilidad establecido por Biotécnica, fueron empleados para evaluar la estabilidad de los mismos bajo condiciones de almacenamiento.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL GRANULADO MODIFICADO BAJO CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO

6.4.1. Estabilidad microbiológica

La formulación de microorganismos es una etapa fundamental para la producción de bioplaguicidas debido a que en ésta se mejora la eficacia, la estabilidad, la seguridad y se facilita la aplicación de los bioplaguicidas. El

mayor obstáculo en la comercialización de bioplaguicidas es el desarrollo de productos que permanezcan estables durante el almacenamiento, manteniendo la viabilidad y la actividad biocontroladora tal como las células frescas antes de ser formuladas (Abadías *et al.*, 2001), por ello es importante determinar la estabilidad microbiológica de los productos bajo condiciones de almacenamiento.

Dentro de los factores que afectan la viabilidad durante el almacenamiento se encuentran las características propias del principio activo, la interacción de éste con los excipientes, el proceso de fabricación, el sistema de envase o empaque y las condiciones ambientales utilizadas durante el transporte, almacenamiento, manipulación y el tiempo transcurrido entre su manufactura y uso (Gennaro, 1995).

Algunas de las condiciones de almacenamiento que afectan la estabilidad microbiológica del principio activo de un producto son la temperatura, la atmosfera, la luz, la humedad relativa y el empaque (Abadías *et al*., 2001).

El estudio de estabilidad realizado en el presente trabajo se efectuó utilizando como temperaturas de almacenamiento 8°C, 18°C y 28°C. Se elaboraron dos lotes de granulado que fueron almacenados en bolsas de polietileno selladas con vacío y sin vacío, para evaluar también, el efecto de la presencia de oxígeno en las mismas.

La evaluación de la estabilidad de la viabilidad se efectuó por medio de la técnica de recuento en placa en Agar Extracto de levadura – Extracto de malta (YM), realizando un muestreo mensual durante 3 meses de almacenamiento.

Los resultados de viabilidad obtenidos para cada tratamiento de cada lote en cada tiempo de evaluación (Anexos 18-21), fueron transformados determinando el logaritmo decimal de los mismos, para cumplir con los principios de normalidad y homogeneidad de varianzas y de esta forma poder analizarlos mediante pruebas de estadística paramétrica. Posteriormente fue necesario determinar si los dos lotes de cada tratamiento presentaban el mismo comportamiento, caso en el cual, es posible analizarlos de manera conjunta.

Para tal fin se realizó un análisis de comparación de modelos lineales, mediante tres pruebas de Fisher (95%), una para comparar modelos, otra para comparar pendientes y otra para comparar interceptos.

Para establecer la igualdad de tendencia entre lotes para cada tratamiento, se plantearon las siguientes hipótesis:

- Comparación de Modelos (M)

H_0: M Lote 1 = M Lote 2
H_1: M Lote 1 ≠ M Lote 2

- Comparación de Pendientes (P)

H_0: P Lote 1 = P Lote 2
H_1: P Lote 1 ≠ P Lote 2

- Comparación de Interceptos (I)

H_0: I Lote 1 = I Lote 2
H_1: I Lote 1 ≠ I Lote 2

Para demostrar dichas hipótesis para los tratamientos T1, T2, T3 y T4 correspondientes al granulado empacado al vacío, el granulado empacado sin vacío, la biomasa sin formular empacada con vacío y la biomasa sin formular empacada sin vacío respectivamente, inicialmente se calcularon los grados de libertad del numerador y del denominador para cada comparación, los cuales se presentan en el Anexo 22.

Posteriormente, con los resultados obtenidos para cada lote se calcularon los parámetros necesarios para estimar el valor de F para cada comparación, los cuales se presentan en los Anexos 23-26.

Finalmente, con los parámetros estimados y los grados de libertad se calculó el valor de F para cada tratamiento utilizando la siguiente ecuación.

$$F_{gln,gld} = \frac{[SCR_T - (SCR_{Lote\ 1} + SCR_{Lote\ 2})]/gln}{(SCR_{Lote\ 1} + SCR_{Lote\ 2})/gld}$$

En la Tabla 6 se presentan los resultados del valor de F calculado para los tratamientos T1, T2, T3 y T4, los cuales fueron comparados con los valores de F críticos correspondientes, según las tablas de la distribución de Fisher trabajando con una confiabilidad del 95% (Daniel, 2004).

Para todos los tratamientos se obtuvieron valores de F calculados inferiores a los valores de F críticos correspondientes para las tres comparaciones realizadas, lo que indica que estos valores se encuentran en la zona de aceptación de la distribución de Fisher y en consecuencia, se pueden aceptar todas las hipótesis nulas planteadas. Estos resultados permiten concluir que los dos lotes de cada tratamiento presentan igualdad de modelos, pendientes e interceptos, es decir, que existe igualdad de

tendencias entre ellos, por lo que pueden ser analizados de forma combinada.

Los resultados obtenidos en el análisis de comparación de modelos, pendientes e interceptos mediante la prueba de Fisher, permiten sugerir que el proceso de manufactura presenta repetibilidad entre lotes de producción. Esto garantiza que todos los lotes de granulado, tendrán un comportamiento similar bajo determinadas condiciones de almacenamiento, lo que permite estimar la vida útil del producto con una alta confiabilidad.

Tabla 6. Valores de F calculados y críticos para las hipótesis planteadas para el granulado empacado al vacío (T1), el granulado empacado sin vacío (T2), la biomasa sin formular empacada al vacío (T3) y la biomasa sin formular empacada sin vacío (T4) en el estudio de estabilidad microbiológica.

Tratamiento	Comparación	Temperatura de almacenamiento			F Crítico (95%)
		8°C	18°C	28°C	
T1	$F_{2,20}$ (modelos)	0,0015	0,0331	0,0263	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,0015	0,0081	0,0013	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,0265	0,0077	0,0013	4,325
T2	$F_{2,20}$ (modelos)	0,0286	0,0268	0,0339	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,0036	0,0018	0,0089	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,0034	0,0018	0,0085	4,325
T3	$F_{2,20}$ (modelos)	0,1411	0,1309	0,0792	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,1161	0,1059	0,0542	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,1106	0,1009	0,0516	4,325
T4	$F_{2,20}$ (modelos)	0,0992	0,1086	0,0935	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,0742	0,0836	0,0685	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,0706	0,0796	0,0652	4,325

Teniendo en cuenta que los dos lotes presentaron un comportamiento similar, se podría también sugerir que la biomasa producida en la fermentación y empleada para la elaboración del producto, también presenta características similares entre diferentes lotes de fermentación, sugiriendo que el proceso de producción masiva está estandarizado.

En la evaluación del comportamiento de la viabilidad de la levadura *P. onychis* formulada y sin formular, empacada con y sin vacío y almacenada a 8°C, se obtuvo que el tratamiento T1 correspondiente a la levadura formulada empacada al vacío presentó una viabilidad inicial de $1,4x10^9$ UFC/g y una viabilidad de $3,5x10^8$ UFC/g, $1,8x10^8$ UFC/g y $8,5x10^7$ UFC/g después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento respectivamente. Para el tratamiento T2, levadura formulada empacada sin vacío se obtuvieron viabilidades de $1,4x10^9$ UFC/g, $1,6x10^8$ UFC/g, $1,7x10^8$ UFC/g y $5,1x10^7$ UFC/g antes de iniciar el almacenamiento y después de 1, 2 y 3 meses respectivamente (Figura 11 y Anexo 27).

La levadura sin formular empacada al vacío correspondiente al tratamiento T3 presentó una viabilidad inicial de $4,8x10^{10}$ UFC/g, después del primer mes de almacenamiento la viabilidad fue de $8,0x10^9$ UFC/g, de $9,0x10^8$ UFC/g al segundo mes y finalmente una viabilidad de $7,7x10^8$ UFC/g al tercer mes de almacenamiento a 8°C. Para el tratamiento T4 (levadura sin formular empacada sin vacío) se obtuvieron viabilidades de $4,8x10^{10}$ UFC/g, $1,7x10^9$ UFC/g, $9,5x10^8$ UFC/g y $6,2x10^8$ UFC/g inmediatamente después de la manufactura y después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento a 8°C respectivamente (Figura 11 y Anexo 27).

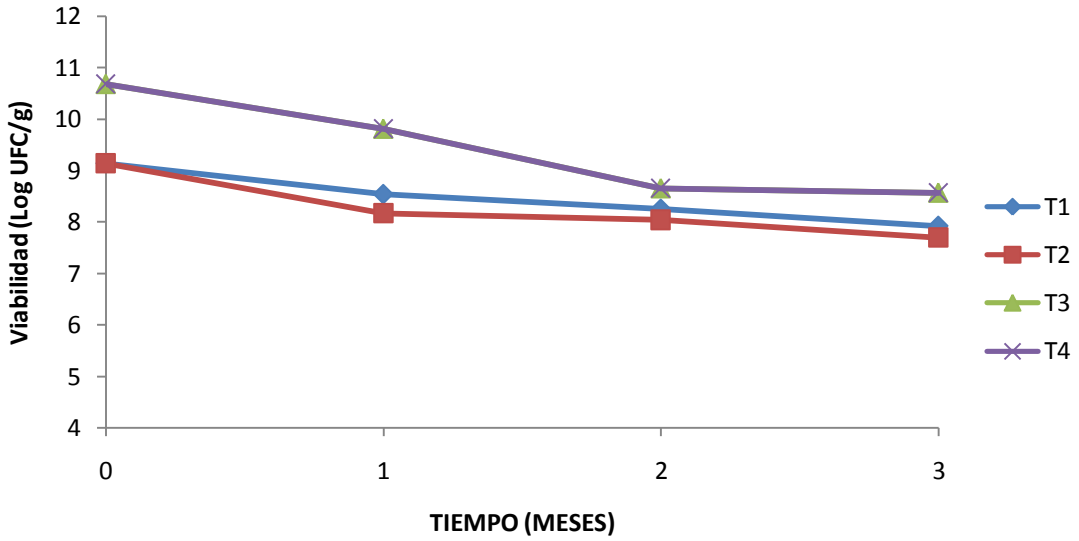

Figura 11. Comportamiento de la viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 8°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío.

Cuando el almacenamiento se realizó a 18°C, para el tratamiento T1 se observaron viabilidades de $1,4x10^9$ UFC/g, $5,9x10^7$ UFC/g, $5,2x10^7$ UFC/g y $2,1x10^7$ UFC/g antes de iniciar el almacenamiento y después de 1, 2 y 3 meses respectivamente. Para el tratamiento T2 se presentaron viabilidades de $1,4x10^9$ UFC/g, $4,8x10^7$ UFC/g, $5,4x10^7$ UFC/g y $1,7x10^7$ UFC/g antes y después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento. Para el tratamiento T3 se observaron viabilidades de $4,8x10^{10}$ UFC/g, $1,2x10^9$ UFC/g, $1,8x10^8$ UFC/g y $9,7x10^7$ UFC/g antes y después de cada mes de almacenamiento respectivamente y para el tratamiento T4, se obtuvieron viabilidades de $4,8x10^{10}$ UFC/g, $1,2x10^9$ UFC/g, $1,1x10^8$ UFC/g y $8,5x10^7$ UFC/g antes y después del primer, segundo y tercer mes de almacenamiento respectivamente (Figura 12 y Anexo 28).

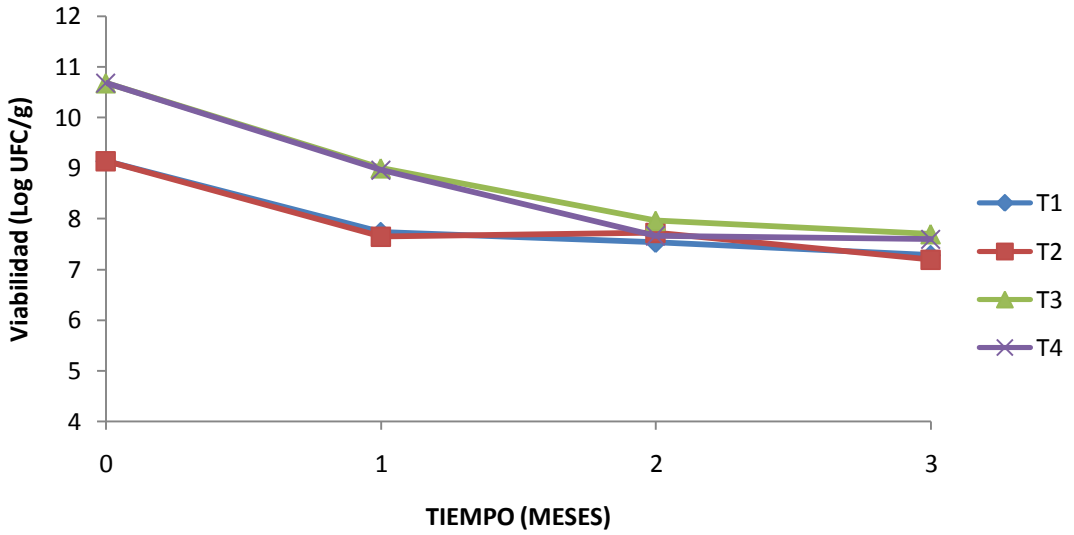

Figura 12. Comportamiento de la viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 18°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío.

Cuando el almacenamiento se realizó a 28°C, para el tratamiento T1 se obtuvieron viabilidades de $1{,}4x10^{9}$ UFC/g, $3{,}2x10^{7}$ UFC/g, $3{,}4x10^{5}$ UFC/g y $1{,}1x10^{5}$ UFC/g en los tiempo 0, 1, 2 y 3 meses de almacenamiento respectivamente. Para el tratamiento T2 se presentaron viabilidades de $1{,}4x10^{9}$ UFC/g antes de almacenar, de $2{,}3x10^{7}$ UFC/g después de un mes, de $3{,}4x10^{5}$ UFC/g después dos meses y de $4{,}2x10^{4}$ UFC/g después de tres meses de almacenamiento. Para el tratamiento T3 las viabilidades fueron $4{,}8x10^{10}$ UFC/g inmediatamente se elaboró el tratamiento y $1{,}5x10^{8}$ UFC/g, $1{,}4x10^{8}$ UFC/g y $7{,}3x10^{5}$ UFC/g después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento. Para el tratamiento T4 se obtuvieron viabilidades de $4{,}8x10^{10}$ UFC/g, $1{,}7x10^{8}$ UFC/g, $4{,}4x10^{6}$ UFC/g y $4{,}7x10^{5}$ UFC/g antes de almacenar y después de 1, 2 y 3 meses de almacenamiento respectivamente (Figura 13 y Anexo 29).

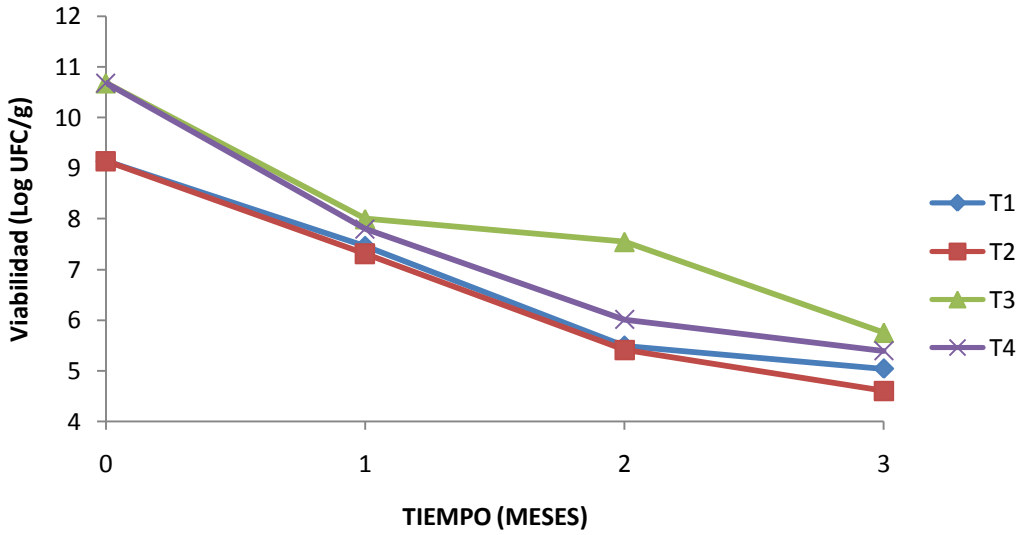

Figura 13. Comportamiento de la viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 28°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío.

Cuando los tratamientos fueron almacenados a las temperaturas de 8°C y 18°C, se observó una disminución marcada de la viabilidad durante el primer y segundo mes de almacenamiento y una mínima pérdida durante el tercer mes, lo que sugiere que a partir del segundo mes de almacenamiento, la viabilidad tendería a estabilizarse. Para confirmar este comportamiento se recomienda continuar con el estudio de almacenamiento durante un período mayor de tiempo.

A 28°C, para todos los tratamientos evaluados en este estudio se observó una disminución progresiva de la viabilidad a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento y no se observó el mismo comportamiento evidenciado a 8°C y 18°C, donde la viabilidad tendió a estabilizarse.

Durante los meses de evaluación de la estabilidad microbiológica se pudo determinar que la temperatura de almacenamiento tuvo un efecto negativo

sobre la viabilidad de la levadura, encontrándose las mayores pérdidas de viabilidad a 28°C y las menores a 8°C (Figura 14).

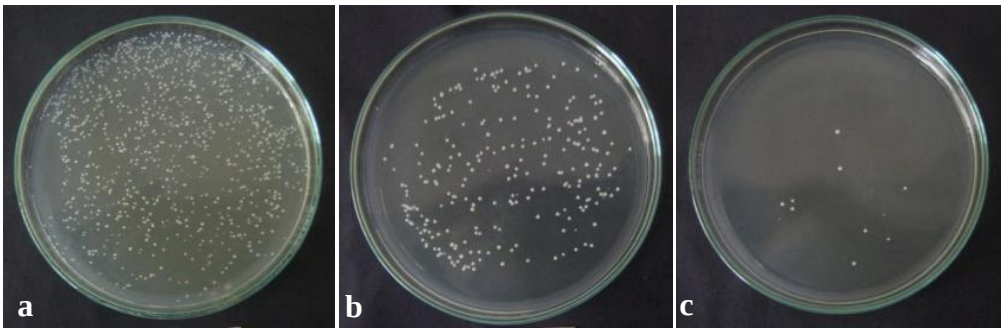

Figura 14. Viabilidad de la levadura Lv027 formulada después de tres meses de almacenamiento a las tres temperaturas evaluadas. a) 8°C, b) 18°C y c) 28°C.

Después de tres meses de almacenamiento, para todos los tratamientos se presentó una pérdida significativa de la viabilidad (Tukey 95%) a las tres temperaturas evaluadas (Figura 15).

Para el tratamiento T1 (granulado empacado al vacío), la pérdida total de viabilidad durante 3 meses de almacenamiento a temperatura de refrigeración (8°C) fue del 13,3%, seguida de una pérdida del 20,3% cuando fue almacenado a temperatura ambiente y obteniéndose la mayor pérdida de viabilidad a 28°C, con un 44,9%. Con respecto al tratamiento T2 correspondiente al granulado empacado sin vacío, se presentaron pérdidas de viabilidad del 15,8% cuando fue almacenado a 8°C, del 21,3% a 18°C y del 49,7% a 28°C. Para el tratamiento T3 (biomasa sin formular empacada al vacío) se obtuvieron pérdidas del 19,8%, del 27,9% y del 46,1% a 8°C, 18°C y 28°C respectivamente. En el tratamiento T4 (biomasa sin formular empacada sin vacío) se presentaron pérdidas del 20,8% a temperatura de refrigeración, del 28,9% a 18°C y del 49,5% a 28°C (Anexo 30).

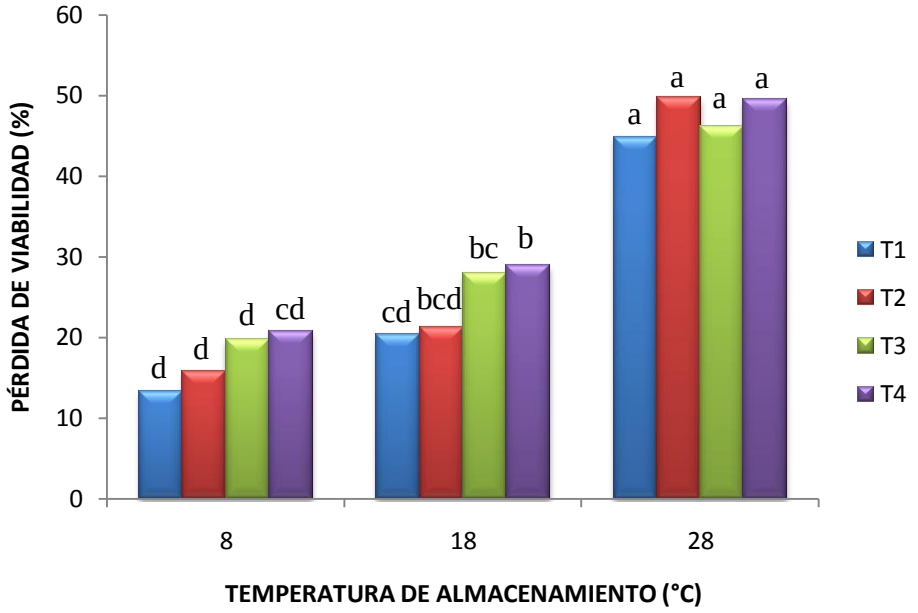

Figura 15. Pérdida de viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular empacada con vacío y sin vacío después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío. Viabilidad transformada mediante el cálculo de logaritmo decimal. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

El objetivo de este estudio fue determinar la estabilidad microbiológica del granulado y para ello se evaluó el comportamiento de la levadura Lv027 formulada y sin formular teniendo en cuenta las variables formulación, temperatura y atmósfera de empaque con y sin oxígeno.

La prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la pérdida de viabilidad expresada como unidades logarítmicas, obtenida para los tratamientos T1 y T3 correspondientes al granulado y la biomasa empacados al vacío cuando fueron almacenados a 8°C, 18°C y 28°C, y tampoco detectó diferencias entre los tratamientos T2 y T4 correspondientes al granulado y la biomasa empacados sin vacío y almacenados a las mismas temperaturas (Anexo 31).

A pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos mencionados anteriormente, si se observó que la pérdida de viabilidad (expresada como Log UFC/g) de los tratamientos T1 y T2 correspondientes a la levadura formulada como granulado fue numéricamente inferior comparada con la de los tratamientos T3 y T4 (levadura sin formular), lo que sugiere que la formulación le brindó un efecto protector a las células de la levadura.

Este resultado es de gran importancia ya que en estudios previos como el de Higuera (2003) y el de Contreras (2005), se evaluó la estabilidad de la viabilidad del granulado a base de la levadura *P. onychis* Lv027 sin optimizar, encontrándose mayores pérdidas de viabilidad en la células formuladas comparada con las células sin formular. Los autores atribuyeron este hecho a que posiblemente un auxiliar de formulación empleado en el granulado o la combinación de los mismos, podrían tener un efecto negativo sobre las células de la levadura; sugiriendo que se evaluara de nuevo la compatibilidad de estas sustancias con la levadura Lv027. Dicha evaluación se realizó en la primera etapa del presente trabajo y se encontró que un auxiliar codificado como Lb-01 posiblemente era el responsable del efecto negativo de la formulación sobre las células, por lo que se sugirió excluirlo de la misma. Con esta recomendación, el grupo de tecnología del Laboratorio de Control Biológico del CBB de CORPOICA, generó un nuevo prototipo de granulado que fue el empleado para el estudio de estabilidad realizado en este trabajo, donde se evaluó el comportamiento de la viabilidad de la levadura bajo condiciones de almacenamiento.

La formulación de microorganismos biocontroladores es un aspecto muy importante en el desarrollo de bioplaguicidas, ya que la estabilidad y la

eficacia de los mismos dependen de una correcta mezcla de excipientes (Kinay & Yildiz, 2008).

Los resultados obtenidos demuestran que las propiedades fisicoquímicas y la correcta combinación de los auxiliares de formulación empleados para elaborar el granulado a base de la levadura Lv027, estabilizaron al microorganismo durante el almacenamiento, dado que las células que fueron formuladas, presentaron una menor pérdida de viabilidad comparada con la observada para la biomasa sin formular. Este efecto posiblemente está relacionado con la inclusión de un protector de secado en la formulación, ya que los procesos de secado afectan drásticamente la estabilidad de la viabilidad de los microorganismos bajo condiciones de almacenamiento. El proceso de secado empleado en este estudio fue la liofilización, método que puede provocar problemas indeseables, debido al efecto de la congelación. El proceso de congelación puede causar el daño de la membrana celular y la denaturación del ADN, afectando la supervivencia de las células, por lo que los protectores exógenos juegan un papel importante en la conservación de la viabilidad durante y después del proceso de liofilización (Li & Tian, 2007).

Según Shabana (2003) algunas sustancias agregadas a una formulación pueden actuar como protectores de secado, azúcares como la sacarosa mejoran la germinación de esporas protegiendo al microorganismo durante el secado y extendiendo la supervivencia durante el almacenamiento, ya que este compuesto puede estabilizar la membrana celular reemplazando las moléculas de agua que pierde la bicapa lipídica y evitando su fusión durante el proceso de deshidratación.

Con respecto al efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de la levadura Lv027, el análisis estadístico (Tukey 95%) no detectó diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre la pérdida de viabilidad del

tratamiento T1 almacenado a 8°C y a 18°C (Anexo 31). Sin embargo, la pérdida de viabilidad de dicho tratamiento almacenado a 28°C fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que la obtenida cuando el almacenamiento se realizó a 8°C y a 18°C, sugiriendo que al aumentar la temperatura de almacenamiento a 28°C, disminuyó la estabilidad del granulado (Figura 15).

Para el tratamiento T2 se observó el mismo comportamiento, no encontrándose diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la pérdida de viabilidad cuando éste se almacenó a 8°C y a 18°C, pero siendo significativamente mayor ($P < 0,05$), la pérdida de viabilidad cuando el tratamiento se almacenó a 28°C (Figura 15).

Las pérdidas de viabilidad (Log UFC/g) obtenidas para los tratamientos T3 y T4 almacenados a cada una de las tres temperaturas evaluadas fueron estadísticamente diferentes entre sí, siendo significativamente menor ($P < 0,05$) la pérdida obtenida a la menor temperatura utilizada (Anexo 31).

Los resultados obtenidos permiten afirmar que a medida que incrementa la temperatura de almacenamiento, incrementa la pérdida de viabilidad en todos los tratamientos; es decir, que las altas temperatura tienen un efecto negativo sobre la viabilidad de las células. Costa *et al.* (2002) argumentan que cuando la temperatura de almacenamiento incrementa, la mortalidad de las células también lo hace y el tiempo de almacenamiento o vida útil es reducido. Teniendo en cuenta que las bajas temperaturas reducen la actividad metabólica manteniendo la viabilidad de las células, los autores concluyeron que existe una relación inversamente proporcional entre la temperatura y la estabilidad de un bioplaguicida bajo condiciones de almacenamiento.

Los resultados obtenidos sugieren que la levadura formulada y sin formular presenta un mejor comportamiento cuando es almacenada a temperatura de refrigeración (8°C), puesto que en esta temperatura se observaron las menores pérdidas de viabilidad después de 3 meses de almacenamiento. El almacenamiento bajo condiciones de refrigeración podría resultar conveniente puesto que esta condición estabiliza las células, debido a que las bajas temperaturas disminuyen el metabolismo celular y de esta forma se previene la producción de metabolitos tóxicos y se evita el agotamiento de nutrientes para así prolongar la vida del agente biocontrolador (Sabaratnam & Traquair, 2002).

El almacenamiento a 8°C para la levadura *P. onychis* Lv027 ha sido recomendado por otros autores como Gutiérrez (2001), Higuera (2003) y Contreras (2005) quienes evaluaron diferentes prototipos de bioplaguicida a base de este aislamiento, encontrando en todos los casos que las menores pérdidas de viabilidad se presentaron cuando los productos fueron almacenados bajo condiciones de refrigeración.

Con los resultados obtenidos en este estudio se corroboró que el almacenamiento del bioplaguicida a base de la levadura *P. onychis* a 8°C resulta ser la condición más adecuada, ya que se observó la mayor estabilidad de la viabilidad de la misma.

La mayor inestabilidad de la células de la levadura almacenada a 28°C posiblemente también está relacionada con que a mayor temperatura se presenta una mayor reactividad de las moléculas, pudiéndose generar reacciones químicas y procesos de degradación de los auxiliares de formulación, cuyos productos de reacción podrían ser tóxicos para las células, además a esta temperatura, el metabolismo celular podría permanecer activo causando que las células continúen consumiendo

nutrientes hasta acabar con éstos, acumulando metabolitos tóxicos y en consecuencia muriendo durante el tiempo de almacenamiento (Contreras, 2005).

Varios estudios confirman el efecto que tiene la temperatura sobre la viabilidad de los microorganismos en una formulación almacenada. En el estudio de Mariño *et al.* (2004) se determinó que la temperatura de almacenamiento tuvo un efecto determinante en la viabilidad de un producto granulado a base de *Metarhizium anisopliae,* ya que después de 6 meses de almacenamiento se presentaron pérdidas en todos los prototipos granulares, obteniéndose la mayor pérdida cuando el almacenamiento se realizó a 28°C, seguido de la pérdida a temperatura ambiente y la menor pérdida a 8°C. Los autores atribuyeron esta pérdida de viabilidad a que el metabolismo del microorganismo podría encontrarse más activo a una mayor temperatura de almacenamiento y esto junto con la baja humedad y la presencia de oxígeno podrían haber producido la muerte celular.

Shabana *et al.* (2003) concluyeron que para mantener la viabilidad de *Fusarium oxysporum* durante un tiempo prolongado de almacenamiento, es esencial almacenarlo a bajas temperaturas, ya que después de almacenar formulaciones a base de este microorganismo por un período de un año a 3°C y 25°C, se obtuvieron viabilidades finales del 93% y del 55% respectivamente; confirmando que cuando las formulaciones fueron almacenadas a bajas temperaturas se logró mayor estabilidad de la viabilidad de las células.

En otro trabajo, Costa *et al.* (2002) evaluaron la estabilidad de la viabilidad de *Pantoea agglomerans,* encontrando de igual forma que en otros estudios, que cuando el almacenamiento se realizó a 25°C se obtuvo una mayor

disminución de la viabilidad comparado con las muestras que fueron almacenadas a 4°C.

Otros estudios como el de Gutiérrez (2001) mostraron que la mayor estabilidad de una suspensión oleosa a base de la levadura *Pichia onychis,* mismo aislamiento empleado en el presente estudio, se obtuvo cuando ésta fue almacenada a una temperatura de 8°C con una pérdida de viabilidad del 7,8% y del 15,4% de las unidades logarítmicas, cuando fue almacenada por 5 meses a 18°C y 28°C respectivamente, concluyendo que la temperatura tuvo un efecto determinante en la estabilidad de esta levadura bajo condiciones de almacenamiento.

De igual forma Garzón (2002) también encontró que la temperatura influyó de una forma negativa sobre la viabilidad de conidios formulados y sin formular del hongo *Trichoderma koningii* cuando fueron almacenados a 8°C, temperatura ambiente y 28°C durante 6 meses, donde la mayor estabilidad de la viabilidad se encontró en las muestras que fueron almacenadas a 8°C.

Las altas pérdidas de viabilidad obtenidas a altas temperaturas de almacenamiento, han sido descritas por autores como Sabaratnam & Traquair (2002) quienes formularon *Streptomyces sp.* como un granulado y como un polvo mojable y determinaron su estabilidad en almacenamiento después de 6 meses, utilizando temperaturas de 4°C y de 24°C. De forma similar Abadías *et al.* (2003) evaluaron la estabilidad de la levadura *Candida sake* en formulaciones líquidas almacenadas a 4°C y 25°C y obtuvieron la mejor estabilidad en las células que fueron almacenadas a la menor temperatura.

Otras levaduras como *Metschnikowia pulcherrima y Pichia guilliermondii* también fueron evaluadas por Kinay & Yildiz (2008), quienes concluyeron

que al formular y almacenar estos microorganismos a 4°C, presentaron una mayor vida útil que cuando se almacenaron a 24°C.

Higuera (2003) evaluó la viabilidad de *P. onychis* Lv027 formulada como un granulado y observó una tendencia a la mayor pérdida de la viabilidad a medida que aumentó la temperatura de almacenamiento (8°C, 18°C y 28°C), la pérdida de viabilidad a temperatura de 8ºC para el producto granulado fue del 21,0%, seguida por la obtenida a 18ºC correspondiente al 37,2% y la mayor pérdida se presentó a 28ºC con un 62,42%.

Contreras (2005) también evaluó la estabilidad de la viabilidad de la levadura *P. onychis* en dos tipos de formulación un concentrado emulsionable y un granulado, encontrando nuevamente la mayor estabilidad cuando el almacenamiento se realizó a 8ºC, seguido por el almacenamiento a 18º C y por último a 28ºC, sugiriendo que los productos debían ser almacenados a temperaturas de refrigeración para aumentar su vida útil. El concentrado emulsionable presentó una pérdida de viabilidad (Log UFC/g) del 18,04% a 8ºC, del 18,71% a 18ºC y del 37,13% a 28ºC y el granulado presentó pérdidas de la viabilidad (Log UFC/g) del 20,29%, del 35,37% y del 46,3% a las mismas tres temperaturas respectivamente.

Con respecto al efecto de la atmósfera de empaque, la prueba de comparación de medias de Tukey (95%) no detectó diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre los tratamientos T1 y T2 almacenados a cada temperatura evaluada (Anexo 31). Sin embargo, se encontró una tendencia numérica a una menor pérdida de viabilidad para el tratamiento T1 (granulado empacado al vacío) con respecto al tratamiento T2 (granulado empacado sin vacío).

Este mismo comportamiento se observó para los tratamientos T3 y T4, dado que tampoco se detectaron diferencias estadísticas entre ellos cuando fueron

almacenados a cada temperatura, pero también se observó una tendencia numérica a una menor pérdida de viabilidad en el tratamiento T3 (biomasa empacada al vacío) con respecto a la obtenida para el tratamiento T4 (biomasa empacada sin vacío) (Anexo 31).

Los resultados obtenidos con respecto a la variable atmósfera de empaque (con y sin oxígeno), permiten sugerir que el almacenamiento en ausencia de oxígeno (al vacío) posiblemente aumenta la estabilidad de la viabilidad del agente biocontrolador, dado que los tratamientos correspondientes a la levadura formulada y sin formular empacados al vacío, presentaron menores pérdidas que las obtenidas cuando el empaque no se realizó utilizando vacío.

Abadías *et al.* (2001) concluyó que la presencia de aire en contacto con las células almacenadas es una posible causa de las pérdidas de viabilidad, siendo la composición de la atmosfera, otro factor importante a tener en cuenta en la estabilidad de los microorganismos cuando son empacados y sometidos a condiciones de almacenamiento. Por ejemplo, Wraight *et al*. (2001) describieron que el almacenamiento en atmósfera con nitrógeno y CO_2 mejoró la estabilidad de los conidios de *Metarhizium anisopliae* cuando fueron almacenados a 37°C.

Los tratamientos T1 y T3 evaluados en este estudio, fueron empacados en bolsas de polietileno utilizando un sellador al vacío que garantiza la remoción total del oxígeno del interior del empaque. Por el contrario, los tratamientos T2 y T4 fueron empacados en las mismas bolsas, pero se utilizó una selladora al calor que no removió el oxígeno contenido en el empaque, siendo éstos los que presentaron las mayores pérdidas de viabilidad. Dicho efecto posiblemente se debió a que el oxígeno contenido en las muestras pudo haber interactuado con los sistemas de membranas de las células, causando daños en la iniciación de la síntesis del ADN del microorganismo y

por lo tanto repercutiendo en su viabilidad (Abadías *et al*., 2001; Wraight *et al.*, 2001).

Al comparar la viabilidad inicial de cada tratamiento con la viabilidad después de tres meses de almacenamiento a cada temperatura evaluada, la prueba de comparación de medias de Tukey (95%) detectó diferencias significativas ($P < 0,05$) que sugieren que todos los tratamientos presentaron una pérdida significativa de la viabilidad durante los tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C (Figura 16 y Anexo 32). Este resultado indica que ninguno de los tratamientos fue totalmente estable bajo las condiciones de almacenamiento evaluadas. Sin embargo, es de esperarse que este tipo de productos cuyos principios activos son organismos vivos, pierdan viabilidad a través del tiempo, lo importante es que esta característica se mantenga dentro del límite de calidad establecido, para asegurar su eficacia cuando el bioplaguicida sea utilizado.

El efecto de la temperatura sobre la viabilidad puede ser evidenciado nuevamente en la Figura 5, donde se observa que la viabilidad final de cada tratamiento, disminuye a medida que aumenta la temperatura.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, el tratamiento que mostró la menor pérdida de viabilidad fue la levadura formulada (granulado) empacada al vacío y almacenada a 8°C, con una pérdida del 13,31%, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre la formulación, la menor temperatura de almacenamiento y la atmósfera de empaque al vacío, factores que pueden estabilizar al microorganismo y aumentar la vida útil del producto.

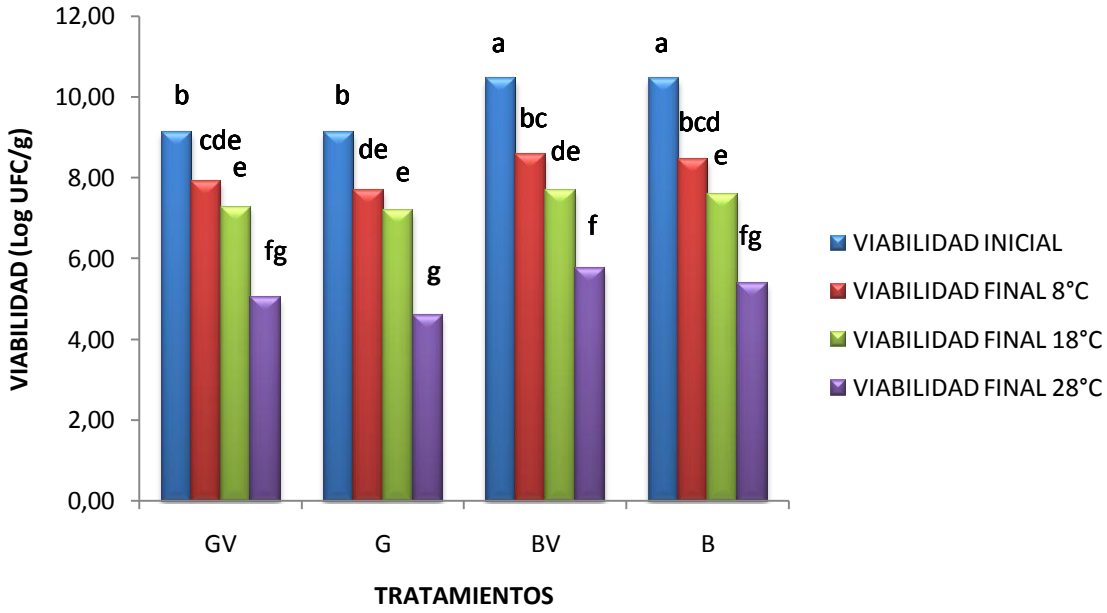

Figura 16. Viabilidad de la levadura Lv027 formulada y sin formular empacada con vacío y sin vacío, después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. GV: granulado empacado con vacío, G: granulado empacado sin vacío, BV: biomasa sin formular empacada con vacío y B: biomasa sin formular empada sin vacío. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Tukey (95%).

Además de la temperatura y la atmósfera de empaque, la viabilidad de los microorganismos también puede ser afectada por otro factor ambiental adicional, como lo es la actividad de agua (Aw), la cual no fue evaluada en este estudio. Este factor es de gran importancia ya que bajas Aw extienden el tiempo de supervivencia de los microorganismos y mantienen la viabilidad en comparación con las altas Aw. Honeycutt & Benson (2001) controlaron la atmosfera de almacenamiento de formulaciones a base de *Rhizoctonia solani* con soluciones saturadas de sal. En dicho trabajo los autores encontraron que un Aw de 0,12 y 0,33 mejoró la supervivencia del hongo en las formulaciones aproximadamente de 2 a 3 meses, comparadas con las obtenidas cuando se empleaban Aw de 0,53 y 0,73. Este resultado fue atribuido a que el hongo reconoce y responde a cambios de Aw con cambios en su metabolismo, bajas Aw pueden hacer que el microorganismo se

mantenga en bajos estados de actividad fisiológica extendiendo su supervivencia en la formulación.

La pérdida de viabilidad de un microorganismo formulado no solamente se puede ver afectada por las condiciones de almacenamiento, también por el proceso de rehidratación de las células y la solución empleada para el mismo, ya que el medio de rehidratación juega un papel importante en el restablecimiento de las células secas evitando el shock osmótico, daño y muerte de las mismas (Costa *et al.*, 2002). Reafirmando este hecho, Friesen *et al.* (2006) mencionan que la supervivencia de los microorganismos durante al almacenamiento se ve afectada por varios factores incluyendo dentro de éstos, el proceso de secado, las condiciones de almacenamiento y el proceso de rehidratación. Este factor tampoco fue evaluado en el presente trabajo, por lo que se recomienda ser tenido en cuenta en posteriores estudios.

En la mayoría de estudios de estabilidad de bioplaguicidas, las mejores condiciones de almacenamiento corresponden a bajas temperaturas (Costa *et al.*, 2002; Kinay & Yildiz, 2008), por lo que sería necesario que los comercializadores, e inclusive los agricultores, almacenaran estos bioproductos a temperatura de refrigeración. Sin embargo, atender esta recomendación incrementa considerablemente los costos en la etapa de distribución y venta y es una actividad de difícil adopción por los usuarios. Por tales razones, es importante destacar el resultado obtenido en el presente estudio, en el cual no se encontraron diferencias significativas entre la pérdida de viabilidad del granulado almacenado a 8°C y a 18°C, lo que sugiere que este tratamiento podría ser almacenado a temperatura ambiente, ya que la reducción de la viabilidad sería la misma que se presentaría si se utilizara refrigeración, pero los costos serían menores al eliminar el uso de la cadena de frío.

Finalmente se compararon los resultados obtenidos en el presente estudio empleando la formulación modificada del granulado empacado con y sin vacío, con los generados por Higuera (2003) y Contreras (2005) quienes evaluaron la formulación original empleando el secado por estufa y el secado por liofilización respectivamente (Tabla 7). La pérdida de viabilidad (UFC/g) del granulado almacenado a las tres temperaturas en todos los casos fue superior al 85%, resultados que permiten concluir que a pesar de todas las modificaciones que se han realizado a la formulación, no se ha logrado obtener un producto estable. Cabe resaltar, que la biomasa sin formular bajo las mismas condiciones, secada por estufa, liofilización y empacada con y sin vacío, también presentó una alta inestabilidad, lo que indica que la biomasa seca de la levadura Lv027 es naturalmente inestable, por lo que se sugiere considerar otro tipo de formulación y realizar estudios ecofisiológicos que permitan establecer las condiciones óptimas para este microorganismo y que contribuyan al desarrollo de un producto más estable.

Tabla 7. Comparación de los resultados de pérdida de viabilidad (UFC/g) del granulado y la biomasa sometidos a diferentes procesos de secado y empaque y almacenados durante tres meses a 8°C, 18°C y 28°C.

Temperatura	Biomasa				Granulado			
	Higuera (2003)	Contreras (2005)	Alarcón (2008)		Higuera (2003)	Contreras (2005)	Alarcón (2008)	
			Sin vacío	Con vacío			Sin vacío	Con vacío
8°C	20,63	79,15	98,71	98,40	85,43	95,74	96,25	93,78
18°C	80,63	89,57	99,82	99,80	99,20	98,75	98,75	98,48
28°C	97,61	98,87	100,00	100,00	99,85	98,33	100,00	99,99

6.4.2. Estabilidad de la actividad biocontroladora

La estabilidad de la actividad biocontroladora de los bioplaguicidas durante el almacenamiento, es un factor indispensable para que dichos productos puedan ser comercializados. Durante el almacenamiento, el principio activo de un bioplaguicida puede sufrir alteraciones por efecto del medio de cultivo utilizado para la producción masiva del microorganismo y por procesos como el congelamiento, el secado y la utilización de agentes protectores de secado (Abadías *et al.*, 2001). Además, el microorganismo también puede ser afectado por su interacción con los auxiliares de formulación y por las condiciones de almacenamiento que incluyen la temperatura, la exposición a la luz, la atmósfera, la humedad relativa e incluso el material y el tipo de envase que sea utilizado (Abadías *et al.*, 2001). Por lo mencionado anteriormente es importante que la actividad biocontroladora se mantenga durante el proceso de formulación, en el tiempo de almacenamiento y en el proceso de rehidratación (Melin *et al.*, 2007).

En el estudio de estabilidad realizado en el presente trabajo, en el que se utilizaron las temperaturas de almacenamiento 8°C, 18°C y 28°C y bolsas de polietileno selladas con vacío y sin vacío como sistemas de empaque, también se evaluó la actividad biocontroladora de la levadura *P. onychis* Lv027 formulada como granulado dispersable y sin formular a partir de dos lotes de producción. Para este fin se realizaron 4 bioensayos, a los 0, 1, 2 y 3 meses después del almacenamiento, empleando como patosistema modelo *Botrytis cinerea* – pétalos de rosa (*Rosa híbrida*) variedad Vendela.

La eficacia del bioplaguicida en la reducción de la incidencia de la enfermedad causada por *B. cinerea* al finalizar cada bioensayo, fue utilizada como indicador de la actividad biocontroladora. Teniendo en cuenta que al comparar los modelos lineales del comportamiento de los dos lotes de

producto mediante la prueba de Fisher (95%) estos no fueron significativamente diferentes entre sí, se utilizaron los datos combinados de las seis repeticiones o unidades experimentales correspondientes a los dos lotes de producto para realizar el análisis de los mismos (Tabla 8 y Anexos 33-41).

Tabla 8. Valores de F calculados y críticos para las hipótesis planteadas en relación con el comportamiento del granulado empacado al vacío (T1), el granulado empacado sin vacío (T2), la biomasa sin formular empacada al vacío (T3) y la biomasa sin formular empacada sin vacío (T4) en el estudio de estabilidad de la actividad biocontroladora.

Tratamiento	Comparación	Temperatura de almacenamiento (°C)			F Crítico (95%)
		8	18	28	
T1	$F_{2,20}$ (modelos)	0,0283	0,0420	0,0381	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,0033	0,0170	0,0131	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,0032	0,0162	0,0124	4,325
T2	$F_{2,20}$ (modelos)	0,0305	0,0260	0,0251	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,0055	0,0010	0,0001	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,0052	0,0009	0,0001	4,325
T3	$F_{2,20}$ (modelos)	0,0254	0,0256	0,0334	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,0004	0,0006	0,0084	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,0003	0,0006	0,0080	4,325
T4	$F_{2,20}$ (modelos)	0,0297	0,0264	0,0262	3,493
	$F_{1,20}$ (pendiente)	0,0047	0,0014	0,0012	4,351
	$F_{1,21}$ (interceptos)	0,0045	0,0013	0,0012	4,325

En el comportamiento de la eficacia de *P. onychis* después del almacenamiento a 8°C, se observó que cuando la levadura se formuló y se empacó al vacío (T1), la eficacia disminuyó moderadamente a través del tiempo de almacenamiento, siendo ésta del 80% antes de almacenar el producto y del 77%, 67% y 50%, después de 1, 2 y 3 meses de

almacenamiento respectivamente. Por el contrario, cuando la levadura formulada se empacó sin vacío (T2) la eficacia descendió drásticamente después de tres meses de almacenamiento llegando ésta al 33% (Figura 17 y Anexo 42).

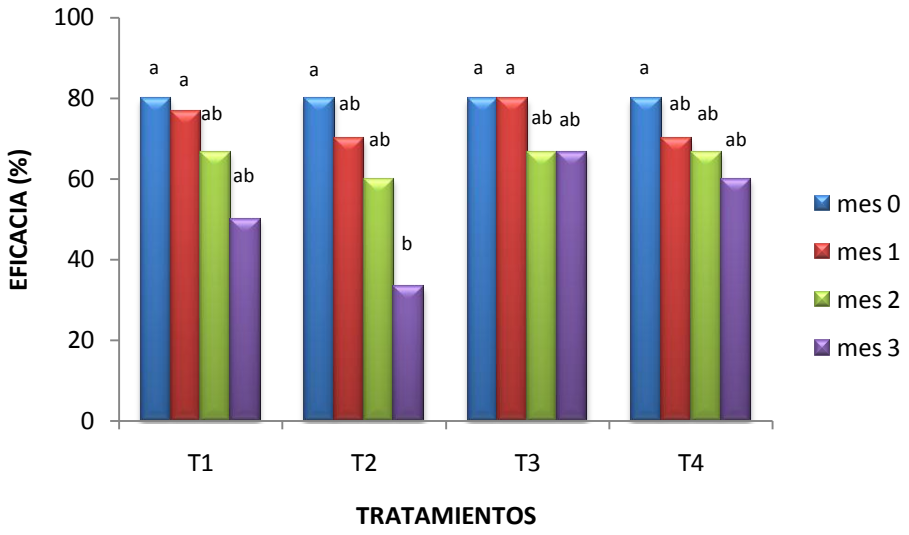

Figura 17. Actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 8°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis (95%).

Cuando la levadura *P. onychis* Lv027 no se formuló, su actividad biocontroladora se mantuvo un poco más estable en comparación con la levadura formulada, aunque no se presentaron diferencias significativas entre los dos tratamientos. Cuando la levadura sin formular se empacó al vacío (T3), la eficacia en el control de la infección por *B. cinerea* de la biomasa almacenada descendió del 80% hasta el 67% durante los tres meses de almacenamiento, mientras que la eficacia de la levadura sin formular

empacada sin vacío (T4) fue del 60% después de este mismo tiempo (Figura 17 y Anexo 42).

Los datos registrados en la evaluación de la actividad biocontroladora no presentaron homogeneidad de varianzas, por lo que fueron analizados con la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis (95%). Esta prueba no detectó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la eficacia inicial (antes del almacenamiento) y la eficacia final (después de tres meses de almacenamiento) para los tratamientos T1, T3 y T4, sugiriendo que la eficacia se mantuvo estable durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, la diferencia numérica de la eficacia obtenida en cada tiempo de evaluación, puede considerarse importante en términos de prevención de la infección causada por el fitopatógeno, lo cual resulta más relevante en el caso del tratamiento T2, donde la diferencia de la eficacia entre el tiempo tres y el tiempo cero fue significativa ($P < 0,05$), mostrando un efecto positivo del empaque al vacío en la estabilidad de la levadura formulada (Anexo 43).

Cuando el producto a base de la levadura *P. onychis* se almacenó a 18°C, se observó que la eficacia de control disminuyó considerablemente a medida que aumentó el tiempo de almacenamiento en comparación con el comportamiento observado a 8°C. A 18°C, la eficacia del tratamiento T1 disminuyó desde el 80% antes del almacenamiento, hasta el 40% después de 3 meses; mientras que la eficacia para el tratamiento T2 descendió notablemente hasta el 3%, después de almacenar la formulación sin vacío durante tres meses (Figura 18 y Anexo 44).

En el caso de la levadura sin formular almacenada a 18°C, no se presentó un descenso tan pronunciado como el observado para la levadura formulada. Cuando el principio activo se empacó al vacío (T3) la eficacia descendió

desde el 80% antes de iniciar el almacenamiento, hasta el 50% después de tres meses de almacenamiento, mientras que en el tratamiento T4 se observó una reducción de la eficacia del 80% al 33% después de tres meses de almacenamiento (Figura 18 y Anexo 44).

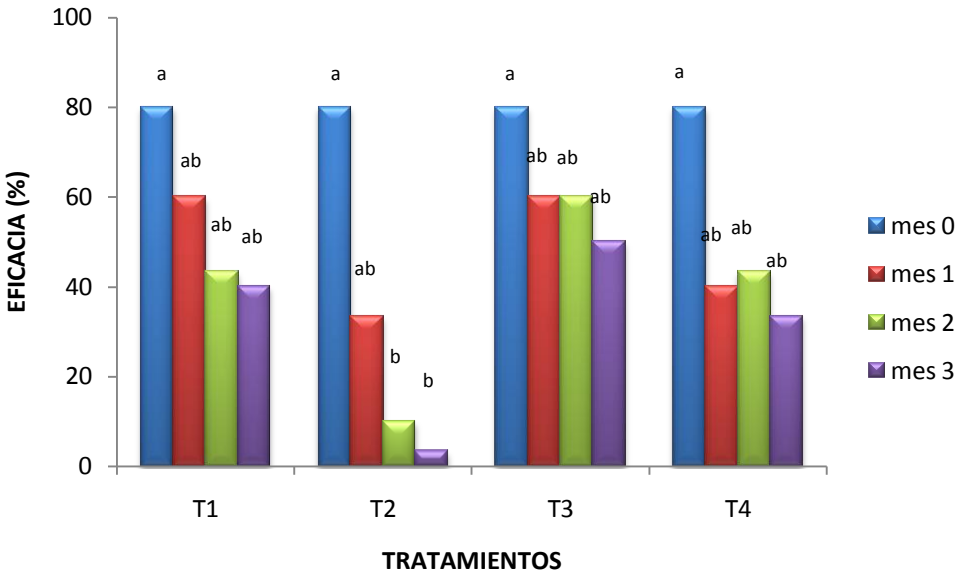

Figura 18. Actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 18°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis (95%).

Al igual que en el almacenamiento a 8°C, la prueba de comparación de medias de Kruskal Wallis (95%) no detectó diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la eficacia inicial y la eficacia final de los tratamientos T1, T3 y T4 almacenados a 18°C, pero si encontró diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la eficacia inicial y final del tratamiento T2, sugiriendo nuevamente la importancia que tiene el empaque al vacío sobre la estabilidad de la actividad biológica de la levadura formulada (Anexo 45).

Con el aumento de la temperatura de almacenamiento se observó un descenso en la actividad biocontroladora de la levadura *P. onychis* Lv027, ya

que cuando éste se realizó a 28°C, la eficacia disminuyó hasta el 27% después de 3 meses en el caso de la formulación empacada con vacío (T1). Cuando la formulación se empacó sin vacío (T2), la pérdida de eficacia de la levadura ocurrió más rápido, siendo ésta del 20% después de un mes y del 0% después de tres meses de almacenamiento (Figura 19 y Anexo 46).

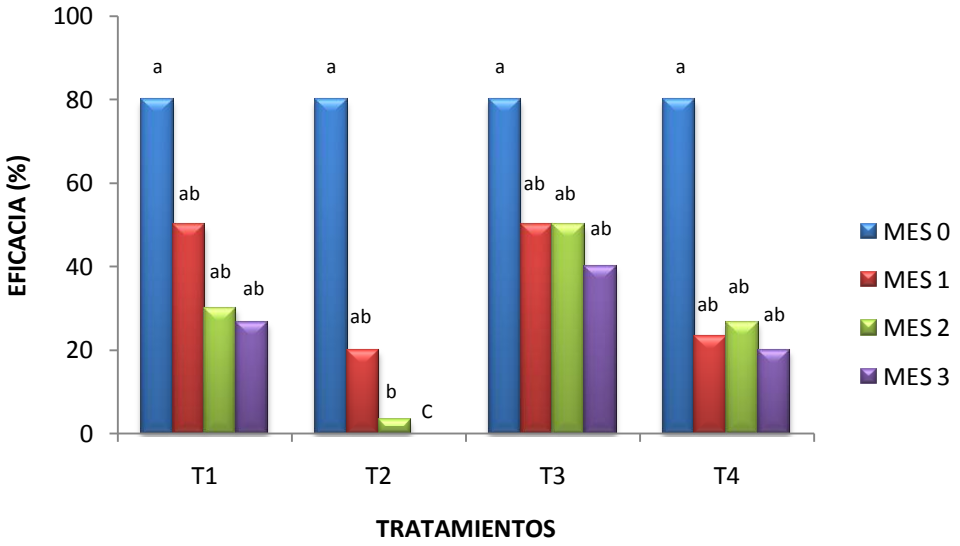

Figura 19. Actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular y almacenada durante tres meses a 28°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Kruscal Wallis (95%).

De forma contrastante, la levadura sin formular empacada al vacío (T3) presentó una eficacia final del 40% y la levadura sin formular empacada sin vacío (T4) del 20% después de 3 meses de almacenamiento (Figura 19 y Anexo 46).

La prueba Kruskal Wallis (95%) utilizada para analizar los resultados de la eficacia de los tratamientos almacenados a 28°C, mostró la misma tendencia que se observó cuando el almacenamiento se hizo a 8°C y 18°C, donde

tampoco se detectaron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre la eficacia inicial y la eficacia final de los tratamientos T1, T3 y T4 , pero si encontró una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre la eficacia inicial y final del tratamiento T2 (Anexo 47).

Con base en estos resultados se puede afirmar que la disminución de la actividad biocontroladora de la levadura sobre *B. cinerea*, fue mayor a medida que aumentó el tiempo y la temperatura de almacenamiento. Además, la eficacia también se vio negativamente afectada por el empaque en presencia de oxígeno (sin vacío) y de una forma leve con el proceso de formulación. Al respecto, Melin *et al.* (2006) afirmaron que el tiempo y la temperatura de almacenamiento afectan la viabilidad de los microorganismos y también la actividad biocontroladora, la cual es la propiedad más importante del principio activo en un producto biológico. De igual forma, Contreras (2005), evaluó la actividad biocontroladora de dos formulaciones a base de la levadura *P. onychis* Lv027 sobre *Rhizopus stolonifer* en frutos de tomate y señaló que la actividad biocontroladora de la levadura fue afectada por la temperatura y el tiempo de almacenamiento, así como por el tipo de formulación.

En términos de pérdida de eficacia al finalizar el período de almacenamiento (teniendo en cuenta que la eficacia inicial en todos los tratamientos fue del 80%), se observó que el tratamiento en el que la formulación se empacó sin vacío (T2), fue el que presentó los mayores valores de pérdida de eficacia en las tres temperaturas evaluadas. El tratamiento en el que el principio activo o biomasa sin formular se empacó con vacío (T3), presentó los menores valores de pérdida de eficacia en las tres temperaturas. En la figura 20 se puede observar también, que la pérdida de eficacia fue mayor cuando la temperatura de almacenamiento fue la más alta (28°C) para todos los tratamientos (Anexo 48).

La prueba estadística de Kruskal wallis (95%) no detectó diferencias significativas (*P* > 0,05) entre la pérdida de eficacia del granulado a base de la levadura Lv027 y la biomasa sin formular empacados al vacío (T1 y T3) para cada temperatura de almacenamiento (8°C, 18°C y 28°C). De igual forma tampoco se detectaron diferencias entre el granulado y la biomasa empacados sin vacío (T2 y T4) almacenados a las mismas temperaturas, sugiriendo estos resultados, que el proceso de formulación de la levadura, no afectó la estabilidad de la actividad biocontroladora de la misma (Anexo 49).

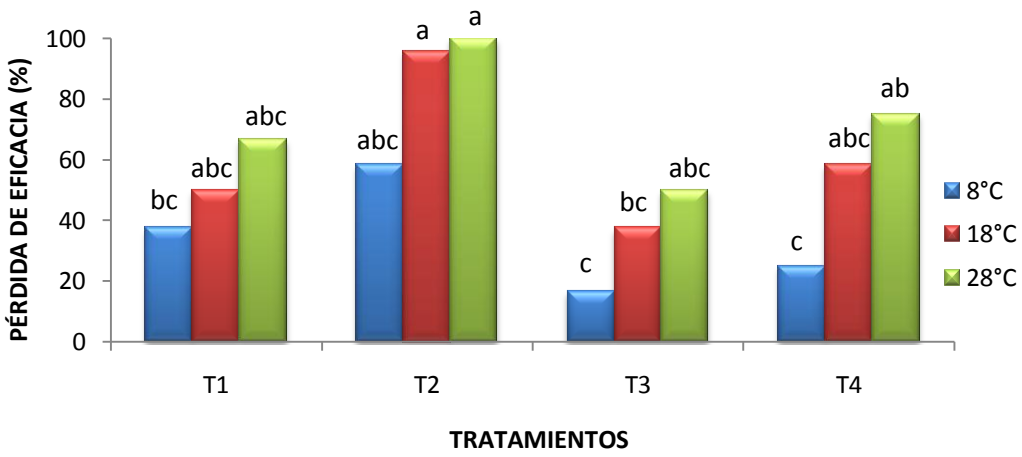

Figura 20. Pérdida de la eficacia de la actividad biocontroladora de la levadura Lv027 formulada y sin formular empacada con vacío y sin vacío después de tres meses de almacenamiento a 8°C, 18°C y 28°C. T1: Levadura formulada empacada con vacío, T2: Levadura formulada empacada sin vacío, T3: Levadura sin formular empacada con vacío y T4: Levadura sin formular empacada sin vacío. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas según la prueba de Kruskal Wallis (95%).

El mayor obstáculo en la comercialización de bioproductos es el desarrollo de una formulación estable, que mantenga la actividad biocontroladora similar a las células frescas del agente biocontrolador (Costa *et al.,* 2002). En el presente estudio la eficacia de las células frescas de la levadura *P. onychis* Lv027 fue del 80%, igual al valor de eficacia inicial obtenido con la levadura formulada, lo que sugiere que el proceso de formulación no afectó

la actividad biocontroladora; en este sentido se puede afirmar también que los auxiliares empleados en la formulación del granulado no afectaron negativamente la actividad biocontroladora ni la estabilidad microbiológica de la levadura, como se mostró anteriormente, ya que no se presentaron diferencias significativas entre la pérdida de viabilidad de la levadura formulada y sin formular.

Esta misma observación fue reportada por Contreras (2005), quien no detectó diferencias estadísticas entre los porcentajes de protección obtenidos con la levadura *P. onychis* formulada y sin formular, afirmando que la formulación no tuvo un efecto significativo sobre la actividad biocontroladora de la levadura almacenada.

Dado que algunas sustancias químicas (nutrientes o sales) adicionadas en las formulaciones pueden incrementar la eficacia de los agentes biocontroladores, se recomienda evaluar el efecto de control que puedan tener los auxiliares de formulación sobre el fitopatógeno. Al respecto Chiou & Wu (2003) observaron que algunos de los componentes de dos formulaciones a base de *Bacillus amyloliquefaciens* utilizadas para el control de *Botrytis cinerea,* como el cloruro de calcio y los adherentes presentes en el polvo mojable y los surfactantes de una emulsión, redujeron la germinación, la elongación del tubo germinal y la enfermedad causada por *B. cinerea.*

Con respecto al efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la estabilidad de la actividad biocontroladora de la levadura Lv027, la prueba de Kruskal Wallis (95%) no detectó diferencias estadísticas entre las pérdidas totales de eficacia de los tratamientos T1, T2 y T3 almacenados a 8°C, 18°C y 28°C, lo que indicaría que no hubo un efecto significativo de la temperatura sobre la estabilidad de la eficacia. Sin embargo se debe considerar que hay

una tendencia numérica que se repite para todos los tratamientos, correspondiente a una mayor pérdida de actividad durante los tres meses, a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento (Figura 20 y Anexo 49).

A pesar de que se observó una marcada disminución de la eficacia cuando aumentó la temperatura, el análisis estadístico no detectó diferencias significativas entre las pérdidas totales de eficacia obtenidas con los tratamientos T1, T2 y T3 en las tres temperaturas evaluadas, lo que pudo deberse a una alta variabilidad en los resultados de los bioensayos posiblemente porque para el montaje de cada bioensayo se emplearon diferentes lotes de pétalos de rosa, o debido a alguna variación en las condiciones ambientales o en las características del patógeno utilizado.

De forma consistente con lo obtenido en la evaluación de la estabilidad microbiológica, los resultados sugieren que las altas temperaturas tienen un efecto negativo sobre la actividad biocontroladora y por consiguiente el almacenamiento bajo condiciones de refrigeración resulta conveniente para la formulación granular a base de la levadura *P. onychis* Lv027. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que a temperaturas bajas ocurre una disminución del metabolismo celular, previniendo la producción de metabolitos tóxicos, evitando el agotamiento de nutrientes y prolongando la vida del agente biocontrolador (Sabaratnam & Traquair, 2002).

Con los resultados obtenidos en este estudio de estabilidad se puede sugerir que hay una relación entre la viabilidad de las células y la actividad biocontroladora para el patosistema empleado *B. cinerea* - pétalos de rosa variedad Vendela, sugiriendo que el posible mecanismo empleado por la levadura es competencia por nutrientes, dado que en la mayoría de los casos, las mayores pérdidas de eficacia fueron observadas en los

tratamientos que también presentaron las mayores pérdidas de viabilidad, comportamiento que indica que probablemente para que la levadura ejerza su actividad sobre el microorganismo fitopatógeno, es necesario que sus células estén viables. Esta posible relación, no fue observada en estudios previos como los de Higuera (2003) y Contreras (2005) ya que para el patosistema *R. stolonifer* - frutos de tomate era más importante la competencia por espacio.

En el estudio de Li & Tian (2007), el tratamiento en el que se aplicaron células de *Cryptococcus laurentii* almacenadas a 4°C, fue el que mostró mayor reducción de la incidencia de la enfermedad y del diámetro de lesión causados por *P. expansum* en frutos de manzana, mientras que el tratamiento que mostró mayor incidencia del patógeno, fue el que incluyó las células de la levadura almacenadas a 25°C, coincidiendo con lo encontrado en el presente estudio en relación con el efecto que tiene la temperatura de almacenamiento sobre la actividad biocontroladora de *P. onychis* Lv027.

La misma tendencia en los resultados de eficacia de la levadura *P. onychis* Lv027 fue descrita por Contreras (2005), quien encontró que la mayor eficacia después de 6 meses de almacenamiento se obtuvo cuando éste se realizó en condiciones de 8°C, mientras que una temperatura de 28°C disminuyó drásticamente la actividad biocontroladora.

La estabilidad de la actividad biocontroladora de la levadura *P. onychis* Lv027 almacenada a 8°C, también fue estudiada por Higuera (2003) al evaluar una formulación granular y la biomasa seca. El autor obtuvo porcentajes de protección del 77% y del 88% con dichos tratamientos respectivamente, después de seis meses de almacenamiento.

Otros estudios confirman el efecto que tiene la temperatura sobre la actividad biocontroladora, como el realizado por Melin *et al.* (2006) quienes evidenciaron que la actividad biocontroladora de *P. anomala* fue estable después de un prolongado tiempo de almacenamiento, cuando éste se realizó a 4°C. De igual forma Costa *et al.* (2002) evaluaron la eficacia de una formulación a base de *Pantoea agglomerans* contra *Penicillium digitatum* y encontraron que después de tres meses de almacenamiento a 4°C, la formulación redujo la incidencia en un 50%, siendo este valor similar al obtenido con las células frescas del microorganismo biocontrolador.

Con respecto al efecto de la atmósfera de empaque, la prueba Kruskal Wallis (95%) no detectó diferencias estadísticas ($P > 0,05$) entre los resultados obtenidos con el granulado empacado al vacío (T1) y el empacado sin vacío (T2), ni entre los obtenidos con la biomasa sin formular empacada con vacío (T3) y sin vacío (T4), cuando fueron almacenados en cada temperatura evaluada. Sin embargo, se observó una tendencia numérica a una menor pérdida de la eficacia para los tratamientos T1 y T3 con respecto a los tratamientos T2 y T4 (Figura 20 y Anexo 49), lo que permite sugerir que el almacenamiento en ausencia de oxígeno (al vacío) posiblemente aumenta la estabilidad de la actividad biocontroladora de la levadura en estudio.

Abadías *et al.* (2001) concluyó que la presencia de aire en contacto con las células almacenadas es una posible causa de pérdida de viabilidad. Al respecto, se ha explicado que el oxígeno contenido en las muestras almacenadas pudo haber interactuado con los sistemas de membranas de las células, causando daños en la iniciación de la síntesis del ADN del microorganismo y por lo tanto repercutiendo en su viabilidad (Abadías *et al*., 2001; Wraight *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta que la pérdida de viabilidad parece estar relacionada directamente con la pérdida de la actividad biocontroladora, cabe resaltar que en el presente estudio el empaque sin

vacío (con oxígeno) resultó ser menos eficiente en la conservación de esta característica, comparado con el empaque al vacío.

Autores como Costa *et al.* (2002) describieron un efecto positivo del vacío sobre la estabilidad de la actividad biocontroladora de *Pantoea agglomerans*, cuando fue almacenada durante tres meses a 4°C y empacada al vacío usando bolsas plásticas.

Otros factores que pueden intervenir en la estabilidad de la actividad biocontroladora además de los evaluados en este estudio, son el proceso de secado y el medio de cultivo empleado para la producción del microorganismo. El proceso de secado genera una pérdida excesiva de agua intracelular, en consecuencia causa una alteración en la concentración de solutos al interior de la célula, logrando inducir un cambio en el pH intracelular, el cual afectará durante el almacenamiento las enzimas claves en los ciclos de glucólisis y gluconeogénesis de la levadura y repercutiendo en la actividad fisiológica y biocontroladora de las células (Higuera, 2003).

El medio de cultivo empleado para la producción de la biomasa también juega un papel muy importante en la actividad biocontroladora de los microorganismos, puesto que los componentes del medio pueden inducir la activación de los sistemas enzimáticos relacionados con la actividad biocontroladora. Abadías *et al.* (2003) evaluaron el efecto de la modificación del Aw de un medio de cultivo a base de melaza utilizando glicerol y sorbitol, sobre la estabilidad de la actividad biocontroladora de la levadura *Candida sake* contra *Penicillium expansum* durante el almacenamiento y encontraron una alta estabilidad cuando la producción de la levadura se realizó en el medio modificado comparado, con el medio de cultivo sin la adición de estas sustancias.

Este efecto del medio de cultivo también fue comprobado por Higuera (2003) quien evaluó la actividad biocontroladora de la levadura *P. onychis* sobre *Rhizopus stolonifer,* y observó un mejor efecto con la levadura crecida en medio de cultivo YM cuya composición está basada en extracto de malta y extracto de levadura (fuentes de nitrógeno que pueden estimular la inducción de sistemas enzimáticos), en comparación con la levadura crecida en el medio de cultivo MLXOM, que presentó los menores resultados de protección; posiblemente por su elevado contenido de carbohidratos, que pueden ser un factor represor de los sistemas enzimáticos, puesto que puede ocurrir represión catabólica por el exceso de fuentes de carbono.

En el presente estudio se observó que la levadura sin formular presentó las mejores eficacias con respecto a la levadura formulada. Este efecto podría ser atribuido a un posible efecto de los auxiliares de formulación, los cuales posiblemente ocuparon la superficie del tejido vegetal, impidiendo la adherencia de la levadura y por consiguiente, interfiriendo uno de los principales mecanismos de acción de estas levaduras sobre *B. cinerea*, correspondiente a la competencia por espacio (Bautista, 2006).

La competencia por espacio y nutrientes son los principales modos de acción de la levaduras antagonistas, la competencia por espacio se lleva a cabo durante la multiplicación de las levaduras cuando ocurre la formación de una matriz que recubre las células dañadas del hospedero, funcionando como una capa protectora impidiendo el contacto del patógeno con las hojas o frutos de las plantas (Bautista, 2006).

El-Ghaout *et al.* (1998) reportaron la capacidad de *Candida saitoana* para adherirse a *Botrytis cinerea*, debido a que la levadura podría formar una matriz celular en la cual atrapaba los conidios del patógeno y suprimía la germinación. También observaron que las hifas del patógeno fueron

rodeadas por las células de la levadura, mientras que en ausencia de *C. saitoana* todos los conidios de *B. cinerea* germinaron y formaron un micelio denso. Probablemente uno de los mecanismos de acción ejercido por la levadura y tal vez el más importante, es la ocupación de los sitios de adhesión del patógeno. En este mismo estudio demostraron que *C. saitoana* tiene la capacidad de adherirse en las heridas en frutos de manzana sin causar ninguna lesión ni alteración en el fruto y restringiendo el espacio para la colonización de *B. cinerea.*

Finalmente, en este estudio se podría concluir que la mejor temperatura de almacenamiento fue la de 8°C, que junto con el empaque al vacío generaron una menor pérdida de actividad biocontroladora de las células de la levadura, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre estos factores, ya que dichas condiciones pueden estabilizar al microorganismo. Sin embargo, cabe resaltar que la prueba de Kruskal-Wallis no encontró diferencias significativas entre las temperaturas de 8°C y 18°C para los tratamientos sugiriendo de esta forma que el producto puede ser almacenado a temperatura ambiente en lugares frescos.

En el presente estudio se evidenció un efecto positivo de control por parte de la levadura *P. onychis* Lv027 formulada y sin formular, sobre el fitopatógeno *B. cinerea* en los pétalos de rosa (Figura 21), ya que en el tratamiento en el que no se aplicó el antagonista y sólo se inoculó *B. cinerea,* se observó el mayor porcentaje de incidencia de la enfermedad después de doce días de la inoculación, caso contrario a lo observado cuando los pétalos fueron tratados con la levadura, donde se encontró una menor incidencia de la enfermedad.

La levadura *P. onychis* Lv027 ha sido reportada por varios autores como agente biocontrolador de *R. stolonifer* en tomate (García, 2001; Higuera, 2003; Contreras, 2005), *Botrytis alli* en cebolla (Jiménez & Neisa, 1999) y

Altermaria alternata en postcosecha de tomate (Fuentes, 2001), sugiriendo que esta levadura tiene un alto potencial para tener actividad sobre varios hospederos y fitopatógenos.

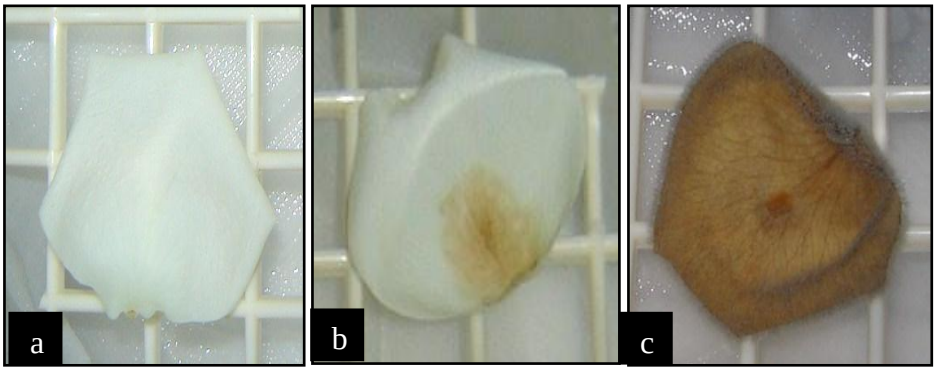

Figura 21. Enfermedad causada por *B. cinerea* en pétalos de rosa. a) Pétalo sano, b) Pétalo infectado con *B. cinerea* tratado con inóculo de levadura, c) Pétalo infectado con *B. cinerea* tratado sin inóculo de levadura.

Las levaduras saprofíticas se encuentran sobre la superficie de las hojas y los frutos de las plantas por la producción de polisacáridos como biosurfactantes y bioemulsificadores que facilitan la adhesión a las superficies (Karabulut & Baykal, 2004) y parecen competir efectivamente contra fitopatógenos con la producción de sustancias como sulfitos, etanol y proteínas killer entre otros mecanismos para actuar como ACB (agente de control biológico) (Benitez & Carrillo, 2004).

Autores como Druvefors *et al.* (2005) y Elmer & Reglinski (2006) afirman que las levaduras pueden tener varios mecanismos de biocontrol como la competencia por espacio o nutrientes, la producción de enzimas degradadoras de pared celular, toxinas killer, metabolitos antibióticos, micoparasitismo y estimulación en la respuesta de defensa del hospedero.

La rápida reproducción de las levaduras favorece la acción biocontroladora dejando por fuera de competencia a los microorganismos patógenos. La

competencia por espacio y nutrientes ha sido reportada como el mecanismo empleado por levaduras como *Rhodotorula glutinis* y *Cryptococcus laurentii* contra *B. cinerea* y de las levaduras *Pichia guilliermondii* y *Candida oleophila* contra el mismo fitopatógeno (Khaled & Sivasithamparam, 2006). Chanchaichaovivat *et al.* (2007) también reportaron que el mecanismo empleado por la levadura *P. guilliermondii* contra *Penicillium digitatum* y *B. cinerea* es la competencia por nutrientes.

Otro mecanismo de acción ejercido por las levaduras como se mencionó anteriormente, es la secreción de enzimas líticas tales como la endo y exo β-1,3 glucanasas y quitinasas. La producción de estas enzimas es de gran importancia para los agentes biocontroladores, puesto que están asociadas con el micoparasitismo y con la degradación de las hifas de los patógenos (Khaled & Sivasithamparam, 2006). Un estudio a nivel celular entre el antagonista *Candida saitoana* y el patógeno *Botrytis cinerea*, realizado por Bautista (2006) determinó que las células de la levadura se adhirieron a las hifas del patógeno causando hinchamiento y ruptura de la pared en la estructura de las hifas.

Autores como Grevesse *et al.* (2003) estudiaron la acción de enzimas sobre la degradación de las paredes celulares de *Botrytis cinerea,* encontrando que la enzima hidrolasa exo β-1,3 glucanasa producida por *Pichia anomala* causó un efecto inhibitorio de la elongación del tubo germinal y la germinación de los conidios de *B. cinerea,* generando cambios morfológicos en los tubos germinales e impidiendo su desarrollo.

Dado que las levaduras emplean diferentes mecanismos de acción contra los microorganismos fitopatógenos, sería de gran ayuda en posteriores estudios determinar cuál o cuáles son los mecanismos que emplea la levadura *P. onychis,* para de esta forma conocer si es necesario que las células estén

viables para que la actividad biocontroladora sea eficiente o si el biocontrol ejercido por la levadura es independiente de la viabilidad de las células de la misma. Sin embargo, un estudio aproximado al modo de acción que ejerce la levadura *P. onychis* Lv027 sobre *Rhizopus stolonifer* fue el realizado por García (2002), quien encontró que el principal mecanismo de acción de la levadura contra el patógeno fue la competencia por nutrientes, en la cual la levadura aprovechó más rápidamente que el patógeno, las fuentes nutricionales en sitios de herida en frutos de tomate. Teniendo en cuenta esta aproximación al mecanismo empleado por *P. onychis* y los resultados obtenidos en este estudio, es posible sugerir que para que la actividad biocontroladora sea efectiva, se requiere que las células de la levadura estén viables.

7. **CONCLUSIONES**

- El excipiente Lb-01 fue incompatible con la levadura Lv027, ya que afectó la viabilidad del microorganismo y fue eliminado de la formulación.

- La formulación modificada cumplió con los parámetros de calidad fisicoquímicos.

- La formulación modificada empacada al vacío presentó estabilidad de la actividad biocontroladora durante tres meses de almacenamiento a 8°C y 18°C.

- La formulación, el empaque al vacío y el almacenamiento a 8°C, fueron las condiciones que mejor estabilizaron la levadura Lv027.

- La formulación no afectó la estabilidad de la levadura Lv027 bajo condiciones de almacenamiento.

- La modificación de la formulación no mejoró la estabilidad del producto bajo condiciones de almacenamiento.

8. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios de ecofisiología de la levadura Lv027 con el fin de brindarle condiciones que permitan obtener un producto más estable.

- Aumentar el número de pétalos por unidad experimental utilizada para los bioensayos y realizar repeticiones en el tiempo de los mismos para aumentar la confiabilidad en el resultado.

- Evaluar procesos de secado alternativos para aumentar la estabilidad de la formulación a base de Lv027.

- Determinar el efecto del Aw del medio de producción de la levadura sobre su estabilidad.

- Considerar una nueva formulación para este microorganismo biocontrolador.

- Determinar los mecanismos de acción empleados por la levadura *P. onychis* como agente de biocontrol.

- Determinar la estabilidad de las características fisicoquímicas de la formulación durante el almacenamiento.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS, M.; TEIXIDÓ, N.; USALL, J.; BENABARRE, A.; VIÑAS, I. 2001. Viability, efficacy and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media. *Journal of Food Protection.* 64(6): 856-861.

ABADIAS, M.; USALL, J.; TEIXIDÓ, N.; VIÑAS, I. 2003. Liquid formulation of the postharvest biocontrol agent *Candida sake* cpa-1 in isotonic solutions. *Phytopathology*. 93: 436-442.

AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. Five Edition. Elservier Academic. Amsterdam. 183, 273, 419-423.

AGRO GREEN. [On Line]. http://www.Agrogreen.Co.Il/Shemer-Biofung.Asp [Consulta 22 Febrero 2008).

ALEXOPOULOS, C.; MIMS, C.; BLACKWELL, M. 1996. Introductory Mycology. Phylum Ascomycota- Order Saccharomycetales. Fourth Edition. John Willey & Sons. New York. USA. 192-200.

ALLAIRE, S.; PARENT, L. 2004. Physical Properties of Granular Organic-based Fertilisers, Part 1: Static Properties. *Biosystems Engineering*. 87 (1): 79–87.

ALLEN, L.; POPOVICH, N.; ANSEL, H. 2005. Ansel´s pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems. Octava edición. Lippincott Williams and Wilkins. 93-106.

ATLAS, R.; BARTHA, R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 115-123, 621-635.

AULTON, M. 2004. Farmacia. La ciencia del diseño de las formas farmaceúticas. Elservier. España. Segunda edición. 203-207.

BAUR, S. 1998. Characterized allergens causing bakers' asthma. *Allergy*. 53(6): 562-566.

BAUTISTA, S. 2006. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha.* 8(1): 1-6.

BENÍTEZ, M.; CARRILLO, L. 2004. Levaduras inhibidoras de *Penicillium. Revista Argentina de Microbiología*. 36: 182-186.

BENITO, E.; ARRANZ, M.; ESLAVA, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología.* 17: 43-46.

BIOTÉCNICA. LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO CORPOICA. 2007. Manual de procedimientos operativos estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas. Evaluación de la actividad biocontroladora de levaduras sobre *Botrytis cinerea*. Bogotá D.C., Colombia. 1-5.

BIOTÉCNICA. LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO CORPOICA. 2003. Manual de procedimientos operativos estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas. Análisis Físico-Químios De Bioplaguicidas Sólidos. Bogotá D.C., Colombia. 1-11.

BIOTÉCNICA. LABORATORIO DE CONTROL BIOLÓGICO CORPOICA. 2008. Manual de procedimientos operativos estándar del Laboratorio de Control de Calidad de Bioplaguicidas. Análisis Físico-Químios De Bioplaguicidas Sólidos. Bogotá D.C., Colombia. 1-9.

BOYLAND, J.; COOPER, J.; CHOWHAN, Z.; LUND, W.; WADE, A.; WEIR, R.; YATES, B. 1986. Handbook of Pharmaceutical Excipients. American Pharmaceutical Association and Pharmaceutical Society of Great Britain. Washington-London. 36-38, 173-175, 349-350.

BURGES, H. 1998. Formulation of microbial biopesticides: beneficial microorganisms, nematodes and seed treatments. Kluwer Academic Publishers. 21-27, 154-155, 187-200, 247-250.

CARRILLO, L. 2003. Microorganismos. En: Microbiología Agrícola. 1-20.

CENICAFÉ. 1997. Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. Centro Nacional de Investigaciones de Café. Chinchina, Caldas. Colombia. 1-31.

CHAN, Z.; TIAN, S. 2005. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action. *Postharvest Biology and Technology*. 36: 215–223.

CHANCHAICHAOVIVAT, A.; RUENWONGSA, P.; BHINYO PANIJPAN, B. 2007. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*). *Biological Control*. 42: 326–335.

CHIOU, A.; WU, W. 2003. Formulation of *Bacillus amyloliquefaciens* B190 for Control of Lily Grey Mould (*Botrytis elliptica). Journal of Phytopatgology*. 151: 13-18.

CID, E. 2008. Control de calidad biofarmacéutico de medicamentos: cinética de disolución farmacocinética biodisponibilidad. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. [On line]. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_quimicas_y_farmaceuticas/cide01/cap1/1-7-1.html. [Consulta: 17 Septiembre 2008].

COHEN, Y. 1998. Análisis químico farmacéutico de medicamentos. Primera Edición. Editorial Limusa. México. 1027-1032.

CONTRERAS, A. 2005. Evaluación de la estabilidad en almacenamiento de preformulados a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha de Tomate. Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia. 37-51, 71-155.

COPPING, L. 1998. The biopesticide manual. Second Edition. The British Crop Protection Council. Gran Bretaña. 51-52.

COSTA, E.; USALL, J.; TEIXIDO, N.; TORRES, R.; VIÑAS, I. 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* Strain Cpa-2. *Journal of Applied Microbiology.* 92: 873-878.

COTES, A. 2002. Control biológico de patógenos del suelo. En: XIII Congreso Ascolfi, Nuevas tendencias en fitopatología. Bogotá D. C., Colombia. 53-56.

CRIPPA, M.; PASOLINI, G. 1997. Allergic reactions due to glove lubricant powder in health care workers. *International Archives of Occupational Environmental Health*. 70(6): 399-402.

DANIEL, W. 2004. Bioestadística, Base para el análisis de las ciencias de la salud. Cuarta Edición. Editorial Limusa S.A. México. A43-49.

DARR, A. 1981. Tecnología Farmacéutica. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 87-289, 301-306.

DIAZ, A.; FLOREZ, J.; COTES, A. 2005. Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). Revista Colombiana de Biotecnología. 7: 51-58.

DRUVEFORS, U.; VOLKMAR, P.; SCHNÜRER, J. 2005. Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. *Applied and Environmental Microbiology.* 71(4): 1865-1868.

ELAD, Y.; RICHARD, E.; BÉLANGER, R.; KÖHL, J. 2000. Biological control of diseases in the phyllosphere. En: Primer curso taller internacional de control biológico. Corpoica. Bogotá D. C, Colombia. 66-78.

ELAD, Y.; WILLIAMSON, B.; TUDZYNSKI, P.; DELEN, N. 2004. *Botrytis*: biology, pathology and control. Kluwer Academic Publisher. Boston. London. 1-24, 283.

EL-GHAOUTH, A.; WILSON, C.; WISNIEWSKI, M. 1998. Ultrastructural and Citochemical Aspects of the Biological Control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in Apples Fruit. *Phytopathology*. 88: 282-291.

ELMER, P.; REGLINSKI, T. 2006. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology.* 55: 155–177.

ELÓSEGUI, O. 2006. Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas. *Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV).* Ciudad de La Habana, Cuba. 19-23.

ENGORMIX, 2008. Formulación de hongos entomopatógenos como control Biológico [On line].
http://www.engormix.com/formulacion_hongos_entomopatogenos_como_s_articulos_1315_AGR.htm. [Consulta: 26 febrero 2008].

EPA, 2008. Environmental Protection Agency. [On Line].
http://www.Epa.Gov/Pestic_ides/Biopesticides.Htm. [Consulta: 20 Febrero 2008].

FAO/OMS, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud. 2004. Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas. Primera edición. Roma. 38-45.

FARMACOTECNIA I. 2004. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Colombia. [On line].
http://docencia.udea.edu.co/qf/farmacotecnia. [Consulta: 20 Agosto 2008].

FREDLUND, E.; DRUVERFORS, U.; BOYSEN, M.; LINGSTEN, K.; SCHNÜRER, J. 2002. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Fems Yeast Research*. 2: 395-402.

FRIESEN, T.; HOLLOWAY, G.; HILL, G.; PUGSLEY, T. 2006. Effect of conditions and protectants on the survival of *Penicillium bilaiae* during storage. *Biocontrol Science and Technology.* 16(1): 89-98.

FUENTES, O. 2001. Selección de levaduras potencialmente biocontroladoras de *Alternaria alternata* en postcosecha de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de pregrado. Carrera de Ingeniería Agronómica. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 38-43.

GALÁN, L.; TÁMEZ, R. 1993. Estado actual y perspectivas de bioinsecticidas microbianos. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en B.t. México. 85-89.

GALINDO, E; SERRANO, L; CARRILLO, J; ALLENDE, R; GARCÍA, R; TRUJILLO, R; PATIÑO, M. 2008. Method for obtaining a solid composition with *Rhodotorula minuta*, which is effective for the biological control of anthracnose. Universidad Nacional Autónoma de México. [On line]. http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?WO=2008048081&IA=MX2006000108&DISPLAY=STATUS . [Consulta: 20 Noviembre 2008].

GARCÍA, P. 2001. Búsqueda de alternativas de control biológico de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha de tomate, mediante la utilización de levaduras. Tesis de Maestría. Master Scientae en Ciencias agropecuarias con énfasis en fitopatología. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 58-65.

GARCÍA, P. 2002. Uso de levaduras: una nueva alternativa de control biológico de fitopatógenos en postcosecha de frutas y hortalizas. En: XXIII Congreso Ascolfi, Nuevas tendencias en fitopatología. Bogotá D. C., Colombia. 57-62.

GARZÓN, C. 2002. Desarrollo y caracterización microbiológica y física de preformulados en polvo a base del hongo *Trichoderma koningii* para el control de fitopatógenos. Tesis De Pregrado. Carrera De Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C., Colombia. 40-43, 60-68.

GENNARO, A. 1995. Remington: The science and practice o pharmacy. Nineteen Edition. Vol I. Stability of pharmaceutical products. Mack Publishing Company. 639-647.

GÓMEZ, M.; VILLAMIZAR, L. 2000. Formulación de bioplaguicidas. En: Primer curso taller internacional de control biológico. Corpoica. Bogotá D.C. Colombia. 108-112.

GREVESSE, C.; LEPOIVRE, P.; JIJAKLI, M. 2003. Characterization of the exoglucanase-encoding gene *PaEXG* and study of its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala* Strain K. *Phytopathology.* 93 (9):1145-1152.

GUTIÉRREZ, C. 2001. Control de calidad de un preformulado a base de levaduras para el control de la pudrición blanca del tomate en postcosecha. Tesis De Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Colombia. 24-30.

HANNA INSTRUMENTS. 2004. Buenas Prácticas de Laboratorio en Mediciones de pH y Conductividad. [On line].
www.hannachile.com/articulos/22/conceptos-ph.htm [consulta 23 febrero 2008].

HEGEDÚS, A.; PINTYE-HÓDI, K. 2007. Influence of the type of the high-shear granulator on the physico-chemical properties of granules. *Chemical Engineering and Processing*. 46: 1012–1019.

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

HERTING, M.; KLEINEBUDDE, P. 2007. Roll compaction/dry granulation: Effect of raw material particle size on granule and tablet properties. *International Journal of Pharmaceutics.* 338: 110–118.

HIGUERA, N. 2003. Caracterización y determinación de la estabilidad biocontroladora de un bioplaguicida a base de la levadura *Pichia onychis* para el control de *Rhizopus stolonifer* en la postcosecha del tomate. Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Colombia. 48-60, 85-133.

HONEYCUTT, E.; BENSON, D. 2001. Formulation of binucleate *Rhizoctonia* spp. And biocontrol of *Rhizoctonia solani* on impatiens. *Plant Disease*. 85(12): 1241-1248.

JACKSON, M.; ERHAN, S.; POPRAWSKI, T. 2006. Influence of formulation additives on the desiccation tolerance and storage stability of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus* (Deuteromycotina: Hyphomycetes). *Biocontrol Science and Technology.* 16(1): 61-/75.

JENKINS, N.; GRZYWACZ, D. 2000. Quality control of fungal and viral biocontrol agents- Assurance of product performance. *Biocontrol Science and Technology.* 10: 753-777.

JIMÉNEZ, F.; NEISA, L. 1999. Evaluación de la actividad antagónica de levaduras en el control de la podredumbre gris del cuello de la cebolla de bulbo producida por *Botrytis alli* en postcosecha. Tesis de pregrado. Facultad de Agronomía. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Boyacá. Tunja. Colombia. 68-70.

KARABULUT, O.; BAYKAL, N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection* 23: 431–435.

KELBER, S. 2007. Effervescent rehydrating beverage tablet/granules. [On line]
http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?IA=US2006035531&DISPLAY=STATUS
[Consulta: 3 septiembre 2008].

KHALED, A.; SIVASITHAMPARAM, K. 2006. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*. 47: 25–35.

KINAY, P.; YILDIZ, M. 2008. The shelf life and effectiveness of granular formulations of *Metschnikowia pulcherrima* and *Pichia guilliermondii* yeast isolates that control postharvest decay of citrus fruit. *Biological Control* 45: 433–440.

KURTZMAN, C.; FELL, J. 1999. The yeast, a taxonomic study. Fourth Edition. Editorial Elservier. Amsterdam. 21-24, 77, 112, 273, 330-332.

LAWRIE, J.; DOWN, J.M.; GREAVES, M.P. 2001. Effects of storage on viability and efficacy of granular formulations of the microbial herbicides *Alternaria alternata* and *Trematophoma lignicola. Biocontrol Science and Technology.* 11: 283-295.

LI, B.; TIAN, S. 2007. Effect of intracellular trehalose in *Cryptococcus laurentii* and exogenous lyoprotectants on its viability and biocontrol efficacy on *Penicillium expansum* in apple fruit. *Applied Microbiology.* 44: 437–442.

LIN, H.; HO, H.; CHEN, C.; YEH, T.; SHEU, M. 2008. Process and formulation characterizations of the thermal adhesion granulation (TAG) process for improving granular properties. *International Journal of Pharmaceutics*. 357: 206–212.

LLÁCER, G.; LÓPEZ, M.; TRAPERO, A.; BELLO, A. 2000. Patología Vegetal. Tomo II. Sociedad Española de Fitopatología. M. V. Phytoma-España S. L. 885-893.

MADIGAN, M.; MARTINKO, J.; PARKER, J. 2001. Brock, Biología de los microorganismos. Octava Edición. Editorial Prentice Hall. España. 776- 777.

MARIÑO, M. 2001. Caracterización y evaluación de la estabilidad biocontroladora y microbiológica de preformulados granulados a base del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* para el control de la chiza *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Melolonthidae). Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Colombia. 96-98.

MARIÑO, P.; VILLAMIZAR, L.; ESPINEL, C.; COTES, A. 2004. Caracterización de prototipos de bioplaguicidas granulados a base de *Metarhizium anisopliae* para el control de *Ancognatha scarabaeoides* (Coleoptera: Melolonthidae). *Revista Colombiana de Entomología.* 30(1): 43-49.

MARTÍN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. 1993. Physical Pharmacy. Fourth Edition. Lea & Febiger Philadelphia, London. 442-455.

MARTIN, A.; SINKO, P. 2005. Physical and pharmaceutical sciences. Quinta Edición. Editorial Lippinocott Williams and Wilkins. 437-448.

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

MELIN, P.; HAKANSSON, S.; SCHNÜRER, J. 2007. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Applied Microbiology Biotechnology.* 73:1008–1016.

MEMBRE, J.; KUBACZKA, M.; CHENE, C. 1999. Combined Effects of pH and Sugar on Growth Rate of *Zygosaccharomyces rouxii*, a Bakery Product Spoilage Yeast. *Applied and Environmental Microbiology,* 65(11): 4921–4925.

MORENO, C. 2003. Control biológico de enfermedades foliares del cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* mill.) con énfasis en mildeo polvoso (*Oidium* Sp.).Tesis de Pregrado. Carrera de Ingeniería Agrónoma. Facultad

de Agronomía. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. Colombia. 49-51.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. [On Line]. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.Cgi. [Consulta 15 Febrero 2008].

NEELAKANTAM, V.; POWER, R. 2005. Relationship between pH and medium Dissolved Solids in Terms of Growth and Metabolism of Lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during Ethanol Production. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(5): 2239–2243.

QUIROZ, J. 2000. Tecnología farmacéutica III: Panorama general de las formas farmacéuticas sólidas. Facultad de ciencias químicas. Benemerita Universidad Autónoma de Puebla. [On line] http://www.geocities.com/tecno_farma/comprim__idos2.htm. [Consulta: 21 Septiembre 2008].

RAMACHANDRAN, R.; POON, J.; SANDERS, C.; GLASER, T.; IMMANUEL, C.; DOYLE, F.; LITSTER, J.; STEPANEK, F.; WANG, F.; CAMERON I. 2008. Experimental studies on distributions of granule size, binder content and porosity in batch drum granulation: Inferences on process modelling requirements and process sensitivities. *Powder Technology*. doi:10.1016/j.powtec.2008.04.013.

RAMÍREZ, C. 1982. Seminario control de malezas en praderas: formulación de herbicidas. ICA. Bogotá D.C. Colombia. 38-44.

RAWE, R.; SHESKEY, P.; OWEN S. 2006. Handbook of Pharmaceutical Excipients. Fifth Edition. Pharmaceutical press and American Pharmacist association. Gran Bretaña. 45-48, 67-68, 92-94.

RODRÍGUEZ, D.; ESPITIA, M.; CAICEDO, Y.; CÓRDOBA, Y.; BAENA, Y.; MORA, C. 2005. Caracterización de algunas propiedades fisicoquímicas y farmacotécnicas del almidón de arracacha (*Arracacia xanthorriza*). *Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéuticas.* 34 (2): 140-146.

SABARATNAM, S.; TRAQUAIR, J. 2002. Formulation of a *Streptomyces* biocontrol agent for the suppression of *Rhizoctonia* damping-off in tomato transplants. *Biological Control*. 23: 245–253.

SANTOS, A.; MARQUINA, D.; LEAL J.; PEINADO, J. 2000. (1-6)-B-D-glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(5): 1809–1813.

SCRAGG, A. 2002. Biotecnología para ingenieros, Sistemas biológicos en procesos tecnológicos. Limusa editores. México. Ciudad de México. 410-415.

SERRANO, L.; GALINDO, E. 2007. Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Revista Ciencias de la Academia Mexicana de Ciencias.* 59: 77-88.

SHABANA, Y.; MULLER-STOVER, D.; SAUERBORN, J. 2003. Granular Pesta formulation of *Fusarium oxysporum* f. sp.*orthoceras* for biological control of sunflower broomrape: efficacy and shelf-life. *Biological Control* 26: 189–201.

VALENCIA, C. 2000. Control de calidad físico, biológico y microbiológico de preformulados a base del hongo *Beauveria bassiana* (balsamo) utilizados a nivel experimental para el control biológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes.* Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Colombia. 89-96.

VILLAMIZAR, L.; MORENO, C.; PARIS, A.; COTES, A.; GARZÓN, C. 2004. Development of biopesticide prototypes for controlling pathogens in vegetables. *Development of biocontrol agents of diseases for commercial applications in food production systems,* Book of abstracts. Sevilla, España. 136.

VILLAMIZAR, L.; ZEDDAM, J.; ESPINEL, C.; COTES, A. 2005. Implementación de técnicas de control de calidad para la producción de un bioplaguicida a base del granulovirus de *Phthorimaea operculella PhopGV. Revista Colombiana de Entomologia.* 31(1): 127-132.

VOIGHT, R.; BORNSCHEIN, M. 1982. Tratado de tecnología farmacéutica. Editorial Acribia Zaragoza España. 42-43, 66-72, 109-110, 181-211.

WISNIEWSKI, M.; WILSON, C.; DROBY, S.; CHALUTZ, E.; El GHAOUTH, A.; STEVENS, C. 2007. Postharvest Biocontrol: New Concepts and Applications. En: *Biological Control: a Global Perspective.* 262-273.

WOHLFORD, C.; DEETZ, D.; SCHWARTZ, D. 1999. Cytokine gene expression after inhalation of corn dust. *American Journal of Physiology*. 276: 736-743.

WHO, 2006. WORLD HEALTH ORGANIZATION, Pesticide evaluation scheme (WHOPES). PESTICIDES AND THEIR APPLICATION For the control of vectors and pests of public health importance. Sixth edition. 11-15.

WRAIGTH, S.; JACKSON, M.; KOCK, S. 2001. Production, Stabilization and Formulation of Fungal Biocontrol Agents. En: *Fungi as Biocontrol Agent: Progress, Problems and Potential*. 253-263.

ZAPATA, J. 2003. Estudio preliminar de la microflora asociada a las estructuras reproductivas de la mora de castilla (*Rubus glaucus*, Benth) y su relación con el moho gris producido por *Botrytis cinerea*. Tesis de Pregrado. Carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá D.C. Colombia. 26-38.

10. ANEXOS

ANEXO 1. VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 (UFC/g) EN LA PRUEBA DE COMPATIBILIDAD DESPUÉS TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C.

Tiempo	Réplica	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO 8°C							
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	CONTROL
		UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
0	1	2,75E+10	1,07E+10	1,82E+10	7,50E+09	2,75E+10	2,20E+08	5,75E+10	5,25E+10
	2	4,25E+09	2,02E+10	6,75E+10	3,00E+09	2,45E+10	3,50E+07	4,25E+10	7,25E+10
	3	2,17E+10	1,25E+10	5,00E+10	1,75E+09	7,00E+10	3,25E+07	3,50E+10	1,80E+11
	Promedio	1,78E+10	1,45E+10	4,52E+10	4,08E+09	4,07E+10	9,58E+07	4,50E+10	1,02E+11
1	1	6,75E+09	5,00E+09	4,75E+09	3,00E+08	5,25E+10	1,37E+10	9,25E+10	2,75E+10
	2	3,00E+10	2,10E+09	8,00E+09	3,00E+08	6,50E+10	8,75E+09	7,75E+10	6,00E+10
	3	7,00E+10	2,50E+09	7,00E+09	3,25E+08	6,75E+10	1,50E+10	9,25E+10	7,75E+10
	Promedio	3,56E+10	3,20E+09	6,58E+09	3,08E+08	6,17E+10	1,25E+10	8,75E+10	5,50E+10
2	1	1,00E+10	8,25E+09	6,25E+09	4,00E+09	6,00E+10	2,75E+09	5,25E+10	5,50E+10
	2	2,75E+10	9,25E+09	6,50E+09	7,00E+09	8,00E+10	1,15E+10	4,50E+10	8,25E+10
	3	3,75E+10	1,60E+10	1,37E+10	5,25E+09	8,50E+10	1,62E+10	5,50E+10	9,25E+10
	Promedio	2,50E+10	1,12E+10	8,82E+09	5,42E+09	7,50E+10	1,02E+10	5,08E+10	7,67E+10
3	1	2,50E+10	2,05E+09	3,50E+09	1,00E+09	2,75E+10	6,25E+09	4,75E+10	2,50E+10
	2	2,20E+10	1,82E+09	4,50E+09	3,00E+09	3,00E+10	1,30E+10	3,00E+10	5,25E+10
	3	2,45E+10	1,92E+09	5,00E+09	2,02E+08	4,25E+10	7,25E+09	4,75E+10	5,00E+10
	Promedio	2,38E+10	1,93E+09	4,33E+09	1,40E+09	3,33E+10	8,83E+09	4,17E+10	4,25E+10

ANEXO 2. VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 (UFC/g) EN LA PRUEBA DE COMPATIBILIDAD DESPUÉS TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 18°C.

Tiempo	Réplica	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO 18°C							
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	CONTROL
		UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
0	1	2,75E+10	1,07E+10	1,82E+10	7,50E+09	2,75E+10	2,20E+08	5,75E+10	5,25E+10
	2	4,25E+09	2,02E+10	6,75E+10	3,00E+09	2,45E+10	3,50E+07	4,25E+10	7,25E+10
	3	2,17E+10	1,25E+10	5,00E+10	1,75E+09	7,00E+10	3,25E+07	3,50E+10	1,80E+11
	Promedio	1,78E+10	1,45E+10	4,52E+10	4,08E+09	4,07E+10	9,58E+07	4,50E+10	1,02E+11
1	1	5,75E+09	1,92E+10	1,02E+10	7,20E+08	2,42E+10	8,25E+09	1,90E+10	6,75E+10
	2	3,50E+10	4,00E+09	5,00E+09	7,75E+08	1,22E+10	6,75E+09	5,50E+10	4,50E+10
	3	1,10E+10	4,25E+09	1,60E+09	8,50E+08	2,07E+10	2,50E+09	5,25E+10	1,35E+11
	Promedio	1,73E+10	9,15E+09	5,60E+09	7,82E+08	1,90E+10	5,83E+09	4,22E+10	8,25E+10
2	1	2,50E+09	1,00E+09	1,25E+09	1,20E+10	1,90E+10	3,50E+09	3,00E+10	1,10E+10
	2	6,00E+09	1,57E+09	2,50E+09	1,30E+10	2,75E+10	4,50E+09	3,50E+10	1,32E+10
	3	2,25E+09	2,32E+09	4,00E+09	1,50E+09	3,75E+10	3,25E+09	4,75E+10	1,82E+10
	Promedio	3,58E+09	1,63E+09	2,58E+09	8,83E+09	2,80E+10	3,75E+09	3,75E+10	1,41E+10
3	1	4,25E+09	2,50E+08	5,00E+08	2,50E+08	1,75E+09	1,25E+09	3,00E+09	1,25E+09
	2	1,27E+10	1,25E+09	3,25E+09	7,50E+08	8,50E+09	7,50E+08	6,25E+09	2,50E+09
	3	5,25E+09	2,50E+08	9,50E+09	1,25E+09	9,25E+09	3,25E+09	8,00E+09	1,00E+09
	Promedio	7,40E+09	5,83E+08	4,42E+09	7,50E+08	6,50E+09	1,75E+09	5,75E+09	1,58E+09

ANEXO 3. VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 (UFC/g) EN LA PRUEBA DE COMPATIBILIDAD DESPUÉS TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 28°C.

Tiempo	Réplica	TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO 28°C							
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	CONTROL
		UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
0	1	2,75E+10	1,07E+10	1,82E+10	7,50E+09	2,75E+10	2,20E+08	5,75E+10	5,25E+10
	2	4,25E+09	2,02E+10	6,75E+10	3,00E+09	2,45E+10	3,50E+07	4,25E+10	7,25E+10
	3	2,17E+10	1,25E+10	5,00E+10	1,75E+09	7,00E+10	3,25E+07	3,50E+10	1,80E+11
	Promedio	1,78E+10	1,45E+10	4,52E+10	4,08E+09	4,07E+10	9,58E+07	4,50E+10	1,02E+11
1	1	1,75E+09	3,25E+09	2,00E+08	1,25E+09	8,00E+09	1,50E+09	9,50E+09	8,00E+08
	2	2,75E+09	7,50E+09	1,17E+08	5,00E+08	5,75E+09	2,25E+09	1,37E+10	7,50E+08
	3	2,17E+09	6,75E+09	1,07E+08	7,00E+08	4,75E+09	1,75E+09	1,00E+10	1,42E+09
	Promedio	2,22E+09	5,83E+09	1,41E+08	8,17E+08	6,17E+09	1,83E+09	1,11E+10	9,90E+08
2	1	1,00E+09	5,00E+08	5,00E+08	5,00E+08	1,50E+09	7,50E+06	2,75E+09	2,50E+08
	2	1,25E+09	9,75E+07	5,00E+08	2,50E+09	5,25E+08	2,50E+07	3,00E+09	5,00E+08
	3	2,50E+08	2,75E+08	2,25E+09	1,75E+09	5,25E+08	2,50E+06	4,00E+09	1,25E+09
	Promedio	8,33E+08	2,91E+08	1,08E+09	1,58E+09	8,50E+08	1,17E+07	3,25E+09	6,67E+08
3	1	7,50E+08	7,50E+08	4,50E+09	2,50E+08	2,50E+08	1,00E+07	7,50E+06	5,75E+09
	2	7,50E+08	5,00E+08	7,50E+08	1,00E+09	5,00E+08	9,00E+07	1,25E+07	7,00E+09
	3	2,50E+08	2,00E+09	1,00E+09	5,00E+08	7,50E+08	1,12E+08	4,25E+07	2,02E+10
	Promedio	5,83E+08	1,08E+09	2,08E+09	5,83E+08	5,00E+08	7,07E+07	2,08E+07	1,10E+10

ANEXO 4. PÉRDIDA DE VIABILIDAD (%) DE LA LEVADURA Lv027 EN LA PRUEBA DE COMPATIBILIDAD DESPUÉS TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura	Réplica	Tratamientos							
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	Control
8°C	1	0,40	7,16	6,98	8,86	0,00	0,00	0,77	3,01
	2	0,00	10,14	10,86	0,00	0,00	0,00	1,42	1,29
	3	0,00	8,06	9,35	10,14	2,00	0,00	0,00	4,94
	Promedio	0,13	8,45	9,06	6,34	0,67	0,00	0,73	3,08
18°C	1	7,77	16,27	15,22	14,96	11,46	0,00	11,92	15,14
	2	0,00	11,73	12,17	6,35	4,43	0,00	7,83	13,47
	3	5,96	16,83	6,74	1,58	8,10	0,00	6,08	20,04
	Promedio	4,58	14,94	11,37	7,63	8,00	0,00	8,61	16,21
28°C	1	14,98	11,51	5,91	14,96	19,55	16,09	36,10	8,96
	2	7,82	15,59	18,05	5,03	16,27	0,00	33,23	9,35
	3	18,75	7,88	15,88	5,89	18,17	0,00	27,65	8,44
	Promedio	13,85	11,66	13,28	8,63	18,00	5,36	32,33	8,92

ANEXO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS RESULTADOS DE PÉRDIDA DE VIABILIDAD EN LA PRUEBA DE COMPATIBILIDAD DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C.

ANOVA

STATISTIX FOR WINDOWS DATCOM, 04/14/08, 12:04

ONE-WAY AOV FOR: DE018 DE058 DI018 DI038 LB018 LEVADURA8 PS018

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	6	265.456	44.2426	7.39	0.0010
WITHIN	14	83.7611	5.98294		
TOTAL	20	349.217			

CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	15.18	6 0.0189

COCHRAN'S Q 0.7281
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 571.74

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 12.7532
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

SAMPLE GROUP

VARIABLE	MEAN	SIZE	STD DEV
DE018	9.0633	3	1.9558
DE058	6.3333	3	5.5220
DI018	0.1333	3	0.2309
DI038	8.4533	3	1.5284
LB018	0.7300	3	0.7108
LEVADURA8	3.0800	3	1.8260
PS018	0.6667	3	1.1547
TOTAL	4.0657	21	2.4460

CASES INCLUDED 21 MISSING CASES 0

TUKEY

STATISTIX FOR WINDOWS DATCOM, 04/14/08, 12:04

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
DE018	9.0633	I
DI038	8.4533	I
DE058	6.3333	I I
LEVADURA8	3.0800	I I
LB018	0.7300	.. I
PS018	0.6667	.. I
DI018	0.1333	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.832 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 6.8233
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 1.9972

ANEXO 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE PÉRDIDA DE VIABILIDAD EN LA PRUEBA DE COMPATIBILIDAD DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 18°C.

ANOVA

STATISTIX FOR WINDOWS DATCOM, 04/14/08, 12:05

ONE-WAY AOV FOR: DE0118 DE0518 DI0118 LB0118 LEVADURA1 PS0118 DI0318

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	6	317.080	52.8466	3.04	0.0407
WITHIN	14	243.584	17.3989		
TOTAL	20	560.664			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	2.05	6	0.9146

COCHRAN'S Q 0.3776
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 5.8785

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 11.8159
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
DE0118	11.377	3	4.2953
DE0518	7.6300	3	6.7812
DI0118	4.5767	3	4.0655
LB0118	8.6100	3	2.9971
LEVADURA1	16.217	3	3.4148
PS0118	7.9967	3	3.5161
DI0318	14.943	3	2.7969
TOTAL	10.193	21	4.1712

CASES INCLUDED 21 MISSING CASES 0

TUKEY

STATISTIX FOR WINDOWS DATCOM, 04/14/08, 12:06

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
LEVADURA1	16.217	I
DI0318	14.943	I I
DE0118	11.377	I I
LB0118	8.6100	I I
PS0118	7.9967	I I
DE0518	7.6300	I I
DI0118	4.5767	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.832 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 11.636
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 3.4058

ANEXO 7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE PÉRDIDA DE VIABILIDAD EN LA PRUEBA DE COMPATIBILIDAD DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 28°C.

ANOVA

STATISTIX FOR WINDOWS DATCOM, 04/14/08, 12:07

ONE-WAY AOV FOR: DE0128 DE0328 DE0528 DI0328 LB0128 LEVADURA2 PS0128 DI0128

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	7	1461.48	208.784	7.40	0.0005
WITHIN	16	451.128	28.1955		
TOTAL	23	1912.61			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	11.18	7	0.1311

COCHRAN'S Q 0.3826
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 414.02

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 60.1960
EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
DE0128	13.280	3	6.4742
DE0328	5.3633	3	9.2896
DE0528	8.6267	3	5.5017
DI0328	11.660	3	3.8572
LB0128	32.327	3	4.2968
LEVADURA2	8.9167	3	0.4565
PS0128	17.997	3	1.6469
DI0128	13.850	3	5.5519
TOTAL	14.002	24	5.3099

CASES INCLUDED 24 MISSING CASES 0

TUKEY

STATISTIX FOR WINDOWS DATCOM, 04/14/08, 12:07

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
LB0128	32.327	I
PS0128	17.997	I I
DI0128	13.850	.. I
DE0128	13.280	.. I
DI0328	11.660	.. I
LEVADURA2	8.9167	.. I
DE0528	8.6267	.. I
DE0328	5.3633	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.903 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 15.031
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 4.3356

ANEXO 8. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO EN LAS PRUEBAS DE pH, HUMEDAD, HUMECTABILIDAD Y DESINTEGRACIÓN.

No Lote	Réplica	pH	Humedad (%)	Humectabilidad (seg)	Desintegración (min)
Lote 1	**1**	6,02	5,78	79	2,4
	2	6,00	5,16	70	2,25
	3	6,03	5,37	82	2,39
	Promedio	6,02	5,44	77,00	2,35
Lote 2	**1**	5,36	5,13	43	2,29
	2	5,50	4,76	45	2,23
	3	5,96	5,11	46	2,21
	Promedio	5,61	5,00	44,67	2,24

ANEXO 9. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO EN LAS PRUEBAS DE VOLUMINOSIDAD Y POROSIDAD.

No Lote	Réplica	Vi (mL)	Vf (mL)	W muestra (g)	Voluminosidad (mL/g)	Porosidad (%)
Lote 1	1	250	215	100	2,50	14,00
	2	248	210	100	2,48	15,32
	3	250	215	100	2,50	14,00
	promedio				2,49	14,44
Lote 2	1	285	260	100	2,85	8,77
	2	290	250	100	2,90	13,79
	3	287	260	100	2,87	9,41
	promedio				2,87	10,66

ANEXO 10. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO EN LA PRUEBA DE FLUIDEZ ESTATICA

No Lote	Réplica	Altura (cm)	Diámetro (cm)	Radio (cm)	Ángulo de reposo
Lote 1	1	4,50	14,00	7,00	32,61
	2	4,70	13,50	6,75	34,60
	3	4,60	13,80	6,90	33,42
	Promedio				33,54
Lote 2	1	4,60	14,50	7,25	32,21
	2	4,50	14,50	7,25	31,79
	3	4,50	14,60	7,30	31,38
	Promedio				31,79

ANEXO 11. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO EN LA PRUEBA DE SUSPENDIBILIDAD DEL LOTE 1.

TIEMPO (min)	RÉPLICA	Tercio superior	Tercio medio	Tercio inferior
		Células/mL	Células/mL	Células/mL
0	1	5,70E+09	5,70E+09	5,70E+09
	2	5,94E+09	5,94E+09	5,94E+09
	3	5,57E+09	5,57E+09	5,57E+09
	promedio	5,74E+09	5,74E+09	5,74E+09
30	1	1,41E+09	1,73E+09	2,88E+09
	2	1,57E+09	1,84E+09	3,06E+09
	3	1,33E+09	1,89E+09	3,06E+09
	promedio	1,44E+09	1,82E+09	3,00E+09
60	1	1,41E+09	2,10E+09	3,09E+09
	2	1,30E+09	2,34E+09	3,22E+09
	3	1,36E+09	2,34E+09	3,17E+09
	promedio	1,36E+09	2,26E+09	3,16E+09
90	1	1,33E+09	1,84E+09	3,17E+09
	2	1,22E+09	1,84E+09	3,44E+09
	3	1,30E+09	1,78E+09	3,25E+09
	promedio	1,28E+09	1,82E+09	3,29E+09
120	1	1,04E+09	1,68E+09	3,22E+09
	2	1,00E+09	1,78E+09	3,57E+09
	3	9,80E+08	1,78E+09	3,46E+09
	promedio	1,01E+09	1,75E+09	3,42E+09
150	1	1,01E+09	1,97E+09	3,84E+09
	2	1,14E+09	1,86E+09	3,52E+09
	3	1,09E+09	1,89E+09	3,54E+09
	promedio	1,08E+09	1,91E+09	3,63E+09
180	1	8,52E+08	1,89E+09	3,73E+09
	2	8,80E+08	1,94E+09	3,81E+09
	3	8,80E+08	1,92E+09	3,76E+09
	promedio	8,71E+08	1,92E+09	3,77E+09

ANEXO 12. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO EN LA PRUEBA DE SUSPENDIBILIDAD DEL LOTE 2.

TIEMPO (min)	RÉPLICA	Tercio superior	Tercio medio	Tercio inferior
		Células/mL	Células/mL	Células/mL
0	1	6,70E+09	6,70E+09	6,70E+09
	2	6,50E+09	6,50E+09	6,50E+09
	3	6,50E+09	6,50E+09	6,50E+09
	promedio	6,57E+09	6,57E+09	6,57E+09
30	1	1,40E+09	2,18E+09	3,06E+09
	2	1,52E+09	2,16E+09	3,38E+09
	3	1,49E+09	2,08E+09	3,22E+09
	promedio	1,47E+09	2,14E+09	3,22E+09
60	1	1,41E+09	2,34E+09	2,98E+09
	2	1,28E+09	2,18E+09	2,90E+09
	3	1,30E+09	2,21E+09	3,01E+09
	promedio	1,33E+09	2,24E+09	2,96E+09
90	1	1,20E+09	2,02E+09	3,28E+09
	2	1,25E+09	2,00E+09	3,33E+09
	3	1,30E+09	1,86E+09	3,52E+09
	promedio	1,25E+09	1,96E+09	3,38E+09
120	1	1,14E+09	1,81E+09	3,22E+09
	2	1,06E+09	1,68E+09	3,52E+09
	3	9,85E+08	1,84E+09	3,52E+09
	promedio	1,06E+09	1,78E+09	3,42E+09
150	1	1,04E+09	1,81E+09	3,38E+09
	2	1,01E+09	1,86E+09	3,28E+09
	3	9,85E+08	1,84E+09	3,38E+09
	promedio	1,01E+09	1,84E+09	3,35E+09
180	1	8,80E+08	1,70E+09	3,62E+09
	2	8,25E+08	1,86E+09	3,62E+09
	3	9,32E+08	1,76E+09	3,38E+09
	promedio	8,79E+08	1,77E+09	3,54E+09

ANEXO 13. VARIACIÓN EN LA UNIDAD EXPONENCIAL DE LA CONCENTRACIÓN INICIAL DESPUÉS DE TRES HORAS DE REPOSO EN LA PRUEBA DE SUSPENDIBILIDAD DEL GRANULADO.

No Lote	Réplica	Tercio superior	Tercio medio	Tercio inferior
Lote 1	1	0,83	0,48	0,19
	2	0,82	0,47	0,18
	3	0,82	0,48	0,18
	promedio	0,82	0,48	0,18
	desviación estándar	0,01	0,01	0,00
Lote 2	1	0,88	0,59	0,26
	2	0,90	0,55	0,26
	3	0,85	0,57	0,29
	promedio	0,88	0,57	0,27
	desviación estándar	0,03	0,02	0,02

ANEXO 14. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO EN LA PRUEBA DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

No Lote	Réplica	PESO RETENIDO (%)						
		Tamiz 7	Tamiz 10	Tamiz 20	Tamiz 35	Tamiz 400	Colector	Sumatoria tamices 7, 10 y 20
		2800 µm	2000 µm	850 µm	500 µm	38 µm		
Lote 1	1	0,00	0,96	88,54	6,16	3,96	0,42	89,50
	2	0,00	1,09	87,95	6,21	4,22	0,53	89,04
	3	0,00	0,79	88,76	6,12	3,49	0,84	89,55
	promedio							89,36
Lote 2	1	0,00	0,82	82,84	13,73	2,53	0,08	83,66
	2	0,00	0,77	82,26	14,1	2,78	0,09	83,03
	3	0,00	0,75	82,27	14,07	2,78	0,13	83,02
	promedio							83,24

ANEXO 15. CARACTERIZACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO EN LA PRUEBA DE CONTENIDO DE POLVOS FINOS.

No Lote	Réplica	PESO RETENIDO												
		850 µm		500 µm		250 µm		150 µm		100 µm		Colector		Sumatoria W (%) (150µm, 100µm y colector)
		W (g)	W (%)	W (g)	W (%)	W (g)	W (%)	W (g)	W (%)	W (g)	W (%)	W (g)	W (%)	
Lote 1	1	102,14	85,12	11,94	9,95	1,47	1,23	1,17	0,98	0,65	0,54	2,63	2,19	3,71
	2	102,09	85,08	12	10,00	1,43	1,19	0,95	0,79	0,62	0,52	2,91	2,43	3,73
	3	102,21	85,18	11,52	9,60	1,34	1,12	0,92	0,77	0,72	0,60	3,29	2,74	4,11
	Promedio	102,15	85,12	11,82	9,85	1,41	1,18	1,01	0,84	0,66	0,55	2,94	2,45	3,85
Lote 2	1	100,66	83,88	15,01	12,51	1,53	1,28	0,81	0,68	0,53	0,44	1,46	1,22	2,33
	2	97,01	80,84	19,47	16,23	1,28	1,07	0,32	0,27	0,21	0,18	1,71	1,43	1,87
	3	96,63	80,53	18,63	15,53	1,51	1,26	0,68	0,57	0,52	0,43	2,03	1,69	2,69
	Promedio	98,10	81,75	17,70	14,75	1,44	1,20	0,60	0,50	0,42	0,35	1,73	1,44	2,30

ANEXO 16. CONCENTRACIÓN DEL GRANULADO MODIFICADO.

Réplica	Lote 1	Lote 2
	Células/g	Células/g
1	1,00E+11	1,60E+11
2	1,30E+11	1,00E+11
3	9,50E+10	9,40E+10
Promedio	1,08E+11	1,18E+11

ANEXO 17. PUREZA DEL GRANULADO MODIFICADO.

Réplica	LOTE 1			LOTE 2		
	PDA	YM	NUTRITIVO	PDA	YM	NUTRITIVO
	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g	UFC/g
1	0	0	1,20E+04	0	0	8,50E+03
2	0	0	3,00E+03	0	0	1,70E+03
3	0	0	8,00E+03	0	0	3,60E+03
Promedio	0	0	7,67E+03	0	0	4,60E+03
Sumatoria			7,67E+03			4,60E+03

ANEXO 18. VIABILIDAD (UFC/g) DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA COMO UN GRANULADO, EMPACADA AL VACÍO Y ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Tiempo (meses)	Réplica	8°C		18°C		28°C	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09
	2	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09
	3	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09
1	1	4,30E+08	4,00E+08	3,30E+07	9,00E+07	3,30E+07	1,00E+07
	2	3,00E+08	4,00E+08	6,60E+07	6,00E+07	3,30E+07	4,00E+07
	3	2,70E+08	3,00E+08	3,30E+07	7,00E+07	3,30E+07	4,00E+07
2	1	1,60E+08	2,00E+08	1,30E+08	1,80E+07	6,60E+05	2,00E+05
	2	1,60E+08	2,10E+08	3,30E+07	1,50E+07	3,30E+05	3,00E+05
	3	1,30E+08	2,30E+08	1,00E+08	1,30E+07	3,30E+05	2,00E+05
3	1	1,00E+08	6,30E+07	3,30E+07	1,30E+07	1,00E+05	9,00E+04
	2	9,70E+07	7,30E+07	3,00E+07	1,20E+07	1,70E+05	1,20E+05
	3	1,10E+08	6,80E+07	2,30E+07	1,40E+07	1,00E+05	9,00E+04

ANEXO 19. VIABILIDAD (UFC/g) DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA COMO UN GRANULADO, EMPACADA SIN VACÍO Y ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Tiempo (meses)	Réplica	8°C		18°C		28°C	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09
	2	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09
	3	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09	1,40E+09	1,30E+09
1	1	2,00E+08	2,00E+08	3,30E+07	4,00E+07	3,30E+07	1,00E+07
	2	1,30E+08	2,00E+08	3,30E+07	9,00E+07	3,30E+07	2,00E+07
	3	1,00E+08	1,00E+08	3,30E+07	6,00E+07	3,30E+07	1,00E+07
2	1	6,60E+07	1,00E+08	6,60E+07	7,00E+07	6,60E+05	2,00E+05
	2	1,30E+08	1,00E+08	3,30E+07	4,00E+07	6,60E+05	1,00E+05
	3	1,00E+08	2,00E+08	6,60E+07	5,00E+07	3,30E+05	1,00E+05
3	1	4,60E+07	5,60E+07	2,30E+07	1,90E+07	6,60E+04	3,00E+04
	2	3,30E+07	6,10E+07	1,00E+07	2,10E+07	3,30E+04	3,00E+04
	3	4,30E+07	6,90E+07	6,60E+06	2,30E+07	3,30E+04	6,00E+04

ANEXO 20. VIABILIDAD (UFC/g) DE LA LEVADURA Lv027 SIN FORMULAR, EMPACADA CON VACÍO Y ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Tiempo (meses)	Réplica	8°C		18°C		28°C	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09
	2	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09
	3	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09
1	1	1,40E+10	4,00E+09	2,20E+09	7,00E+08	2,00E+08	5,00E+07
	2	4,00E+09	3,00E+09	1,80E+09	5,00E+08	4,00E+08	3,00E+07
	3	1,60E+10	7,00E+09	1,80E+09	4,00E+08	2,00E+08	4,00E+07
2	1	1,80E+09	1,00E+08	4,00E+08	2,20E+07	2,00E+08	5,00E+06
	2	2,00E+09	2,00E+08	4,00E+08	3,00E+07	4,00E+08	8,00E+06
	3	1,20E+09	1,00E+08	2,00E+08	2,80E+07	2,00E+08	3,00E+06
3	1	1,40E+09	9,70E+07	1,80E+08	1,20E+07	6,00E+05	3,80E+05
	2	1,60E+09	7,30E+07	2,00E+08	1,40E+07	1,00E+06	2,40E+05
	3	1,30E+09	1,30E+08	1,60E+08	1,60E+07	1,80E+06	3,40E+05

ANEXO 21. VIABILIDAD (UFC/g) DE LA LEVADURA Lv027 SIN FORMULAR, EMPACADA SIN VACÍO Y ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Tiempo (meses)	Réplica	8°C		18°C		28°C	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09
	2	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09
	3	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09	8,60E+10	9,30E+09
1	1	4,00E+09	6,00E+08	1,60E+09	4,00E+08	2,00E+08	1,00E+07
	2	2,00E+09	7,00E+08	2,20E+09	6,00E+08	4,00E+08	2,00E+07
	3	2,00E+09	7,00E+08	1,80E+09	4,00E+08	4,00E+08	1,00E+07
2	1	2,80E+09	1,00E+08	2,00E+08	1,00E+07	6,00E+06	2,00E+05
	2	1,20E+09	1,00E+08	2,80E+08	1,10E+07	1,20E+07	1,00E+05
	3	1,40E+09	1,00E+08	1,20E+08	1,30E+07	8,00E+06	1,00E+05
3	1	1,30E+09	8,10E+07	1,80E+08	9,40E+06	4,00E+05	7,00E+04
	2	1,00E+09	6,90E+07	1,60E+08	9,90E+06	8,00E+05	8,00E+04
	3	1,20E+09	6,60E+07	1,40E+08	9,80E+06	1,40E+06	9,00E+04

ANEXO 22. GRADOS DE LIBERTAD OBTENIDOS PARA LA COMPARACIÓN DE IGUALDAD DE TENDENCIAS ENTRE LOTES EN LA PRUEBA DE ESTABILIDAD DE LA VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Comparación	Temperaturas de almacenamiento					
	8°C		18°C		28°C	
	Numerador	Denominador	Numerador	Denominador	Numerador	Denominador
Modelos	2	20	2	20	2	20
Pendientes	1	20	1	20	1	20
Interceptos	1	21	1	21	1	21

ANEXO 23. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA VIABILIDAD DEL GRANULADO EMPACADO AL VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura		**8°C**			**18°C**			**28°C**	
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	861,34	861,14	1722,48	778,15	741,04	1519,19	592,67	574,86	1167,53
A	9,02	9,07	9,05	8,75	8,82	8,78	8,96	8,88	8,92
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-0,38	-0,41	-0,39	-0,48	-0,67	-0,58	-1,41	-1,44	-1,43
SUM xy	146,67	146,14	292,81	137,19	130,69	267,88	101,96	99,33	201,29
SUM y	101,53	101,50	203,03	96,28	93,80	190,09	82,08	80,61	162,69
SCR	0,20	0,07	0,26	2,10	1,08	3,18	1,38	2,24	3,62
SCR_T			0,27			3,70			3,72

ANEXO 24. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA VIABILIDAD DEL GRANULADO EMPACADO SIN VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura	**8°C**			**18°C**			**28°C**		
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	814,20	830,01	1644,20	749,06	770,15	1519,21	582,79	541,52	1124,31
A	8,93	8,91	8,92	8,77	8,80	8,78	9,06	8,81	8,94
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-0,48	-0,41	-0,44	-0,61	-0,54	-0,57	-1,54	-1,56	-1,55
SUM xy	140,73	143,32	284,05	132,41	135,51	267,93	98,44	93,10	191,54
SUM y	98,60	99,62	198,22	94,33	95,79	190,12	81,01	77,68	158,68
SCR	0,57	0,56	1,13	2,00	1,15	3,15	0,44	2,17	2,61
SCR_T			1,21			3,26			3,08

ANEXO 25. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA VIABILIDAD DE LA BIOMASA SIN FORMULAR EMPACADA AL VACÍO Y ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura		**8°C**			**18°C**			**28°C**	
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	1163,99	965,42	2129,41	1038,55	844,38	1882,93	890,82	696,24	1587,07
A	10,74	10,05	10,39	10,57	9,78	10,17	10,65	9,58	10,12
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-0,61	-0,75	-0,68	-0,88	-0,98	-0,93	-1,48	-1,43	-1,45
SUM xy	167,62	149,42	317,03	153,14	134,97	288,11	129,71	112,41	242,12
SUM y	117,86	107,09	224,95	110,92	99,75	210,67	101,25	89,25	190,50
SCR	0,89	1,24	2,14	1,56	0,93	2,49	3,89	1,65	5,54
SCR_T			7,10			7,76			11,55

ANEXO 26. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA VIABILIDAD DE LA BIOMASA SIN FORMULAR EMPACADA SIN VACÍO ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura		**8°C**			**18°C**			**28°C**	
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	1125,74	950,30	2076,04	1023,70	818,79	1842,49	823,30	599,58	1422,88
A	10,52	9,82	10,17	10,55	9,75	10,15	10,57	9,35	9,96
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-0,58	-0,63	-0,61	-0,92	-1,06	-0,99	-1,67	-1,72	-1,70
SUM xy	165,13	150,11	315,23	151,27	131,17	282,45	119,98	96,01	215,99
SUM y	115,87	106,41	222,28	110,04	98,00	208,04	96,72	81,21	177,93
SCR	1,83	0,70	2,53	2,00	1,70	3,69	1,73	5,60	7,33
SCR_T			6,29			9,87			17,37

ANEXO 27. VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C.

TIEMPO (MESES)	RÉPLICA	8°C			
		T1	T2	T3	T4
0	1	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	2	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	3	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	4	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	5	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	6	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	Promedio	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
1	1	4,30E+08	2,00E+08	1,40E+10	4,00E+09
	2	3,00E+08	1,30E+08	4,00E+09	2,00E+09
	3	2,70E+08	1,00E+08	1,60E+10	2,00E+09
	4	4,00E+08	2,00E+08	4,00E+09	6,00E+08
	5	4,00E+08	2,00E+08	3,00E+09	7,00E+08
	6	3,00E+08	1,00E+08	7,00E+09	7,00E+08
	Promedio	3,50E+08	1,55E+08	8,00E+09	1,67E+09
2	1	1,60E+08	6,60E+07	1,80E+09	2,80E+09
	2	1,60E+08	1,30E+08	2,00E+09	1,20E+09
	3	1,30E+08	1,00E+08	1,20E+09	1,40E+09
	4	2,00E+08	1,00E+08	1,00E+08	1,00E+08
	5	2,10E+08	1,00E+08	2,00E+08	1,00E+08
	6	2,30E+08	2,00E+08	1,00E+08	1,00E+08
	Promedio	1,82E+08	1,16E+08	9,00E+08	9,50E+08
3	1	1,00E+08	4,60E+07	1,40E+09	1,30E+09
	2	9,70E+07	3,30E+07	1,60E+09	1,00E+09
	3	1,10E+08	4,30E+07	1,30E+09	1,20E+09
	4	6,30E+07	5,60E+07	9,70E+07	8,10E+07
	5	7,30E+07	6,10E+07	7,30E+07	6,90E+07
	6	6,80E+07	6,90E+07	1,30E+08	6,60E+07
	Promedio	8,52E+07	5,13E+07	7,67E+08	6,19E+08

ANEXO 28. VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 18°C.

TIEMPO (MESES)	RÉPLICA	18°C			
		T1	T2	T3	T4
0	1	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	2	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	3	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	4	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	5	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	6	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	Promedio	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
1	1	3,30E+07	3,30E+07	2,20E+09	1,60E+09
	2	6,60E+07	3,30E+07	1,80E+09	2,20E+09
	3	3,30E+07	3,30E+07	1,80E+09	1,80E+09
	4	9,00E+07	4,00E+07	7,00E+08	4,00E+08
	5	6,00E+07	9,00E+07	5,00E+08	6,00E+08
	6	7,00E+07	6,00E+07	4,00E+08	4,00E+08
	Promedio	5,87E+07	4,82E+07	1,23E+09	1,17E+09
2	1	1,30E+08	6,60E+07	4,00E+08	2,00E+08
	2	3,30E+07	3,30E+07	4,00E+08	2,80E+08
	3	1,00E+08	6,60E+07	2,00E+08	1,20E+08
	4	1,80E+07	7,00E+07	2,20E+07	1,00E+07
	5	1,50E+07	4,00E+07	3,00E+07	1,10E+07
	6	1,30E+07	5,00E+07	2,80E+07	1,30E+07
	Promedio	5,15E+07	5,42E+07	1,80E+08	1,06E+08
3	1	3,30E+07	2,30E+07	1,80E+08	1,80E+08
	2	3,00E+07	1,00E+07	2,00E+08	1,60E+08
	3	2,30E+07	6,60E+06	1,60E+08	1,40E+08
	4	1,30E+07	1,90E+07	1,20E+07	9,40E+06
	5	1,20E+07	2,10E+07	1,40E+07	9,90E+06
	6	1,40E+07	2,30E+07	1,60E+07	9,80E+06
	Promedio	2,08E+07	1,71E+07	9,70E+07	8,49E+07

ANEXO 29. VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 28°C.

TIEMPO (MESES)	RÉPLICA	28°C			
		T1	T2	T3	T4
0	1	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	2	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	3	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	4	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	5	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	6	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
	Promedio	1,37E+09	1,37E+09	4,80E+10	4,80E+10
1	1	3,30E+07	3,30E+07	2,00E+08	2,00E+08
	2	3,30E+07	3,30E+07	4,00E+08	4,00E+08
	3	3,30E+07	3,30E+07	2,00E+08	4,00E+08
	4	1,00E+07	1,00E+07	5,00E+07	1,00E+07
	5	4,00E+07	2,00E+07	3,00E+07	2,00E+07
	6	4,00E+07	1,00E+07	4,00E+07	1,00E+07
	Promedio	3,15E+07	2,32E+07	1,53E+08	1,73E+08
2	1	6,60E+05	6,60E+05	2,00E+08	6,00E+06
	2	3,30E+05	6,60E+05	4,00E+08	1,20E+07
	3	3,30E+05	3,30E+05	2,00E+08	8,00E+06
	4	2,00E+05	2,00E+05	5,00E+06	2,00E+05
	5	3,00E+05	1,00E+05	8,00E+06	1,00E+05
	6	2,00E+05	1,00E+05	3,00E+06	1,00E+05
	Promedio	3,37E+05	3,42E+05	1,36E+08	4,40E+06
3	1	1,00E+05	6,60E+04	6,00E+05	4,00E+05
	2	1,70E+05	3,30E+04	1,00E+06	8,00E+05
	3	1,00E+05	3,30E+04	1,80E+06	1,40E+06
	4	9,00E+04	3,00E+04	3,80E+05	7,00E+04
	5	1,20E+05	3,00E+04	2,40E+05	8,00E+04
	6	9,00E+04	6,00E+04	3,40E+05	9,00E+04
	Promedio	1,12E+05	4,20E+04	7,27E+05	4,73E+05

ANEXO 30. PÉRDIDA DE VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Réplica	8°C				18°C				28°C			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
1	12,44	16,13	14,37	14,67	17,71	19,43	22,71	22,71	45,28	47,25	45,90	47,55
2	12,59	17,71	13,83	15,74	18,16	23,39	22,28	23,19	42,75	50,55	43,83	44,73
3	11,99	16,45	14,67	15,00	19,43	25,36	23,19	23,73	45,28	50,55	41,44	42,46
4	14,64	15,20	25,23	25,96	22,14	20,34	33,72	34,72	45,78	51,00	47,76	54,64
5	13,94	14,79	26,38	26,61	22,52	19,86	33,10	34,51	44,41	51,00	49,63	54,10
6	14,27	14,21	24,04	26,79	21,79	19,43	32,55	34,55	45,78	47,70	48,21	53,62
Promedio	13,31	15,75	19,75	20,80	20,29	21,30	27,93	28,90	44,88	49,67	46,13	49,52

ANEXO 31. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE PÉRDIDA DE VIABILIDAD DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C, 18°C Y 28°C.

ANOVA

STATISTIX FOR WINDOWS 08/06/08, 11:30

ONE-WAY AOV FOR: B18 B28 B8 BV18 BV28 BV8 G18 G28 G8 GV18 GV28 GV8

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	12576.3	1143.30	67.93	0.0000
WITHIN	60	1009.78	16.8297		
TOTAL	71	13586.0			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	39.76	11	0.0000

COCHRAN'S Q 0.1930
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 31.927

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 187.744
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
B18	28.902	6	6.2437
B28	49.517	6	5.3041
B8	20.795	6	6.2142
BV18	27.925	6	5.7138
BV28	46.128	6	3.0520
BV8	19.753	6	6.0364
G18	21.302	6	2.4836
G28	49.675	6	1.7218
G8	15.748	6	1.2706
GV18	20.292	6	2.1250
GV28	44.880	6	1.1574
GV8	13.312	6	1.1050
TOTAL	29.852	72	4.1024

CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0

TUKEY

STATISTIX FOR WINDOWS 08/06/08, 11:30

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

HOMOGENEOUS

VARIABLE	MEAN	GROUPS
G28	49.675	I
B28	49.517	I
BV28	46.128	I
GV28	44.880	I
B18	28.902	..I
BV18	27.925	.. I I
G18	21.302	.. I I I
B8	20.795	.... I I
GV18	20.292	.... I I
BV8	19.753	 I
G8	15.748	 I
GV8	13.312	 I

THERE ARE 4 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 4.807 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 8.0514
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 2.3685

ANEXO 32. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE VIABILIDAD INICIAL Y FINAL DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C, 18°C Y 28°C.

ANOVA

STATISTIX FOR WINDOWS VIABTODO, 10/21/08, 16:53

ONE-WAY AOV FOR: VFB18 VFB28 VFB8 VFBV18 VFBV28 VFBV8 VFG18 VFG28 VFG8 VFGV18 VFGV28 VFGV8 VIB18 VIB28 VIB8 VIBV18 VIBV28 VIBV8 VIG18 VIG28 VIG8 VIGV18 VIGV28 VIGV8

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	23	448.757	19.5112	119.71	0.0000
WITHIN	120	19.5586	0.16299		
TOTAL	143	468.316			

	CHI-SQ	DF	P
BARTLETT'S TEST OF EQUAL VARIANCES	187.82	23	0.0000

COCHRAN'S Q 0.1139
LARGEST VAR / SMALLEST VAR 927.90

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 3.22470
EFFECTIVE CELL SIZE 6.0

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
VFB18	7.5950	6	0.6674
VFB28	5.3917	6	0.5669
VFB8	8.4600	6	0.6626
VFBV18	7.6983	6	0.6100
VFBV28	5.7550	6	0.3279
VFBV8	8.5700	6	0.6445
VFG18	7.1900	6	0.2262
VFG28	4.6000	6	0.1565
VFG8	7.6983	6	0.1175
VFGV18	7.2833	6	0.1948
VFGV28	5.0350	6	0.1067
VFGV8	7.9200	6	0.1018
VIB18	10.450	6	0.5258
VIB28	10.450	6	0.5258
VIB8	10.450	6	0.5258
VIBV18	10.450	6	0.5258
VIBV28	10.450	6	0.5258
VIBV8	10.450	6	0.5258
VIG18	9.1300	6	0.0219
VIG28	9.1300	6	0.0219
VIG8	9.1300	6	0.0219
VIGV18	9.1300	6	0.0219
VIGV28	9.1300	6	0.0219
VIGV8	9.1300	6	0.0219
TOTAL	8.3615	144	0.4037

CASES INCLUDED 144 MISSING CASES 0

TUKEY

STATISTIX FOR WINDOWS VIABTODO, 10/21/08, 16:54

TUKEY (HSD) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	MEAN	HOMOGENEOUS GROUPS
VIB18	10.450	I
VIB28	10.450	I
VIB8	10.450	I
VIBV18	10.450	I
VIBV28	10.450	I
VIBV8	10.450	I
VIG18	9.1300	.. I
VIG28	9.1300	.. I
VIG8	9.1300	.. I
VIGV18	9.1300	.. I
VIGV28	9.1300	.. I
VIGV8	9.1300	.. I
VFBV8	8.5700	.. I I
VFB8	8.4600	.. I I I
VFGV8	7.9200	.... I I I
VFBV18	7.6983	..... I I
VFG8	7.6983	..... I I
VFB18	7.5950	..... I I
VFGV18	7.2833	 I
VFG18	7.1900	 I
VFBV28	5.7550	 I
VFB28	5.3917	..... I I
VFGV28	5.0350	..... I I
VFG28	4.6000	 I

THERE ARE 7 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL Q VALUE 5.260 REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.8669
STANDARD ERROR FOR COMPARISON 0.2331

ANEXO 33. EFICACIA DEL GRANULADO A BASE DE LA LEVADURA Lv027 EMPACADO AL VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C SOBRE *Botrytis cinerea*.

Tiempo de almacenamiento (meses)	Repetición	Eficacia (%)					
		Temperatura de almacenamiento (°C)					
		8		18		28	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	80	80	80	80	80	80
	2	80	80	80	80	80	80
	3	80	80	80	80	80	80
	$\bar{x}$	80	80	80	80	80	80
	DE	0	0	0	0	0	0
1	1	80	80	80	40	80	40
	2	100	80	100	40	80	40
	3	100	60	100	60	40	20
	$\bar{x}$	93,33	73,33	93,33	46,67	66,67	33,33
	DE	11,55	11,55	11,55	11,55	23,09	11,55
2	1	60	80	40	40	20	20
	2	80	60	40	40	40	20
	3	60	60	60	40	40	40
	$\bar{x}$	66,67	66,67	46,67	40,00	33,33	26,67
	DE	11,55	11,55	11,55	0,00	11,55	11,55
3	1	40	60	40	40	40	20
	2	40	40	40	40	40	20
	3	60	60	40	40	20	20
	$\bar{x}$	46,67	53,33	40,00	40,00	33,33	20,00
	DE	11,55	11,55	0,00	0,00	11,55	0,00

$\bar{x}$: Promedio; DE: Desviación estándar

ANEXO 34. EFICACIA DEL GRANULADO A BASE DE LA LEVADURA Lv027 EMPACADO SIN VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C SOBRE *Botrytis cinerea*.

Tiempo de almacenamiento (meses)	Repetición	Eficacia (%)					
		Temperatura de almacenamiento (°C)					
		8		18		28	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	80	80	80	80	80	80
	2	80	80	80	80	80	80
	3	80	80	80	80	80	80
	$\bar{x}$	80	80	80	80	80	80
	DE	0	0	0	0	0	0
1	1	80	80	0	20	0	0
	2	100	60	0	20	0	0
	3	100	60	0	20	0	20
	$\bar{x}$	93,33	66,67	0,00	20,00	0,00	6,67
	DE	11,55	11,55	0,00	0,00	0,00	11,55
2	1	60	60	20	20	0	0
	2	60	60	20	0	20	0
	3	60	60	0	0	0	0
	$\bar{x}$	60,00	60,00	13,33	6,67	6,67	0,00
	DE	0,00	0,00	11,55	11,55	11,55	0,00
3	1	40	20	20	0	0	0
	2	40	40	0	0	0	0
	3	20	40	0	0	0	0
	$\bar{x}$	33,33	33,33	6,67	0,00	0,00	0,00
	DE	11,55	11,55	11,55	0,00	0,00	0,00

$\bar{x}$: Promedio; DE: Desviación estándar

ANEXO 35. EFICACIA DE LA BIOMASA SIN FORMULAR DE LA LEVADURA Lv027 EMPACADA AL VACÍO Y ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C SOBRE *Botrytis cinerea*.

Tiempo de almacenamiento (meses)	Repetición	Eficacia (%)					
		Temperatura de almacenamiento (°C)					
		8		18		28	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	80	80	80	80	80	80
	2	80	80	80	80	80	80
	3	80	80	80	80	80	80
	$\bar{x}$	80	80	80	80	80	80
	DE	0	0	0	0	0	0
1	1	100	100	100	80	80	80
	2	100	80	20	60	100	60
	3	80	80	80	80	100	60
	$\bar{x}$	93,33	86,67	66,67	73,33	93,33	66,67
	DE	11,55	11,55	41,63	11,55	11,55	11,55
2	1	80	60	60	60	40	40
	2	60	80	60	60	60	60
	3	60	60	60	60	60	40
	$\bar{x}$	66,67	66,67	60,00	60,00	53,33	46,67
	DE	11,55	11,55	0,00	0,00	11,55	11,55
3	1	80	60	40	40	40	40
	2	60	80	60	40	40	40
	3	60	60	60	60	40	40
	$\bar{x}$	66,67	66,67	53,33	46,67	40,00	40,00
	DE	11,55	11,55	11,55	11,55	0,00	0,00

$\bar{x}$: Promedio; DE: Desviación estándar

ANEXO 36. EFICACIA DE LA BIOMASA SIN FORMULAR DE LA LEVADURA Lv027 EMPACADA SIN VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C SOBRE *Botrytis cinerea.*

Tiempo de almacenamiento (meses)	Repetición	Eficacia (%)					
		Temperatura de almacenamiento (°C)					
		8		18		28	
		Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2	Lote 1	Lote 2
0	1	80	80	80	80	80	80
	2	80	80	80	80	80	80
	3	80	80	80	80	80	80
	$\bar{x}$	80	80	80	80	80	80
	DE	0	0	0	0	0	0
1	1	100	80	0	40	0	40
	2	80	80	40	60	100	40
	3	100	60	80	60	80	40
	$\bar{x}$	93,33	73,33	40,00	53,33	60,00	40,00
	DE	11,55	11,55	40,00	11,55	52,92	0,00
2	1	80	80	40	40	40	20
	2	60	60	40	60	20	40
	3	60	60	40	40	20	20
	$\bar{x}$	66,67	66,67	40,00	46,67	26,67	26,67
	DE	11,55	11,55	0,00	11,55	11,55	11,55
3	1	60	60	40	40	20	20
	2	60	60	40	20	20	20
	3	60	60	20	40	20	20
	$\bar{x}$	60,00	60,00	33,33	33,33	20,00	20,00
	DE	0,00	0,00	11,55	11,55	0,00	0,00

$\bar{x}$: Promedio; DE: Desviación estándar

ANEXO 37. GRADOS DE LIBERTAD OBTENIDOS PARA LA COMPARACIÓN DE IGUALDAD DE TENDENCIAS ENTRE LOTES EN LA PRUEBA DE ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LA LEVADURA Lv027 ALMACENADA A 8°C, 18°C Y 28°C.

Comparación	Temperatura de almacenamiento (°C)					
	8		18		28	
	Numerador	Denominador	Numerador	Denominador	Numerador	Denominador
Modelos	2	20	2	20	2	20
Pendientes	1	20	1	20	1	20
Interceptos	1	21	1	21	1	21

ANEXO 38. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DEL GRANULADO EMPACADO AL VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura de almacenamiento (°C)	8			18			28		
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	66000,00	58000,00	124000,00	57200,00	35600,00	92800,00	40800,00	26400,00	67200,00
A	90,67	81,33	86,00	90,00	70,67	80,33	79,33	68,00	73,67
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-12,67	-8,67	-10,67	-16,67	-12,67	-14,67	-17,33	-18,67	-18,00
SUM xy	1100,00	1100,00	2200,00	920,00	740,00	1660,00	700,00	440,00	1140,00
SUM y	860,00	820,00	1680,00	780,00	620,00	1400,00	640,00	480,00	1120,00
SCR	1960,00	840,00	2800,00	2333,33	1160,00	3493,33	2160,00	1973,33	4133,33
SCR_T			2986,67			4680,00			5213,33

ANEXO 39. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DEL GRANULADO EMPACADO SIN VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura de almacenamiento (°C)	8			18			28		
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	60000,00	47200,00	107200,00	20400,00	20800,00	41200,00	19600,00	19600,00	39200,00
A	92,67	82,00	87,33	56,00	64,67	60,33	56,67	58,67	57,67
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-17,33	-14,67	-16,00	-20,67	-25,33	-23,00	-23,33	-24,67	-24,00
SUM xy	940,00	860,00	1800,00	140,00	100,00	240,00	40,00	20,00	60,00
SUM y	800,00	720,00	1520,00	300,00	320,00	620,00	260,00	260,00	520,00
SCR	2160,00	773,33	2933,33	6493,33	2640,00	9133,33	5800,00	4840,00	10640,00
SCR_T			3253,33			9313,33			10653,33

ANEXO 40. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LA BIOMASA DE Lv027 EMPACADA CON VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura de almacenamiento (°C)	8			18			28		
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	72800,00	69200,00	142000,00	55600,00	53200,00	108800,00	59200,00	44400,00	103600,00
A	86,67	84,00	85,33	78,00	82,00	80,00	90,67	79,33	85,00
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-6,67	-6,00	-6,33	-8,67	-11,33	-10,00	-16,00	-14,00	-15,00
SUM xy	1280,00	1260,00	2540,00	1040,00	1000,00	2040,00	960,00	840,00	1800,00
SUM y	920,00	900,00	1820,00	780,00	780,00	1560,00	800,00	700,00	1500,00
SCR	1600,00	1160,00	2760,00	3773,33	573,33	4346,67	2026,67	626,67	2653,33
SCR_T			2780,00			4400,00			3100,00

ANEXO 41. PARÁMETROS NECESARIOS PARA ESTIMAR EL VALOR DE F CALCULADO EN LA ESTABILIDAD DE LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LA BIOMASA DE Lv027 EMPACADA SIN VACÍO Y ALMACENADO A 8°C, 18°C Y 28°C.

Temperatura de almacenamiento (°C)	8			18			28		
Lote	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**	**1**	**2**	**1 + 2**
SUM y^2	70000,00	60000,00	130000,00	35600,00	38400,00	74000,00	39200,00	27600,00	66800,00
A	88,00	80,00	84,00	69,33	75,33	72,33	78,67	70,67	74,67
SUM x	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00	18,00	18,00	36,00
B	-8,67	-6,67	-7,67	-14,00	-14,67	-14,33	-21,33	-19,33	-20,33
SUM xy	1220,00	1160,00	2380,00	660,00	740,00	1400,00	520,00	460,00	980,00
SUM y	900,00	840,00	1740,00	580,00	640,00	1220,00	560,00	500,00	1060,00
SCR	1373,33	533,33	1906,67	4626,67	1040,00	5666,67	6240,00	1160,00	7400,00
SCR_T			2086,67			5820,00			7580,00

ANEXO 42. EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C.

TIEMPO (MESES)	RÉPLICA	8°C			
		T1	T2	T3	T4
0	1	80	80	80	80
	2	80	0	80	80
	3	80	80	80	80
	4	80	80	80	80
	5	80	0	80	80
	6	80	80	80	80
	promedio	80,00	53,33	80,00	80,00
1	1	80	60	80	80
	2	80	80	80	60
	3	80	80	60	60
	4	80	80	100	80
	5	80	60	80	80
	6	60	60	80	60
	Promedio	76,67	70,00	80,00	70,00
2	1	60	60	80	80
	2	80	60	60	60
	3	60	60	60	60
	4	80	60	60	80
	5	60	60	80	60
	6	60	60	60	60
	Promedio	66,67	60,00	66,67	66,67
3	1	40	40	80	60
	2	40	40	60	60
	3	60	20	60	60
	4	60	20	60	60
	5	40	40	80	60
	6	60	40	60	60
	Promedio	50,00	33,33	66,67	60,00

ANEXO 43. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C.

KRUSKAL WALLIS

STATISTIX FOR WINDOWS 10/21/08, 9:49

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV

VARIABLE	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
E0B8	72.0	6
E0BV8	72.0	6
E0G8	72.0	6
E0GV8	72.0	6
E1B8	50.5	6
E1BV8	68.8	6
E1G8	50.5	6
E1GV8	64.8	6
E2B8	43.3	6
E2BV8	43.3	6
E2G8	29.0	6
E2GV8	43.3	6
E3B8	29.0	6
E3BV8	43.3	6
E3G8	4.5	6
E3GV8	17.5	6
TOTAL	48.5	96

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 63.1753
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0000

PARAMETRIC AOV APPLIED TO RANKS

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	15	39969.0	2664.60	10.59	0.0000
WITHIN	80	20134.5	251.681		
TOTAL	95	60103.5			

TOTAL NUMBER OF VALUES THAT WERE TIED 95
MAX. DIFF. ALLOWED BETWEEN TIES 0.00001

CASES INCLUDED 96 MISSING CASES 0

COMPARACIÓN DE MEDIAS

STATISTIX FOR WINDOWS 10/21/08, 9:49

COMPARISONS OF MEAN RANKS

VARIABLE	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
E0B8	72.000	I
E0BV8	72.000	I
E0G8	72.000	I
E0GV8	72.000	I
E1BV8	68.833	I
E1GV8	64.833	I
E1B8	50.500	I I
E1G8	50.500	I I
E2B8	43.333	I I
E2BV8	43.333	I I
E2GV8	43.333	I I
E3BV8	43.333	I I
E2G8	29.000	I I
E3B8	29.000	I I
E3GV8	17.500	I I
E3G8	4.5000	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL Z VALUE 3.53
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 56.762

ANEXO 44. EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 18°C.

TIEMPO (MESES)	RÉPLICA	18°C			
		T1	T2	T3	T4
0	1	80	80	80	80
	2	80	80	80	80
	3	80	80	80	80
	4	80	80	80	80
	5	80	80	80	80
	6	80	80	80	80
	promedio	80,00	80,00	80,00	80,00
1	1	80	40	40	20
	2	60	40	60	20
	3	80	60	40	40
	4	40	20	80	40
	5	40	20	60	60
	6	60	20	80	60
	promedio	60,00	33,33	60,00	40,00
2	1	40	20	60	40
	2	40	20	60	40
	3	60	0	60	40
	4	40	20	60	40
	5	40	0	60	60
	6	40	0	60	40
	promedio	43,33	10,00	60,00	43,33
3	1	40	20	40	40
	2	40	0	60	40
	3	40	0	60	20
	4	40	0	40	40
	5	40	0	40	20
	6	40	0	60	40
	promedio	40,00	3,33	50,00	33,33

ANEXO 45. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 18°C.

KRUSKAL WALLIS

STATISTIX FOR WINDOWS 18OCT, 10/21/08, 9:51

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV

VARIABLE	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
E0B18	82.5	6
E0BV18	82.5	6
E0G18	82.5	6
E0GV18	82.5	6
E1B18	36.2	6
E1BV18	59.0	6
E1G18	28.6	6
E1GV18	59.0	6
E2B18	39.1	6
E2BV18	59.5	6
E2G18	9.3	6
E2GV18	39.1	6
E3B18	28.0	6
E3BV18	47.3	6
E3G18	6.1	6
E3GV18	35.0	6
TOTAL	48.5	96

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 79.8557
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0000

PARAMETRIC AOV APPLIED TO RANKS

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	15	57812.6	3854.17	28.12	0.0000
WITHIN	80	10963.9	137.049		
TOTAL	95	68776.5			

TOTAL NUMBER OF VALUES THAT WERE TIED 96
MAX. DIFF. ALLOWED BETWEEN TIES 0.00001

CASES INCLUDED 96 MISSING CASES 0

COMPARACIÓN DE MEDIAS

STATISTIX FOR WINDOWS 18OCT, 10/21/08, 9:52

COMPARISONS OF MEAN RANKS

VARIABLE	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
E0B18	82.500	I
E0BV18	82.500	I
E0G18	82.500	I
E0GV18	82.500	I
E2BV18	59.500	I I
E1BV18	59.000	I I
E1GV18	59.000	I I
E3BV18	47.250	I I
E2B18	39.083	I I
E2GV18	39.083	I I
E1B18	36.167	I I
E3GV18	35.000	I I
E1G18	28.583	I I
E3B18	28.000	I I
E2G18	9.2500	.. I
E3G18	6.0833	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL Z VALUE 3.53
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 56.762

ANEXO 46. EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 28°C.

TIEMPO (MESES)	RÉPLICA	28°C			
		T1	T2	T3	T4
0	1	80	80	80	80
	2	80	80	80	80
	3	80	80	80	80
	4	80	80	80	80
	5	80	80	80	80
	6	80	80	80	80
	promedio	80,00	80,00	80,00	80,00
1	1	80	20	20	20
	2	60	40	40	0
	3	60	40	40	0
	4	40	0	80	40
	5	40	0	60	40
	6	20	20	60	40
	promedio	50,00	20,00	50,00	23,33
2	1	20	0	40	40
	2	40	20	60	20
	3	40	0	60	20
	4	20	0	40	20
	5	20	0	60	40
	6	40	0	40	20
	promedio	30,00	3,33	50,00	26,67
3	1	40	0	40	20
	2	40	0	40	20
	3	20	0	40	20
	4	20	0	40	20
	5	20	0	40	20
	6	20	0	40	20
	promedio	26,67	0,00	40,00	20,00

ANEXO 47. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DURANTE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 28°C.

KRUSKAL WALLIS

STATISTIX FOR WINDOWS 28OCT, 10/21/08, 9:54

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV

VARIABLE	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
E0B28	83.5	6
E0BV28	83.5	6
E0G28	83.5	6
E0GV28	83.5	6
E1B28	32.7	6
E1BV28	57.8	6
E1G28	28.7	6
E1GV28	57.8	6
E2B28	35.0	6
E2BV28	59.0	6
E2G28	11.2	6
E2GV28	39.0	6
E3B28	27.0	6
E3BV28	51.0	6
E3G28	8.0	6
E3GV28	35.0	6
TOTAL	48.5	96

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 80.0739
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0000

PARAMETRIC AOV APPLIED TO RANKS

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	15	58696.3	3913.08	28.61	0.0000
WITHIN	80	10941.3	136.766		
TOTAL	95	69637.5			

TOTAL NUMBER OF VALUES THAT WERE TIED 96
MAX. DIFF. ALLOWED BETWEEN TIES 0.00001

CASES INCLUDED 96 MISSING CASES 0

COMPARACIÓN DE MEDIAS

STATISTIX FOR WINDOWS 28OCT, 10/21/08, 9:55

COMPARISONS OF MEAN RANKS

VARIABLE	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
E0B28	83.500	I
E0BV28	83.500	I
E0G28	83.500	I
E0GV28	83.500	I
E2BV28	59.000	I I
E1BV28	57.750	I I
E1GV28	57.750	I I
E3BV28	51.000	I I
E2GV28	39.000	I I
E2B28	35.000	I I
E3GV28	35.000	I I
E1B28	32.667	I I
E1G28	28.667	I I
E3B28	27.000	I I
E2G28	11.167	.. I
E3G28	8.0000	.. I

THERE ARE 2 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

REJECTION LEVEL 0.050
CRITICAL Z VALUE 3.53
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 56.762

ANEXO 48. PÉRDIDA DE EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C, 18°C Y 28°C.

	8°C				18°C				28°C			
Réplica	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**
1	50,00	50,00	0,00	25,00	50,00	75,00	50,00	50,00	50,00	100,00	50,00	75,00
2	50,00	50,00	25,00	25,00	50,00	100,00	25,00	50,00	50,00	100,00	50,00	75,00
3	25,00	75,00	25,00	25,00	50,00	100,00	25,00	75,00	75,00	100,00	50,00	75,00
4	25,00	75,00	25,00	25,00	50,00	100,00	50,00	50,00	75,00	100,00	50,00	75,00
5	50,00	50,00	0,00	25,00	50,00	100,00	50,00	75,00	75,00	100,00	50,00	75,00
6	25,00	50,00	25,00	25,00	50,00	100,00	25,00	50,00	75,00	100,00	50,00	75,00
promedio	37,50	58,33	16,67	25,00	50,00	95,83	37,50	58,33	66,67	100,00	50,00	75,00

ANEXO 49. ANÁLISIS ESTADÍSTICO APLICADO A LOS DATOS DE PÉRDIDAS DE EFICACIA DE LA LEVADURA Lv027 FORMULADA Y SIN FORMULAR DESPUÉS DE TRES MESES DE ALMACENAMIENTO A 8°C, 18°C Y 28°C.

KRUSCAL WALLIS

STATISTIX FOR WINDOWS %EFICA, 10/16/08, 12:20

KRUSKAL-WALLIS ONE-WAY NONPARAMETRIC AOV

VARIABLE	MEAN RANK	SAMPLE SIZE
BCV18	21.5	6
BCV28	32.5	6
BCV8	7.5	6
BSV18	39.7	6
BSV28	54.0	6
BSV8	10.5	6
GCV18	32.5	6
GCV28	46.8	6
GCV8	21.5	6
GSV18	64.8	6
GSV28	67.0	6
GSV8	39.7	6
TOTAL	36.5	72

KRUSKAL-WALLIS STATISTIC 62.1691
P-VALUE, USING CHI-SQUARED APPROXIMATION 0.0000

PARAMETRIC AOV APPLIED TO RANKS

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	11	24990.7	2271.88	38.40	0.0000
WITHIN	60	3549.83	59.1639		
TOTAL	71	28540.5			

TOTAL NUMBER OF VALUES THAT WERE TIED 72
MAX. DIFF. ALLOWED BETWEEN TIES 0.00001

CASES INCLUDED 72 MISSING CASES 0

COMPARACIÓN DE MEDIAS

STATISTIX FOR WINDOWS %EFICA, 10/16/08, 12:21

COMPARISONS OF MEAN RANKS

VARIABLE	MEAN RANK	HOMOGENEOUS GROUPS
GSV28	67.000	I
GSV18	64.833	I
BSV28	54.000	I I
GCV28	46.833	I I I
BSV18	39.667	I I I
GSV8	39.667	I I I
BCV28	32.500	I I I
GCV18	32.500	I I I
BCV18	21.500	.. I I
GCV8	21.500	.. I I
BSV8	10.500	 I
BCV8	7.5000	 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE
NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

REJECTION LEVEL	0.050
CRITICAL Z VALUE	3.37
CRITICAL VALUE FOR COMPARISON	40.694