

**UNIVERSIDAD NACIONAL**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR**  
**ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**LICENCIATURA EN AGRONOMIA**

**EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DE CONIDIOS DE *Trichoderma longibrachiatum***  
**MICROENCAPSULADOS, COMO ESTRATEGIA PARA PROLONGAR LA VIDA**  
**ÚTIL DEL HONGO COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO**

Trabajo de graduación sometido a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía con énfasis en Agricultura Alternativa.

Modalidad de Artículo Científico

**Bach. LUIS DIEGO ARIAS CHAVARRÍA**

Heredia, Costa Rica

Marzo, 2023

Trabajo de graduación aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, para optar por el grado de Licenciatura en Agronomía con énfasis en Agricultura Alternativa bajo la modalidad de Artículo Científico.

## MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

.....  
M.Sc. María del Rocío Ugalde Salazar  
Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

.....  
M.Sc Andrés Alpízar Naranjo  
Director de la Escuela de Ciencias  
Agrarias

.....  
Lic. Steffany Orozco Cayasso  
Tutora

.....  
P.hD. Gabriela Montes de Oca Vásquez  
Lectora

.....  
M.Sc. Alejandro Vargas Martínez  
Lector

.....  
Bach. Luis Diego Arias Chavarría  
Postulante

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Escala de clases para la evaluación del grado de antagonismo de <i>Trichoderma</i> ...	12
<b>Cuadro 2.</b> Eficiencia de encapsulación de conidios en las diferentes formulaciones de microcápsulas.....	22
<b>Cuadro 3.</b> Bandas de absorción de los compuestos utilizados para las distintas formulaciones de microcápsulas.....	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microcápsulas formuladas con tensoactivo Span 80 al 5% (A y B). Microcápsulas formuladas con tensoactivo Tween 20 al 5% (C y D). .....	14
<b>Figura 2.</b> Microcápsulas formuladas a diferentes velocidades de agitación con Tween 20 al 5%. A) 600 rpm, B) 800 rpm, C) 1000 rpm.....	15
<b>Figura 3.</b> Evaluación de diferentes concentraciones del tensoactivo Tween 20 a una velocidad de agitación de 1000 rpm. A) 5%, B) 7,5%, C) 10%. .....	15
<b>Figura 4.</b> Fibras de celulosa de algodón (A). Fibras de nanocelulosa de algodón obtenidas a partir de tratamiento con sonicación (B).....	16
<b>Figura 5.</b> Microcápsulas sin conidios (A-D) y con conidios de <i>T. longibrachiatum</i> (E-H). Microcápsulas Alg (A y E), AlgNc (B y F), AlgCh (C y G), AlgChNc (D y H). .....	18
<b>Figura 6.</b> Análisis termogravimétrico (TGA) de las microcápsulas formuladas con alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa para la encapsulación de conidios de <i>T. longibrachiatum</i> . .....	19
<b>Figura 7.</b> Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de las microcápsulas formuladas con alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa para la encapsulación de conidios de <i>T. longibrachiatum</i> .....	20
<b>Figura 8.</b> Espectro FTIR de las formulaciones de alginato de sodio (Alg), alginato de sodio y nanocelulosa (AlgNc), Alginato de sodio y quitosano (AlgCh) y alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa (AlgChNc).....	21
<b>Figura 9.</b> Espectro FTIR de las formulaciones de microcápsulas con conidios de <i>T. longibrachiatum</i> . Alginato de sodio (Alg+Tr), alginato de sodio y nanocelulosa (AlgNc+Tr), Alginato de sodio y quitosano (AlgCh+Tr) y alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa (AlgChNc+Tr). .....	22
<b>Figura 10.</b> Velocidad de liberación de conidios encapsulados en las diferentes formulaciones desarrolladas. ....	24
<b>Figura 11.</b> Viabilidad conidial de 4 microencapsulados de <i>T. longibrachiatum</i> en Alg, AlgCh, AlgChNc y AlgNC, y una formulación convencional (TL), expuestos a tres diferentes temperaturas de almacenamiento (5, temperatura ambiente y 37 °C). .....	26
<b>Figura 12.</b> Antagonismo in vitro de AlgChNc + <i>T. longibrachiatum</i> vs <i>F. oxysporum</i> posterior a la exposición de la formulación a tres diferentes temperaturas. ....	27
<b>Figura 13.</b> Antagonismo in vitro de los conidios de <i>T. longibrachiatum</i> microencapsulado vs <i>F. oxysporum</i> posterior a la exposición de la formulación a tres diferentes temperaturas. ....	46

# **Evaluación de la viabilidad de conidios de *Trichoderma longibrachiatum* microencapsulados, como estrategia para prolongar la vida útil del hongo como agente de control biológico**

Arias-Chavarría Luis Diego<sup>1</sup>, Batista-Menezes Diego<sup>2</sup>, Orozco-Cayasso Steffany<sup>1</sup>, Vargas-Martínez Alejandro<sup>1</sup>, Montes de Oca-Vásquez Gabriela<sup>2</sup>.

Afiliaciones:

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Costa Rica, Campus Omar Dengo, 86-3000 Heredia, Costa Rica

<sup>2</sup>Laboratorio Nacional de Nanotecnología, Centro Nacional de Alta Tecnología, 10109 Pavas, San José, Costa Rica

## **Resumen**

*Trichoderma* es un género de hongos antagonistas que se ha utilizado para el control de fitopatógenos. Sin embargo, la eficacia de las formulaciones comerciales se ha visto afectada por factores bióticos y abióticos, que pueden disminuir su viabilidad, por lo que la microencapsulación con el uso de polímeros surge como mecanismo que contribuye a la protección de los conidios. En esta investigación, se desarrollaron microcápsulas de alginato de sodio (Alg) y alginato de sodio reforzado con nanocelulosa (AlgNc) y/o quitosano (AlgCh y AlgChNc), mediante el método de emulsión-gelificación interna, para encapsular los conidios de *Trichoderma longibrachiatum*. Se evaluó la viabilidad de los conidios microencapsulados a través de la exposición a diferentes condiciones de temperatura (ambiente, 5 y 37 °C), así como su potencial antagonista *in vitro*, en contra de *Fusarium oxysporum*. Las cuatro formulaciones evaluadas obtuvieron eficiencias de encapsulación por encima del 92% y las microcápsulas de AlgChNc fueron las únicas que mantuvieron una viabilidad del 100% a 37 °C durante 2 meses. Además, todas las formulaciones evaluadas conservaron la capacidad antagonista en contra de *F. oxysporum*. Estos hallazgos respaldan el uso de alginato, nanocelulosa y quitosano para la formulación de microcápsulas que permitan mantener la viabilidad de conidios de *T. longibrachiatum* en el tiempo y a diferentes condiciones de temperatura.

**Keywords:** Microcapsulas; Alginato; Quitosano; Nanocelulosa; Viabilidad; Control Fitopatogénico

## 1. Introducción

El uso continuo de agroquímicos para el manejo de enfermedades de plantas ha generado diversos problemas ambientales y de salud, por lo que las estrategias de control biológico han ganado importancia en los últimos años (Chandrika, Prasad y Godbole, 2019; Sehrawat, Sindhu y Glick, 2022). El uso de microorganismos benéficos como hongos y bacterias (Herrera, Valbuena y Pavone, 2020, Asaturova et al., 2021, Elnahal et al., 2022), tiene como ventaja que permite el control de plagas y enfermedades, y reduce el riesgo de desarrollo de resistencia a plaguicidas (Saberri y Moradi, 2021). Los hongos del género *Trichoderma* se utilizan como agentes de control biológico (ACB) y como promotores del crecimiento de las plantas (PGPF) (Oskiera et al., 2017; Chagas et al., 2017; Hewedy et al., 2022). La especie *T. longibrachiatum* se ha evaluado en el control de enfermedades y plagas, la producción de metabolitos que intervienen en esos procesos, así como los compuestos que estimula en las plantas bajo condiciones de estrés (Zhang et al., 2018; Sornakili., 2020; Sridharan et al., 2021, TariqJaveed et al., 2021; Poveda, 2021).

Se han desarrollado diversas estrategias para crear formulaciones de *Trichoderma* a partir de la biomasa del hongo (Sriram, Roopa y Savitha, 2011; Srivastava et al., 2015; Srivastava et al., 2016), sin embargo, estos productos presentan ciertas desventajas, como su baja viabilidad y estabilidad (Rivera, Brenes y Zúñiga, 2018), lo que dificulta que estos microorganismos puedan establecerse y expresar todo su potencial antagonista para el control de fitopatógenos o plagas (Braga et al., 2019). El desarrollo de formulaciones debe asegurar la protección y el mantenimiento de la viabilidad de los conidios o micelio de hongos antagonistas (Locatelli et al., 2018, Mulatu et al., 2021). La encapsulación de conidios es una estrategia que se puede utilizar para superar las limitaciones ambientales y otorgar al antagonista una ventaja competitiva sobre los patógenos y otra microflora (Jafari et al., 2017; Locatelli et al, 2018; Fraceto et al., 2018; Saberri et al., 2021). Las microcápsulas se producen normalmente a partir de la formación de gotas de líquidos, ya sea mediante goteo o emulsionando y solidificando las gotas de líquido para formar partículas (Bejarano y Puopolo, 2020). Diversos polímeros han sido utilizados para la encapsulación de compuestos activos (Shishir et al., 2018) y de agentes de control biológico, dentro de los que se encuentran alginato, almidón, pectina, celulosa, carragenanos, agar y quitosano (Oberoi et al., 2019; Chaudhary y Shukla, 2020; Saberri et al., 2021).

El alginato es un polisacárido natural derivado de algas pardas con una estructura básica de polímeros lineales no ramificados (Kargarzadeh et al., 2018; Murugappan y Muthadhi, 2022).

Este, se ha utilizado para microencapsular conidios de *Trichoderma* con el fin de mantener la viabilidad de las formulaciones (Locatelli et al., 2018; Mancera et al., 2019, Adzmi et al., 2021), así como potenciar sus características antagónicas (El-Katatny et al., 2003). Por otra parte, el quitosano se ha utilizado en la agricultura en la encapsulación de agroquímicos y micronutrientes (Kashyap, Xiang y Heiden, 2015), además, se ha encontrado que presenta sinergismo con *Trichoderma* para el control de enfermedades (Singh y Chittenden, 2021). Así mismo, la nanocelulosa, obtenida a partir de la celulosa de las plantas o sintetizado por algunas bacterias, mejora las propiedades mecánicas y físicas de materiales y de otras matrices poliméricas (Kargarzadeh et al., 2018; Gan et al., 2020).

A la fecha, se conoce muy poco sobre el uso de aditivos como el quitosano y la nanocelulosa para mejorar las características de las micropartículas de alginato, además, faltan estudios que permitan entender cómo factores como el tiempo de almacenamiento, la temperatura y la humedad afectan la viabilidad de las formulaciones del hongo, principalmente en condiciones más reales de exposición de *Trichoderma* en el campo (Locatelli et al, 2018). Debido a lo anterior, en el presente estudio se evaluó el efecto de la microencapsulación de *Trichoderma longibrachiatum* mediante la medición de la viabilidad de los conidios al exponerlos a diferentes condiciones de temperatura, como estrategia para prolongar la vida útil del hongo como agente de control biológico.

## 2. Metodología

### 2.1. Microorganismo

El hongo *Trichoderma longibrachiatum* fue proporcionado por el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional, el cual había sido previamente recuperado de la rizosfera de suelos destinados a la producción de piña (*Ananas comosus* L. Merr) en la zona de Puerto Viejo de Sarapiquí, con la finalidad de realizar pruebas para el control de *Fusarium oxysporum*, segundo fitopatógeno de importancia en este cultivo en Costa Rica. *T. longibrachiatum* se encontraba en condiciones de almacenamiento a 10 °C en viales con aceite mineral estéril.

### 2.2. Reactivación de *Trichoderma longibrachiatum*

Los aislamientos almacenados en viales se transfirieron a platos Petri conteniendo el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), los cuales se incubaron durante siete días a 28 °C, hasta que las colonias estuvieron densamente pobladas y esporuladas cubriendo los platos. Posteriormente, para una mayor recuperación del vigor de crecimiento de los aislamientos, se procedió a cortar discos de 1 cm de diámetro en la región entre el centro y el borde de las colonias, y se transfirieron a nuevos platos conteniendo medio de cultivo PDA. Estos se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente.

### 2.3. Producción de esporas de *T. longibrachiatum*

Se tomó un plato con cultivo puro y esporulado de la cepa de *T. longibrachiatum*, se realizó un raspado del micelio con un bisturí estéril y se colocó en 20 ml de agua destilada estéril. La concentración de la suspensión de conidios se determinó con la ayuda de un hemocitómetro, según la metodología descrita por French y Hebert (1980). Para esto, se utilizó una cámara de Neubauer y se realizó un conteo de la cantidad de propágulos en cinco cuadros secundarios. Por último, se ajustaron las suspensiones para obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  y poder utilizarlas para la microencapsulación y la formulación convencional.

### 2.4. Formulación convencional de *Trichoderma longibrachiatum*

Se colocaron 100 g de arroz en un beaker y se le realizaron lavados con agua hasta que esta no se observara turbia. Posteriormente, se adicionó antibiótico, se agitó y se dejó reposar por 5 minutos. Se descartó el agua con el antibiótico y se colocó el arroz en bolsas de poliestireno cerradas herméticamente. El arroz fue autoclavado durante 40 min a 121 °C, con 1,2 Kg/cm<sup>2</sup>.

Una vez esterilizado, se procedió a colocar una alícuota de 5 ml de la suspensión de conidios ( $1 \times 10^6$  conidios  $\text{mL}^{-1}$ ) descrita anteriormente, en el arroz contenido en la bolsa, esta se selló y se incubó a temperatura ambiente hasta que se observó el crecimiento de micelio y la producción de esporas. Una vez listo el sustrato con el inóculo se colocaron 25 g en frascos plásticos para las pruebas de viabilidad.

### **2.5. Preparación de nanocelulosa**

Se preparó una solución de fibras de celulosa de algodón (Sigma-aldrich, MO, USA) al 1,2% y se colocó en baño ultrasónico por 10 min. Posteriormente, la solución fue sonicada durante una hora a 700 W (QSONICA Q700, Newton, CT, USA), con una amplitud del 40% y ciclos de 50s ON y 10 s OFF, durante la sonicación la muestra se mantuvo en frío. Posteriormente, la solución se dejó en reposo por 30 minutos para que precipitara y se extrajo el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 3500 rpm durante 5 min. El precipitado obtenido fue descartado y el sobrenadante se centrifugó dos veces a 10000 rpm durante 5 min, conservando el precipitado en ambas centrifugaciones. Por último, el precipitado se secó en la estufa a 35 °C y se almacenó a 4 °C para posteriores análisis de SEM.

### **2.6. Diseño experimental de la formulación de las microcápsulas**

Se desarrollaron microcápsulas siguiendo la metodología descrita por Lupo et al. (2014) con algunas modificaciones. Con el fin de estandarizar el método se evaluó primeramente el tipo de tensoactivo (Span 80 y Tween 20) al 5% y posteriormente la concentración del tensoactivo Tween 20 (5, 7,5 y 10%). Una vez determinado el tipo y concentración del tensoactivo, se compararon diferentes velocidades de agitación (600, 800 y 1000 rpm), y con el mejor resultado obtenido, se evaluaron tres concentraciones de quitosano y nanocelulosa (0,25, 0,5 y 1%) como polímeros de recubrimiento y refuerzo, respectivamente.

Para la formulación con alginato (**Alg**), se preparó una solución de 10 ml de alginato de sodio al 2% (p/p) a la cual se le adicionó 1 ml de una solución de  $\text{CaCO}_3$  0,5 M. Posteriormente, se mezcló con un homogeneizador (Ultra-Turrax, IKA, T25, Alemania) durante 3 minutos a 12000 rpm y se dejó en refrigeración durante 1 hora para hidratar y eliminar las burbujas de aire. La mezcla anterior (fase dispersa) se dispersó en 40 ml de aceite de soja con Tween 20 al 5% (p/p). Para favorecer la formación de la emulsión agua en aceite (W/O), la fase dispersa se suministró gota a gota de forma controlada con ayuda de una jeringa con agitación constante durante 15 min a 1000 rpm. Posteriormente, se indujo la gelificación de las gotas de alginato de sodio en emulsión con la adición controlada de una mezcla compuesta por 10 ml de aceite

de soja y 80 µl de ácido acético glacial. Las microcápsulas formadas se separaron de la fase oleosa con la adición de 100 ml de solución acuosa de CaCl<sub>2</sub> 0,05 M conteniendo 10% (p/p) de Tween 20 bajo agitación durante 15 min a 650 rpm.

Para las formulaciones de alginato con quitosano (0,5%) (**AlgCh**), alginato y nanocelulosa (0,5%) (**AlgNc**) y alginato, quitosano (0,5%) y nanocelulosa (0,5%) (**AlgChNc**), se siguió la metodología descrita anteriormente, con la adición de los polímeros a la fase dispersa con el alginato de sodio.

### **2.7. Microencapsulación de *Trichoderma longibrachiatum***

La microencapsulación de los conidios del hongo se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto anterior, con la adición de 10 ml de suspensión conidial ( $1 \times 10^6$  conidios ml<sup>-1</sup>) a la fase dispersa, seguida de agitación durante 20 minutos con ayuda de un agitador magnético, antes de preparar la emulsión al mezclar con el aceite de soja. Las microcápsulas obtenidas fueron filtradas utilizando un filtro para café y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. El secado se realizó a temperatura ambiente por 24 h y las microcápsulas secas se envasaron para posteriores análisis.

## **2.8. Caracterización de las microcápsulas**

### **2.8.1. Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)**

Las microcápsulas con y sin conidios se analizaron por duplicado, utilizando un espectrómetro infrarrojo Nicolet 6700 FT-IR (Thermo Fisher Scientific, USA). Las muestras se colocaron directamente en el equipo sin ningún tipo de tratamiento previo. Se realizó un barrido en el rango de 500 – 4000 cm<sup>-1</sup>. Los espectros fueron analizados con el software OMNIC 8.1 (OMNIC Series 8.1.10, Thermo Fisher Scientific, USA).

### **2.8.2. Análisis termogravimétrico (TGA)**

Las microcápsulas sin conidios se analizaron por duplicado utilizando un analizador termogravimétrico TGA-Q500 (TA Instruments, USA), equipado con el software Universal Analysis 2000 (versión 4.5A, TA Instruments, USA). Se utilizó un flujo de purga de nitrógeno en balanza de 40 mL/min y de purga en muestra de 60 mL/min. Inicialmente se mantuvo el equipo en equilibrio a 25 °C por 5 min y posteriormente, se realizó el calentamiento a 10 °C/min, en un rango de temperatura de 25 a 600 °C.

### **2.8.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)**

Las microcápsulas sin conidios se analizaron por duplicado mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC) (Q200, TA Instruments, USA), con el software TA Universal Analysis. Para el análisis se utilizaron rampas de temperatura que cubren un ciclo desde 25 °C hasta 200 °C, con una velocidad de 10 °C/min.

### **2.8.4. Microscopio electrónico de barrido (SEM)**

Las microcápsulas con y sin conidios se analizaron por duplicado, tomando imágenes a diferentes magnificaciones, utilizando el equipo SEM (JEOL, JSM-6390 LV, Japón), operando a una aceleración de voltaje entre 5 y 10 kV, con electrones secundarios (SEI) y un spot size entre 30 y 50.

## **2.9. Eficiencia de encapsulación**

Para determinar la eficiencia de encapsulación, se añadieron 50 mg de las microcápsulas en 10 ml de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  ( $0.2 \text{ mol dm}^{-3}$ ) y  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0.06 \text{ mol dm}^{-3}$ ), y se agitaron durante 2 h para lograr la disolución completa de las microcápsulas. Se extrajo una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  y realizó conteo de conidios mediante cámara de Neubauer en un microscopio óptico (Olympus Optical, CH, Japan). La eficiencia de encapsulación se definió a partir de la cantidad de conidios añadidos y la cantidad de conidios liberados de las microcápsulas secas.

### **2.10. Velocidad de liberación**

Para determinar la velocidad de liberación de los conidios encapsulados se utilizó un microscopio óptico (Olympus Optical, CH, Japan). Las microcápsulas secas (50 mg) se colocaron en una solución de  $\text{NaHCO}_3$  ( $0.2 \text{ mol dm}^{-3}$ ) y  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0.06 \text{ mol dm}^{-3}$ ). La duración de la inmersión fue de 0, 1, 5, 10, 30, 60, 120 y 240 min (Liu y Liu, 2009). Para cada tiempo se tomaron dos muestras y se analizaron en microscopio óptico, determinando la concentración conidial con ayuda de una cámara de Neubauer.

### **2.11. Tolerancia conidial a temperatura**

Para determinar la tolerancia conidial de los conidios encapsulados y no encapsulados, se colocaron 50 mg de cada formulación en envases plásticos, los cuales se expusieron a almacenamiento con diferentes condiciones de temperatura: ambiente (20 °C, 80% HR), 5 y 37 °C con una humedad relativa del 80% en cámaras bioclimáticas. Se realizaron evaluaciones

de viabilidad conidial a los 3, 5, 7, 15, 30 y 60 días de exposición y la viabilidad se determinó con recuentos directos de conidios viables y no viables después de 24 h, utilizando un microscopio óptico con un aumento de 40X. Los conidios se consideraron viables cuando el largo del tubo germinativo fue mayor que el diámetro del conidio. Para ello, se tomaron 5 mg de las microcápsulas y se colocaron en un tubo de 2 ml al cual se le adicionaron 0,5 ml de una solución de  $\text{NaHCO}_3$  ( $0.2 \text{ mol dm}^{-3}$ ) y  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0.06 \text{ mol dm}^{-3}$ ). Se realizó vortex por 1 min para disolver las microcápsulas y se colocó una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  en un portaobjetos estéril que contenía una fina capa de medio Agar-Agua en la cara superior, el portaobjetos estaba contenido dentro de un plato Petri con papel toalla húmeda. La alícuota de las microcápsulas se esparció con una barra de vidrio sobre el medio y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se contaron 20 conidios al azar a lo largo de todo el portaobjetos, contando los conidios germinados y no germinados.

### **2.12. Pruebas de antagonismo In Vitro**

Se realizó una prueba de antagonismo *In vitro* para determinar la capacidad antagonista de *T. longibrachiatum* posterior al proceso de microencapsulación para las cuatro formulaciones expuestas a temperatura ambiente, 5 y 37 °C durante 60 días. Para esto, se disolvieron las microcápsulas en buffer ( $\text{NaHCO}_3$  ( $0.2 \text{ mol dm}^{-3}$ ) y  $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0.06 \text{ mol dm}^{-3}$ )) y se inocularon en platos Petri conteniendo el medio PDA para su crecimiento. Una vez esporulado el hongo (12 días), se tomó un disco de 5 mm, con ayuda de un sacabocados, y se colocó a 1 cm del borde de un plato Petri conteniendo medio PDA, y en el otro extremo, un disco de 5 mm del patógeno *Fusarium oxysporum* a 1 cm del borde. El plato se incubó y se evaluó a los 5, 9 y 14 días para determinar la capacidad antagonista del hongo microencapsulado. Esta prueba se realizó por duplicado para cada una de las formulaciones y se evaluaron los resultados según la escala de clases Bell et al (1982) (**Cuadro 1**).

### **2.13. Diseño experimental**

La unidad experimental y la unidad observacional para las pruebas de temperatura y almacenamiento fue un envase plástico que contenía las microcápsulas para cada formulación. La estructura de los tratamientos para las pruebas fue bifactorial, en donde el primer factor corresponde al encapsulado y no encapsulado, y el segundo factor fueron los niveles de temperatura. Para el caso del almacenamiento, fue analizado el factor de encapsulamiento y el factor tiempo (días). Cada tratamiento tuvo tres repeticiones y la estructura del ensayo fue un diseño completamente aleatorizado (DCA).

**Cuadro 1.** Escala de clases para la evaluación del grado de antagonismo de *Trichoderma*.

Clase	Descripción
1	<i>Trichoderma</i> superó por completo al patógeno y cubrió toda la superficie del medio.
2	<i>Trichoderma</i> creció por encima de al menos dos tercios de la superficie del medio.
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizaron cada uno aproximadamente la mitad de la superficie del medio (más de un tercio y menos de dos tercios) y ningún organismo pareció dominar al otro.
4	El patógeno colonizó al menos dos tercios de la superficie del medio y pareció resistir la invasión de <i>Trichoderma</i> .
5	El patógeno superó completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupó toda la superficie del medio.

**Fuente:** Bell et al. (1982).

#### 2.14. Análisis de datos

Para las variables evaluadas en la investigación, se estimaron las medidas de resumen más importantes. Para la velocidad de liberación y la tolerancia conidial a temperatura, se realizaron gráficos de puntos y líneas tomando las medias, mediante el paquete ggplot2 (Wickham, 2016) del software estadístico R versión 4.1.2 (R Core Team, 2021).

Para determinar la media de la eficiencia de encapsulación y la velocidad de liberación de los conidios microencapsulados, se estimó un intervalo de confianza para la media del 95%, para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$L_i = \underline{x} \pm T_{1-\frac{\alpha}{2};n-1} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

Donde:

i = Límite inferior y Límite superior

$\underline{x}$  = media de la variable en estudio

$T_{1-\frac{\alpha}{2};n-1}$  = estadístico de la distribución T

s = desviación estándar de la variable en estudio

n = el tamaño de la muestra

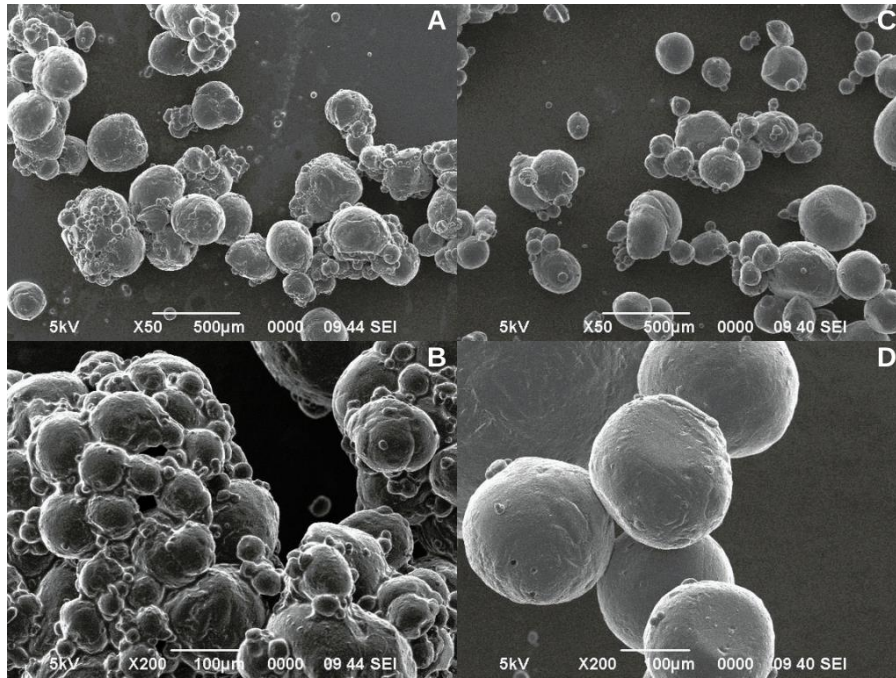
### 3. Resultados y Discusión

#### 3.1. Estandarización de la formulación de microcápsulas

Se llevaron a cabo pruebas para estandarizar la formulación de las microcápsulas de alginato mediante el método de emulsión-gelificación interna. Se evaluaron los tensoactivos Span 80 y Tween 20 (**Figura 1**), los cuales se utilizaron al 5% (p/p) en la fase oleosa de la emulsión y al 10% con  $\text{CaCl}_2$  para el endurecimiento y lavado de las microcápsulas. Las microcápsulas formuladas utilizando Span 80 mostraron circunferencia regular y superficie levemente rugosa (Figura 1A). Sin embargo, como se observa en la figura 1B, estas tendieron a aglomerarse y los tamaños observados fueron muy heterogéneos. Similarmente, Yang et al. (2004) obtuvieron microcápsulas de quitosano de forma irregular utilizando Span 80, sin embargo, la combinación de Span 80 y Tween 60 produjo microcápsulas regularmente esféricas y con superficies lisas.

Por su parte, las microcápsulas formuladas con Tween 20, presentaron circunferencia regular, y superficie lisa (Figura 1D) en comparación con las microcápsulas formuladas con Span 80, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Hwang et al. 2006, Martins et al. 2017). Además, los tamaños observados fueron más homogéneos y no se observó una tendencia a la aglomeración (Figura 1C). De manera similar, Martins et al. (2017) encontraron que la adición de Tween 20 (0,5 y 1,0% v/v) dio como resultado microcápsulas perfectamente esféricas, debido a que el tensoactivo redujo la tensión superficial de la solución de alginato y, por lo tanto, la tensión interfacial entre la gota de emulsión y la solución de alginato, lo cual aceleró el desprendimiento de la gota y la producción de cápsulas esféricas. Esto puede estar asociado a la estructura molecular más condensada del Tween 20, lo cual permite la difusión y reorganización más rápida en la superficie de las gotas (Silva et al. 2019).

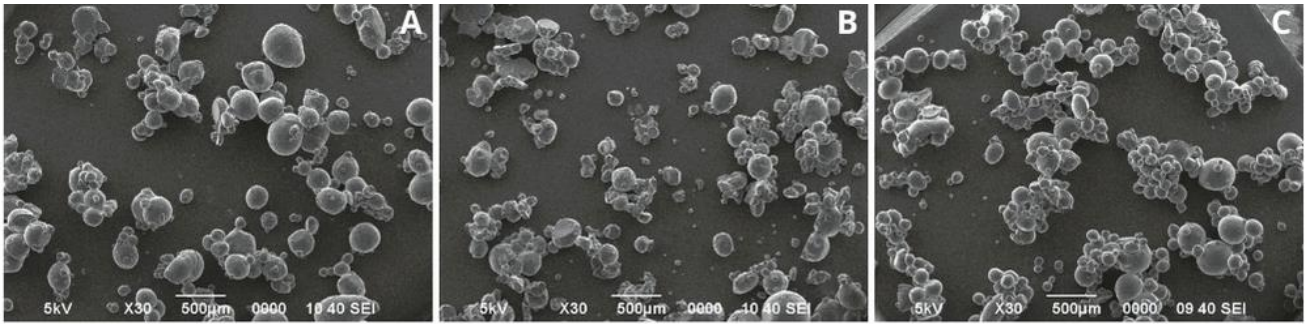
Una vez seleccionado el tensoactivo, se procedió a analizar el efecto de la velocidad de agitación en la formación de la emulsión y la reacción de gelificación, para lo cual se evaluaron tres velocidades (600, 800 y 1000 rpm) (**Figura 2**). Las microcápsulas obtenidas al utilizar 600 rpm mostraron diversidad de tamaños, circunferencia regular y superficie lisa (Figura 2A), mientras que las formuladas a 800 rpm presentaron mayor diversidad de tamaños y circunferencia irregular (Figura 2B). El mejor resultado fue obtenido cuando se empleó una velocidad de agitación de 1000 rpm, ya que estas mostraron una mayor homogeneidad de tamaño, predominando dos tamaños (100 y 300  $\mu\text{m}$ ), así como una circunferencia regular y superficie lisa (Figura 2C).



**Figura 1.** Microcápsulas formuladas con tensoactivo Span 80 al 5% (A y B). Microcápsulas formuladas con tensoactivo Tween 20 al 5% (C y D).

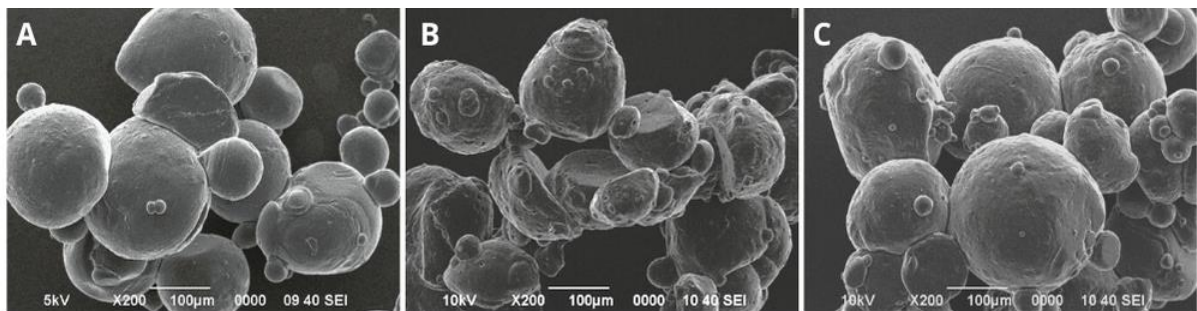
El resultado obtenido a 1000 rpm concuerda con lo encontrado por otros investigadores, los cuales determinaron que un incremento en la homogeneidad y menor tamaño de las micropartículas formadas, podría deberse a que una velocidad de agitación más alta, proporciona una mayor fuerza de corte, lo que permite dispersar mejor las gotas y evitar la aglomeración de las microcápsulas (Li et al., 2021; Bolimowski et al., 2018; Ma et al., 2020, Shi et al. 2019, Rosas et al., 2013; Dashora, Saraf y Saraf., 2007). Ma et al. (2020) obtuvieron microcápsulas de menor tamaño al aumentar la velocidad de agitación a 1000 rpm, similar a lo observado en esta investigación. Por su parte, Shi et al. (2019) evaluaron diferentes velocidades de agitación (600, 800, 1000 y 1200 rpm) y obtuvieron nanocápsulas esféricas y uniformes, sin embargo, a 1000 rpm tuvieron un tamaño más homogéneo.

Luego de identificar la velocidad de agitación que presentó los mejores resultados (1000 rpm), se evaluó la concentración del tensoactivo Tween 20 (5, 7,5 y 10%) (**Figura 3**). Las microcápsulas formuladas al 7,5% tuvieron heterogeneidad de tamaños, circunferencia irregular y superficies rugosas (Figura 3B). Las formuladas al 10%, presentaron superficies con menor rugosidad y mayor uniformidad de tamaños con respecto a las formuladas al 7,5% (Figura 3C). Las microcápsulas con Tween 20 al 5% presentaron circunferencia regular, superficie lisa, así como una mayor uniformidad de tamaños (Figura 3.A).



**Figura 2.** Microcápsulas formuladas a diferentes velocidades de agitación con Tween 20 al 5%. A) 600 rpm, B) 800 rpm, C) 1000 rpm.

De manera similar, otros autores han determinado que una mayor concentración de Tween 20 aumenta los tamaños de las microcápsulas (Teo et al. 2016). Esto podría deberse a que el aumento del tamaño de las gotas de la emulsión, al aumentar la concentración de tensioactivo, puede resultar en una mayor viscosidad del tensioactivo en la interfase, evitando la fluidez y el fácil movimiento de la fase orgánica hacia la fase acuosa (Barzegar et al., 2018). Por su parte, Baranauskaite et al. (2019) determinaron que la composición óptima para su formulación de microcápsulas incluía la adición de Tween 20 en un 4,7%, similar al porcentaje determinado en esta investigación.

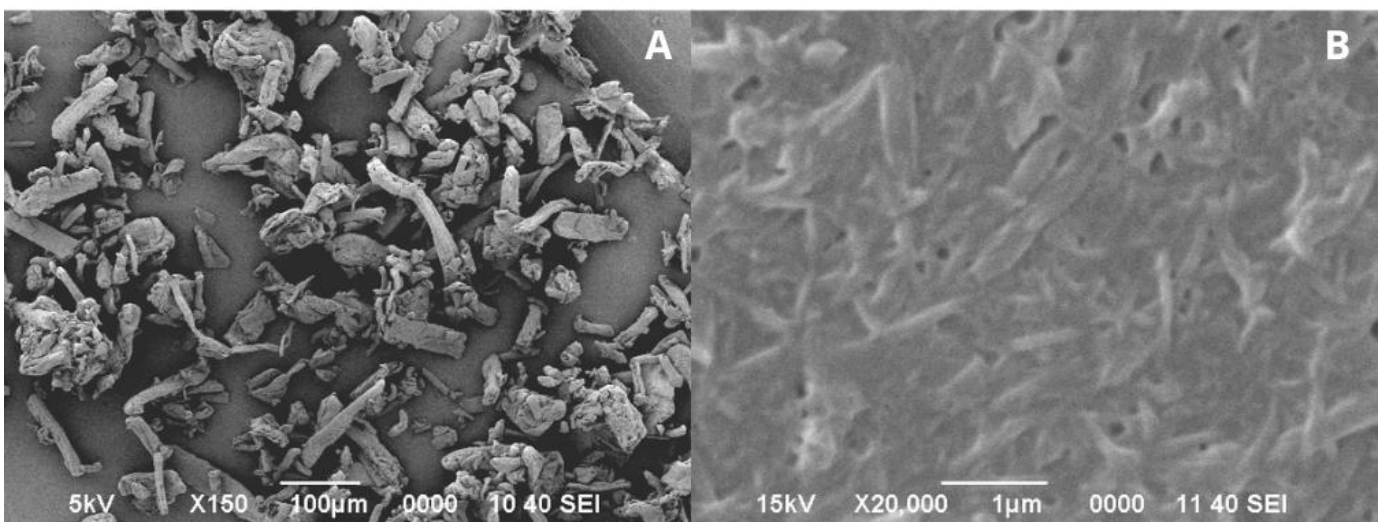


**Figura 3.** Evaluación de diferentes concentraciones del tensioactivo Tween 20 a una velocidad de agitación de 1000 rpm. A) 5%, B) 7,5%, C) 10%.

### 3.2. Preparación de nanocelulosa

Los resultados de la síntesis de nanocelulosa a partir de celulosa de algodón se muestran en la **Figura 4**. Se observa que después del tratamiento con sonicación las fibras de celulosa con tamaños entre 10 y 50 µm (figura 4.A), se redujeron, obteniéndose tamaños de nanofibras entre 100 y 300 nm (figura 4.B), las cuales fueron utilizadas en la preparación de las microcápsulas. La sonicación es una estrategia que se basa en un mecanismo de ultrasonidos que hace que las

fibras naturales se deshagan en nanofibras en agua (Zhao, Feng y Gao, 2007), este método permite romper los agregados micrométricos y estabilizar las suspensiones (Gouveia et al., 2020). Soni y Mahmoud (2015) encontraron que posterior al tratamiento con ultrasonificación, las fibras de tallo de algodón se redujeron a tamaños de aproximadamente 20 nm de longitud y 100-500 nm de diámetro. Cuando se aplica sonicación a un nivel de intensidad alto, como el utilizado en esta investigación (700 W), se produce la ruptura de los fuertes enlaces glucosídicos de la porción cristalina de la celulosa, que, junto con la ruptura de la red interconectada de puentes de hidrógeno, provocan la apertura o desfibrilación de la estructura (Abd et al., 2016).



**Figura 4.** Fibras de celulosa de algodón (A). Fibras de nanocelulosa de algodón obtenidas a partir de tratamiento con sonicación (B).

### 3.3. Caracterización de las microcápsulas

#### 3.3.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

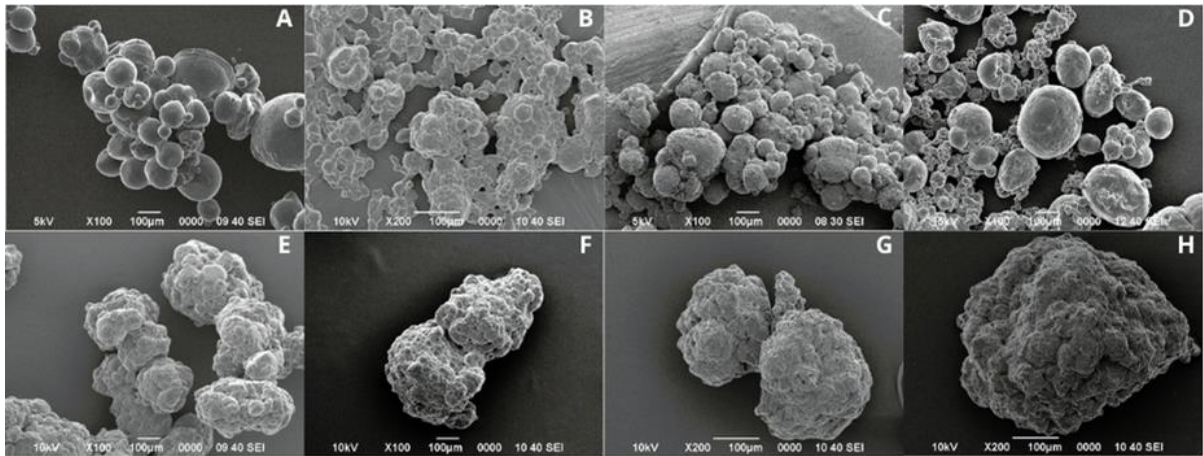
Los resultados de la caracterización morfológica de las microcápsulas con y sin conidios se observan en la **Figura 5**. Las microcápsulas de alginato sin conidios (Alg) tenían tamaños de entre 100 y 300 μm, con algunas microcápsulas más pequeñas alrededor de las 50 μm, además, se observó una circunferencia regular y superficie lisa (Figura 5A). Posterior al proceso de encapsulación de los conidios, se observaron tamaños menores a las 100 μm, sin embargo, estas se aglomeraron, tal como se observa en la Figura 4E. El tamaño de las microcápsulas disminuyó con la incorporación de los conidios, similar a lo observado por de Oliveira et al. (2020). La formulación de alginato y nanocelulosa sin conidios (AlgNc) mostró microcápsulas

con tamaños menores a las 50  $\mu\text{m}$ , con circunferencia regular y la superficie lisa, sin embargo, hubo aglomeración (Figura 5B). Como se muestra en la figura 4F, las microcápsulas con alginato, nanocelulosa y conidios, se aglomeraron y mostraron una circunferencia irregular. El cambio de una superficie lisa a una rugosa después de la encapsulación ha sido reportado por Rungraung et al. (2022), los cuales mencionan que la adición de nanocelulosa a microcápsulas de alginato, genera superficies ásperas y con irregularidades. Esta rugosidad puede estar relacionada con el proceso de secado de las microcápsulas y por las fuertes interacciones de entrecruzamiento iónico (Brondi et al. 2022). Para el caso de la formulación de alginato y quitosano (AlgCh), se obtuvieron microcápsulas con dos rangos de tamaño, un grupo entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ , y otro entre 20 y 50  $\mu\text{m}$ , ambos con circunferencia regular y superficie con rugosidades (Figura 5C), además, se aglomeraron (Figura 5G). Las rugosidades o superficies rayadas y fibrosas pueden deberse a la presencia del quitosano en la superficie de la microcápsula (Jurić et al., 2019).

Por su parte, las microcápsulas formuladas con quitosano, alginato y nanocelulosa (AlgChNc) también mostraron dos rangos de tamaño, entre 100 y 200  $\mu\text{m}$ , y entre 15 y 50  $\mu\text{m}$ . Presentaban circunferencia regular y superficie con ciertas rugosidades (Figura 5D), sin embargo, del mismo modo que lo ocurrido con las anteriores formulaciones, después de la encapsulación tendieron a aglomerarse y mostrar superficies rugosas (Figura 5H).

Jurić et al. (2021) mencionan que la aglomeración puede deberse al tamaño de las microcápsulas y la presencia de moléculas de agua que provoca que se unan entre sí al momento de secarse. Las superficies rugosas observadas en las microcápsulas con conidios pueden deberse a que, a medida que se introducen los conidios en el sistema polimérico, la distribución uniforme de los conidios a lo largo de la matriz puede hacer posible notar una rugosidad (Batista et al., 2017). Jurić et al. (2019) encontraron que las microcápsulas preparadas con conidios de *T. viridae* tenían numerosos hoyuelos ovalados y se observó que un tubo germinativo cruzó la superficie de la microcápsula dentro de unos pocos días. Las secciones cercanas a la superficie revelaron la presencia de hifas y formación de micelio dentro de la matriz, lo cual puede justificar las características de la superficie de las microcápsulas que contienen conidios, ya que la presencia de *Trichoderma* y el crecimiento de micelio dentro de la microcápsula cambian la estructura de la red del gel.

Se ha encontrado que el proceso de secado de las microcápsulas a temperatura ambiente provoca una pérdida de la esfericidad y la superficie se vuelve áspera con arrugas irregulares, lo cual está relacionado con la relajación de la tensión del biopolímero debido a la pérdida de agua y humedad (Rosas et al., 2013; Juric et al., 2019; Rodrigues et al., 2020).



**Figura 5.** Microcápsulas sin conidios (A-D) y con conidios de *T. longibrachiatum* (E-H). Microcápsulas Alg (A y E), AlgNc (B y F), AlgCh (C y G), AlgChNc (D y H).

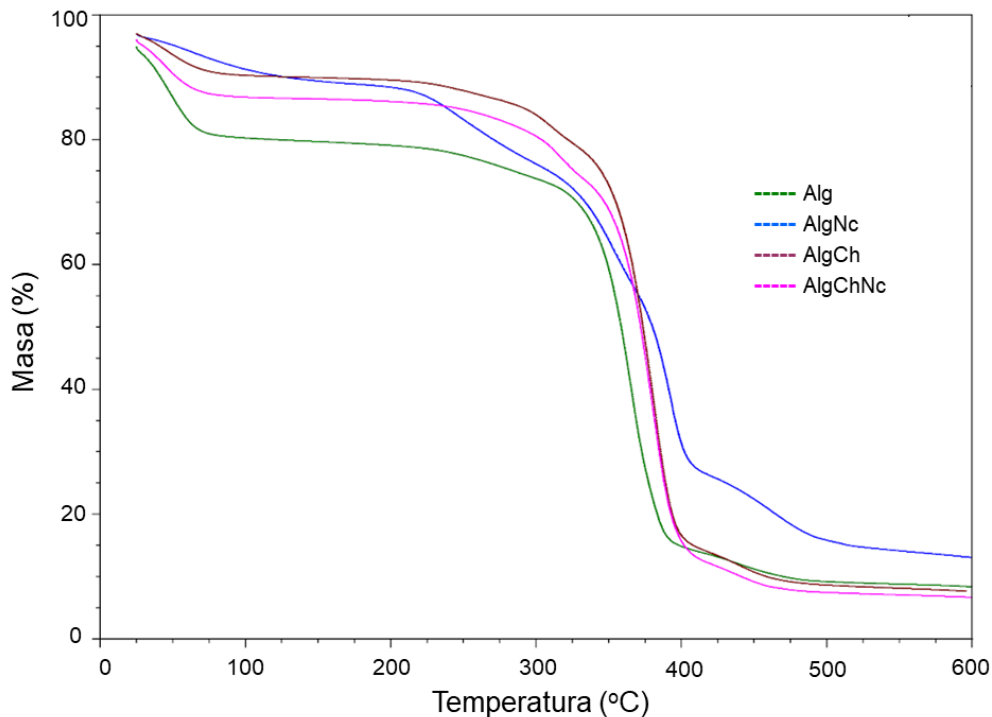
### 3.3.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

La **Figura 6** muestra el análisis termogravimétrico de las microcápsulas formuladas sin conidios. Los resultados indican que las microcápsulas son relativamente estables a temperaturas por debajo de los 220 °C. El gráfico muestra un primer evento de pérdida de masa entre los 25 y 100 °C, lo que podría estar relacionado con la evaporación o pérdida de agua (Boukoussa et al. 2021). El segundo evento se da entre los 100 y los 350 °C, en donde se ha reportado que ocurre la degradación del alginato, cercana a los 225 °C, esto debido a una posible fractura de enlaces glucosídicos, deshidratación, descarboxilación y descarbonilación del polímero (Liu et al. 2015). Para el caso de las formulaciones con nanocelulosa, se ha reportado que la pérdida de masa entre los 250 y los 320 °C es característica de la degradación de los anillos de piranosa de la estructura de la nanocelulosa (Hu et al. 2018). Se ha encontrado que dentro del rango de los de 250 a 450 °C ocurre la pirólisis del quitosano (Corazzari et al., 2015), lo que concuerda con lo observado para las formulaciones AlgCh y AlgChNc y podría explicar la diferencia en la pérdida de masa con la formulación AlgNc que no contiene quitosano.

Posteriormente, se da un tercer evento a partir de los 350 °C, con una pérdida de masa de aproximadamente 70% al llegar a los 400 °C, a partir de donde las formulaciones de Alg, AlgCh y AlgChNc se mantuvieron constantes. En el caso de AlgNc, se da una pérdida de masa de cerca del 55% al llegar a los 400 °C, posteriormente otro evento con una pérdida de 10% de masa y se mantuvo constante a partir de los 500 °C. La degradación después de los 400 °C, ha sido asociada a la conversión de los materiales restantes a residuos de carbono y CaCO<sub>3</sub> (Yang et al. 2019).

Se ha encontrado que la adición de quitosano a las formulaciones de microcápsulas con alginato mejora las propiedades fisicoquímicas, con una mayor estabilidad en medios de hinchamiento de diferentes pH y una mayor resistencia estructural (Qu y Luo., 2020). Hashim et al. (2019) mencionan que el quitosano mejora la estabilidad del hidrogel debido a la formación de complejos de polielectrolitos entre los grupos amino cargados positivamente y los residuos carboxílicos del alginato. Siqueira et al (2019) han determinado que formulaciones de alginato presentan una mayor estabilidad cuando contienen nanocelulosa en su composición.

Para el rango de temperatura al que podrían estar expuestas las formulaciones comerciales, se puede observar como la adición de polímeros como la nanocelulosa y el quitosano, brindan una mayor protección a los conidios, ya que con la incorporación de ambos a las formulaciones aumenta la estabilidad a la degradación por temperatura, disminuyendo la pérdida de peso en comparación con la formulación Alg.

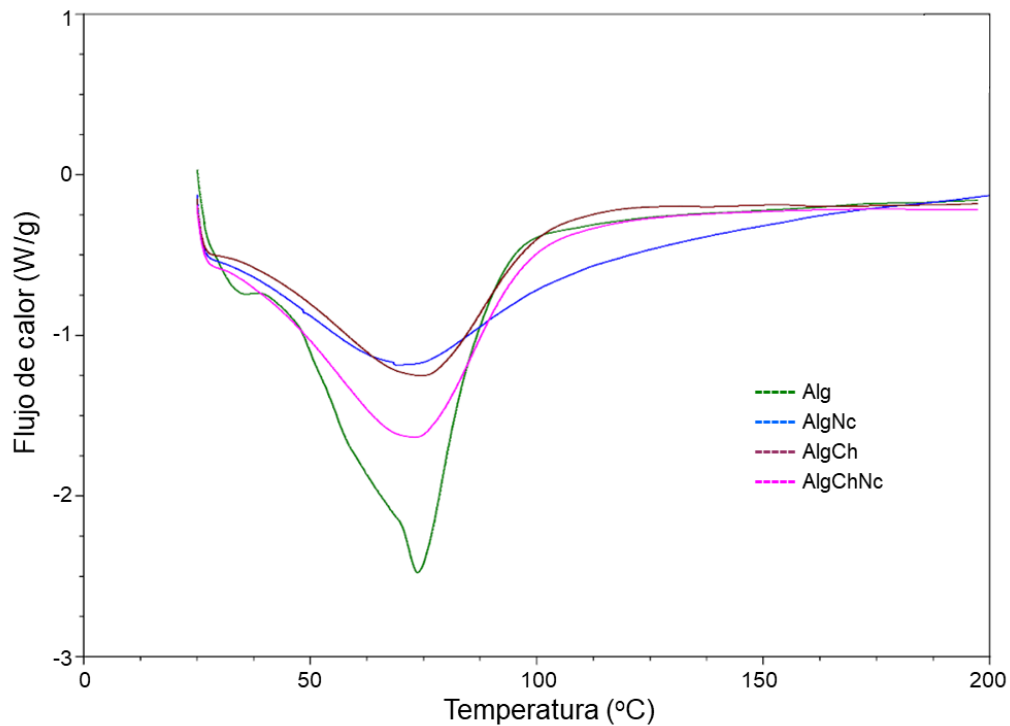


**Figura 6.** Análisis termogravimétrico (TGA) de las microcápsulas formuladas con alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa para la encapsulación de conidios de *T. longibrachiatum*.

### 3.3.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

La curva de transición térmica de las microcápsulas de Alg, AlgNc, AlgCh y AlgChNc fue analizada mediante DSC (**Figura 7**). La formulación Alg presentó una primera transición endotérmica cerca de los 33 °C y un posterior pico endotérmico a los 75 °C, también observado en las microcápsulas AlgNc y AlgChNc, que se encuentra asociado a la pérdida de agua de los

grupos hidrofílicos del alginato (Lim y Ahmad, 2017), y la pérdida de humedad de la nanocelulosa (Mohamed et al., 2021). La formulación AlgCh muestra un pico cercano a los 80 °C, asociado de igual forma a la evaporación del agua absorbida (Nikoo et al., 2018).

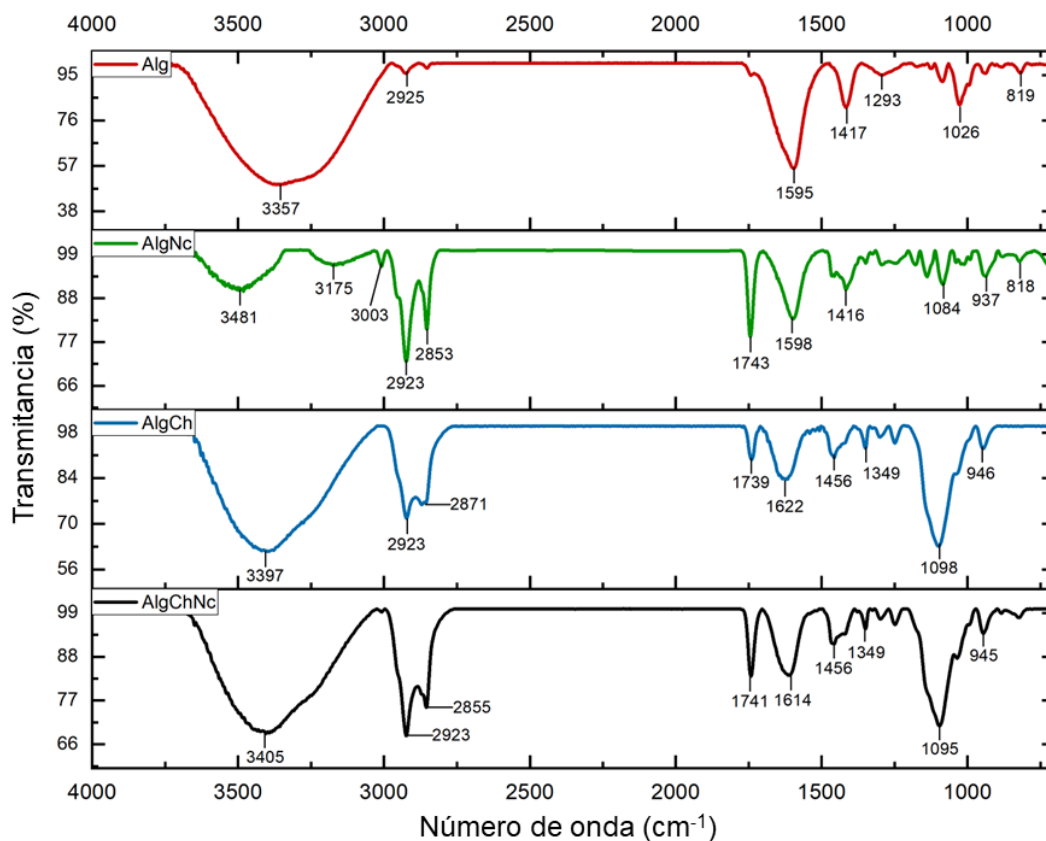


**Figura 7.** Análisis de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) de las microcápsulas formuladas con alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa para la encapsulación de conidios de *T. longibrachiatum*.

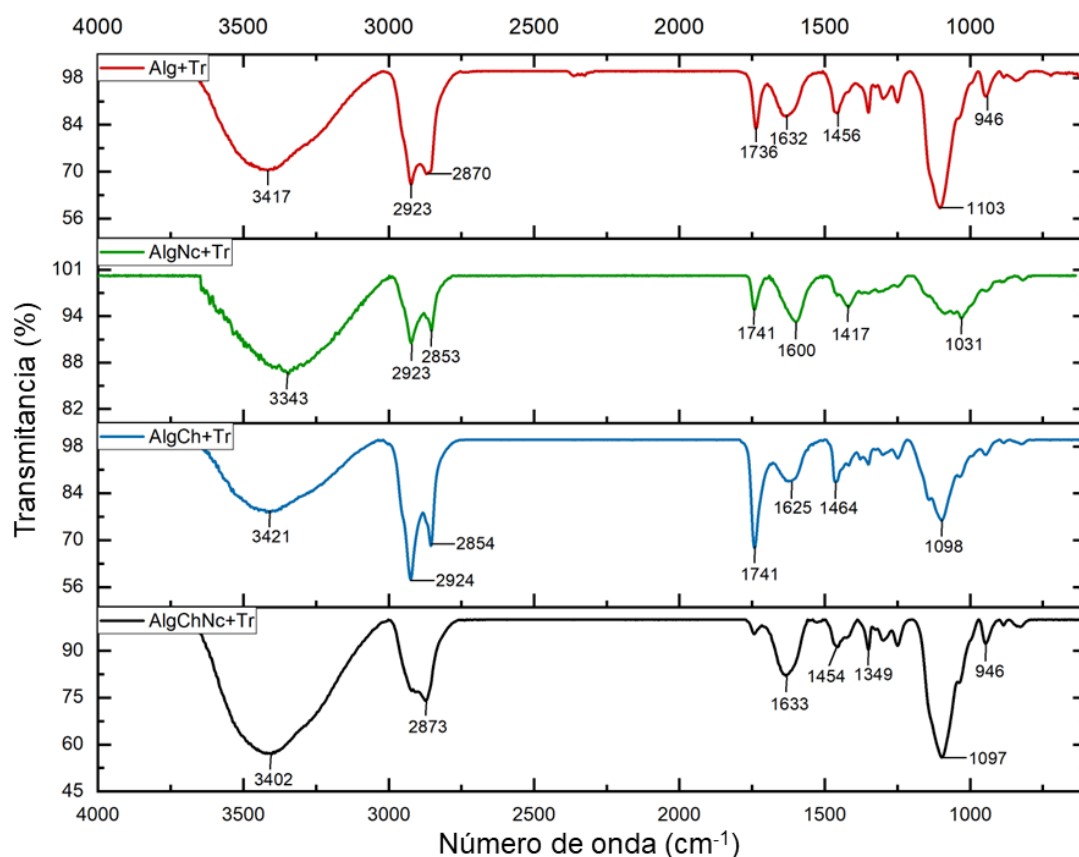
#### 3.3.4. Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Los grupos funcionales y las interacciones intermoleculares de las microcápsulas y los reactivos utilizados fueron analizadas mediante FTIR. Las bandas de absorción del alginato de sodio, quitosano, nanocelulosa, cloruro de calcio y carbonato de calcio, reactivos utilizados en las diferentes formulaciones de microcápsulas, se muestran en el apartado de material complementario (**Cuadro 3**). La **Figura 8** muestra los espectros FTIR de las formulaciones de microcápsulas sin conidios. Los picos de transmitancia en el rango de 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$ , observados en todas las formulaciones, se atribuyen a la vibración de tensión de los grupos OH (Chandrika, Prasad y Godbole, 2019). Las bandas de absorción observadas cercanas a 1625  $\text{cm}^{-1}$  se deben a la presencia del enlace C=O de los aniones carboxilato  $-\text{COO}-$ , además, la banda simétrica cerca de los 1450  $\text{cm}^{-1}$  es característica del enlace C-O, que está asociado con el estiramiento del ácido carboxílico (Levic et al., 2013).

En el espectro de microcápsulas de alginato de calcio sin conidios, se observó una banda de  $3357\text{ cm}^{-1}$  que se encuentra atribuida a las moléculas de agua. Además, se observan dos picos de onda en  $1595\text{ cm}^{-1}$  y  $1417\text{ cm}^{-1}$ , sugiriendo que existe un enlace entrecruzado del catión divalente  $\text{Ca}^{+2}$  con el alginato en los grupos  $\text{COO}^-$  (Essifi et al., 2021). El pico observado a  $2925\text{ cm}^{-1}$  hace referencia a la vibración de flexión de C-H en el grupo metileno (Moghaddam, Mortazavi y Khayamian, 2015). Por su parte, el estiramiento del enlace N-H con el grupo C=O (amida) observado en el pico de  $1622\text{ cm}^{-1}$  de las microcápsulas de alginato de sodio y quitosano, sugiere una interacción entre el carboxilo y el grupo amino de los polímeros (Bulatao et al., 2017). La desaparición de la banda amino del quitosano a  $1592\text{ cm}^{-1}$  (**Cuadro 3**) puede sugerir la formación de un complejo polielectrolítico entre el alginato de sodio y el quitosano, además, el nuevo pico observado a  $1739\text{ cm}^{-1}$ , perteneciente al grupo  $\text{COOH}$ , es un indicativo de la condición ácida en que se prepararon las microcápsulas (Khorshidian et al., 2019). La formulación de alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa (AlgChNc) mostró bandas similares a la formulación AlgCh.



**Figura 8.** Espectro FTIR de las formulaciones de alginato de sodio (Alg), alginato de sodio y nanocelulosa (AlgNc), Alginato de sodio y quitosano (AlgCh) y alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa (AlgChNc).



**Figura 9.** Espectro FTIR de las formulaciones de microcápsulas con conidios de *T. longibrachiatum*. Alginato de sodio (Alg+Tr), alginato de sodio y nanocelulosa (AlgNc+Tr), Alginato de sodio y quitosano (AlgCh+Tr) y alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa (AlgChNc+Tr).

### 3.4. Eficiencia de encapsulación

El **Cuadro 2** muestra la eficiencia de encapsulación de los conidios en las microcápsulas. Para todas las formulaciones se encontró una alta eficiencia de encapsulación mayor al 92%.

**Cuadro 2.** Eficiencia de encapsulación de conidios en las diferentes formulaciones de microcápsulas.

Formulación	Alg	AlgNc	AlgCh	AlgChNc
<b>Eficiencia de encapsulación (%)</b>	99 ± 9	92.5 ± 7.5	99 ± 2.5	96 ± 6

\*Los datos representan el promedio ± el error estándar

Estos porcentajes de encapsulación son más altos que los reportados por otros autores (Liu y Liu, 2009; Mancera et al. 2019). Por ejemplo, Mancera et al. (2019) obtuvieron una eficiencia de encapsulación del 80% en la formulación de microcápsulas de alginato de calcio mediante el método de emulsión-gelificación interna. Por su parte, Liu y Liu (2009) encontraron que la formulación de alginato de sodio sin ningún recubrimiento fue la que presentó la menor eficiencia de encapsulación (45%). Lo anterior indica que las microcápsulas desarrolladas en esta investigación constituyen un método adecuado para la encapsulación de conidios de *T. longibrachiatum*. Esta alta eficiencia de encapsulación podría estar relacionada con que en el método de emulsión-gelificación interna, al dispersarse finamente el  $\text{CaCO}_3$  en la solución de alginato, el  $\text{Ca}^{2+}$  disociado por el ácido acético puede gelificarse in situ sin interrumpir la gota de la emulsión para mantener la forma esférica (Song et al., 2013).

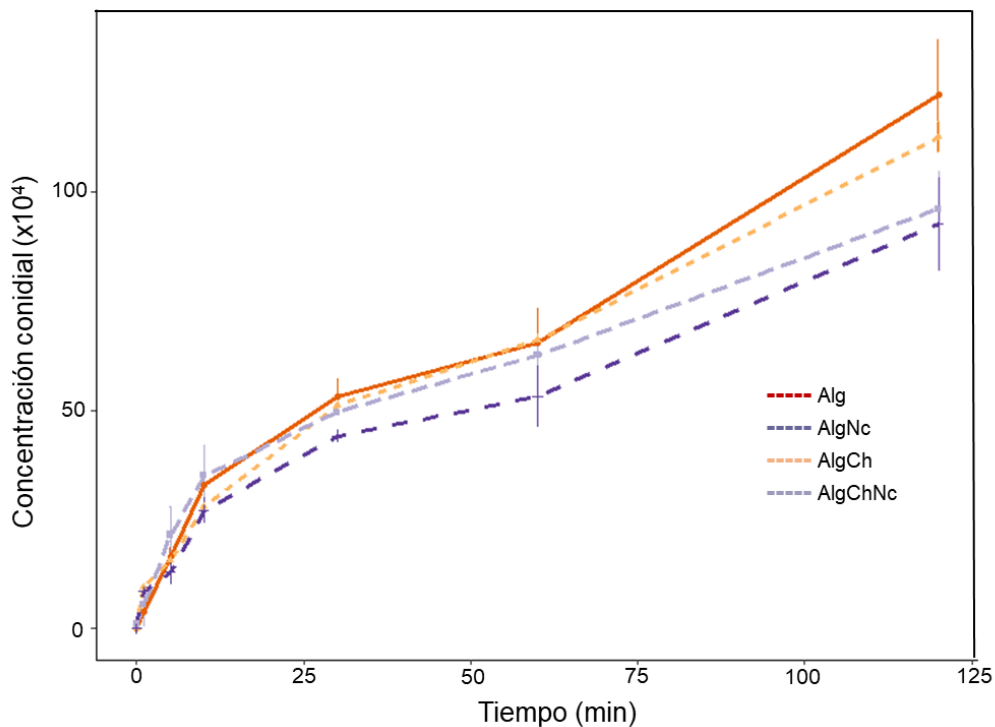
### 3.5. Velocidad de liberación

Los resultados de la velocidad de liberación de los conidios a partir de las microcápsulas formuladas se muestran en la **Figura 10**. Se determinó que las microcápsulas de alginato de sodio (Alg) tuvieron la mayor velocidad de liberación, con cerca de un 66% de conidios liberados a los 60 min y el 100% a los 100 min. Las microcápsulas con alginato de sodio y quitosano (AlgCh) tuvieron un comportamiento similar a los 60 min, sin embargo, el 100% de conidios se liberó cerca de los 110 min. Belščak et al. (2015) encontraron que la liberación de cafeína fue más lenta cuando las microcápsulas de alginato se reforzaron con quitosano, esto debido a que esta matriz fue la menos susceptible a la rehidratación, ya que la velocidad de difusión de agua a través del recubrimiento del ingrediente activo es el paso limitante para la velocidad de expansión y liberación.

Por su parte, las microcápsulas con alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa (AlgChNc) mostraron una velocidad liberación más lenta, con cerca de un 65% de conidios liberados a los 60 min y un 93% a los 120 min. Por último, las microcápsulas de alginato de sodio y nanocelulosa (AlgNc), tuvieron la velocidad de liberación más lenta, con un 51% de conidios liberados a los 60 min y cerca de 85% a los 120 min. Las formulaciones que contenían nanocelulosa fueron las que liberaron de forma más lenta los conidios, lo cual puede atribuirse a la capacidad del polisacárido de restringir el movimiento de las cadenas de alginato (Lin et al., 2011), o al alto entrelazamiento físico (Supramaniam et al., 2018) ralentizando la liberación. En otras investigaciones se ha observado una liberación más rápida del total de conidios (Liu y Liu, 2009, Aziz et al., 2015). Las microcápsulas que brindan una liberación más controlada pueden requerir menor cantidad de aplicaciones, reduciendo los costos y

mejorando la viabilidad microbiana (Adzmi et al., 2021). Las células que se liberan gradualmente de las microcápsulas, por la degradación de la matriz polimérica, están más protegidas contra factores destructivos que los microorganismos sin recubrimiento (Szczech y Maciorowski, 2016; Vemmer y Patel, 2013).

Los resultados indican que, con el aumento en el tiempo, aumenta la cantidad de conidios liberados, observándose una correlación positiva, similar a lo reportado por otros autores (Adzmi et al. 2021; Vinceković et al., 2016). Esto podría deberse a diversos factores como la humedad de la superficie de las microcápsulas, la penetración de agua en la microcápsula, la transición de la fase vítrea a gomosa de los polímeros, el hinchamiento, la difusión de agentes cargados a través de la matriz de la microcápsula y la capa superficial, la desorción de la superficie, la desintegración, disolución o erosión de la estructura de la microcápsula (Vinceković et al, 2017).



**Figura 10.** Velocidad de liberación de conidios encapsulados en las diferentes formulaciones desarrolladas.

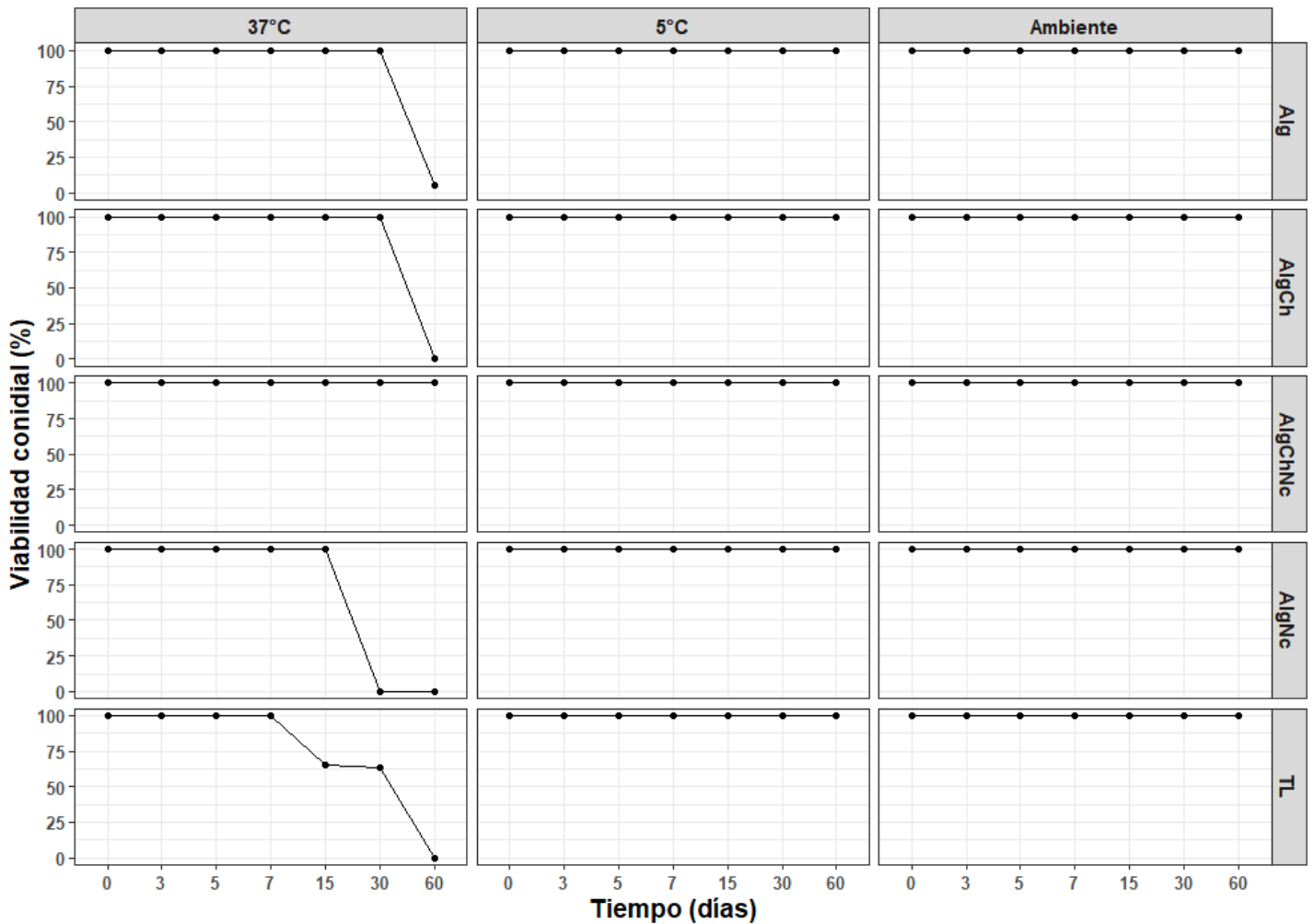
### 3.6. Tolerancia conidial a la temperatura

Se determinó que a temperatura ambiente ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y a  $5^{\circ}\text{C}$  las cuatro formulaciones de microcápsulas (Alg, AlgNc, AlgCh y AlgChNc) y la formulación convencional (TL) mantuvieron una viabilidad del 100% durante dos meses (**Figura 11**). Al evaluarse la viabilidad de los conidios a una temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  (80% de humedad relativa), se encontró

que la formulación TL tuvo una disminución de la viabilidad conidial a partir del día 7 de exposición (65%), la cual llegó a 0 a los 60 días. Por su parte, las microcápsulas de Alg y AlgCh disminuyeron su viabilidad conidial hasta llegar a 0 a los 60 días. Las microcápsulas de AlgNc disminuyeron su viabilidad conidial a partir de los 15 días de exposición hasta llegar a 0 en el día 30. El mejor resultado se obtuvo con la formulación AlgChNc, la cual mantuvo una viabilidad conidial del 100% durante los 60 días de evaluación. Lo anterior indica que la combinación de polímeros como alginato, quitosano y nanocelulosa para la formulación de microcápsulas permite la protección de los conidios de *T. longibrachiatum*, al estar expuestos a temperaturas entre los 5 y 37 °C.

El mantenimiento de la viabilidad observado en las microcápsulas de AlgChNc, podría estar relacionada a que la combinación de matrices de polímeros puede retardar la difusión de oxígeno en las microcápsulas, lo que limita la cantidad de oxígeno disponible para participar en la oxidación de macromoléculas, así como provocar estrés oxidativo (Muñoz et al. 2012; Ishak et al. 2021; Cruz et al., 2022). La protección dada por las microcápsulas lleva a una vida útil más prolongada y al mantenimiento de la actividad metabólica durante largos períodos de tiempo, tanto durante el almacenamiento como después de la aplicación (Braga et al., 2022). Por otra parte, a mayor temperatura se puede dar mayor reactividad y difusión de especies reactivas de oxígeno (ROS), disminuyendo la viabilidad de los conidios (Muñoz et al. 2012). El mantenimiento de la viabilidad de conidios encapsulados en las microcápsulas de AlgChNc, es un resultado promisorio para su utilización a nivel comercial y contrasta con lo encontrado por otros investigadores que han determinado que conidios microencapsulados mantienen su viabilidad a temperaturas de almacenamiento bajas (5-8 °C), pero que su viabilidad disminuye conforme aumenta la temperatura. Por ejemplo, Przyklenk et al. 2017, determinaron que conidios microencapsulados de *Metarhizium* sp. se mantienen viables a temperaturas de almacenamiento de 5 °C por un periodo de 6 meses, sin embargo, la viabilidad disminuyó a 25 °C. De Oliveira et al. (2020) evaluaron la exposición de conidios de *Trichoderma* microencapsulados a 8, 25 y 35 °C, encontrando que el mejor mantenimiento de la viabilidad se obtuvo para las microcápsulas liofilizadas almacenadas a 8 °C, sin embargo, hubo disminución de la viabilidad a una temperatura de 25 °C. Adzmi et al (2021) encontraron que el mejor mantenimiento de la viabilidad de conidios de *Trichoderma* microencapsulados se obtuvo a una temperatura de 5 °C. Por otra parte, Szczech y Maciorowski (2016) lograron mantener la viabilidad de conidios de *Trichoderma* casi al mismo nivel ( $10^{4.5}$  ufc.g<sup>-1</sup>) en microcápsulas liofilizadas, después de 6 meses de almacenamiento a 4 °C, sin embargo la viabilidad de conidios disminuyó en microcápsulas húmedas, a temperaturas de

almacenamiento de 30 °C después de 15 días, y posterior a los 90 días las esporas ya no eran viables.



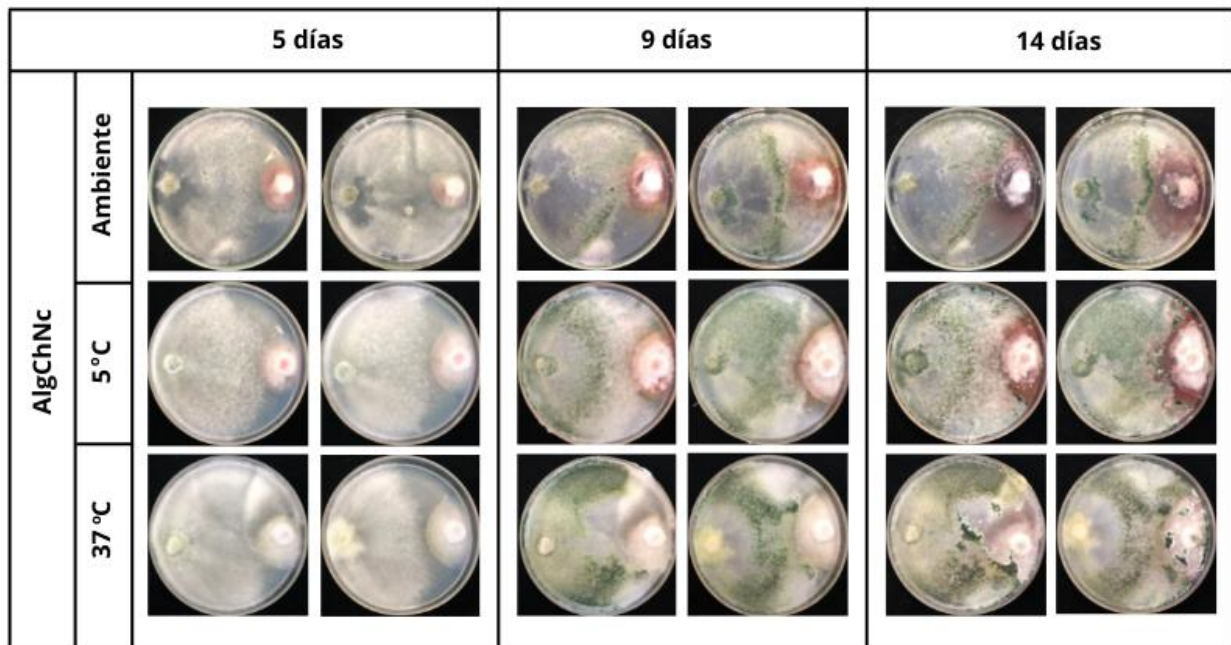
**Figura 11.** Viabilidad conidial de 4 microencapsulados de *T. longibrachiatum* en Alg, AlgCh, AlgChNc y AlgNC, y una formulación convencional (TL), expuestos a tres diferentes temperaturas de almacenamiento (5, temperatura ambiente y 37 °C).

### 3.7. Actividad biológica - Antagonismo *in vitro*

Los resultados de las pruebas de antagonismo mostraron que *T. longibrachiatum* creció por encima de al menos dos tercios de la superficie del medio, encontrándose un grado de antagonismo clase 2 (**Figura 12**). Las cuatro formulaciones evaluadas se comportaron de la misma forma y no influyó la temperatura a la que estuvieron expuestas las microcápsulas previo a las pruebas de antagonismo.

Diversas investigaciones han determinado que algunas especies del género *Trichoderma* tienen una gran capacidad antagonista con porcentajes de inhibición del 50,68% (Redda et al., 2018),

56% (Benlamoudi et al., 2021), 92,11% (Nofal et al., 2021) en el control in vitro de *F. oxysporum*, lo que coincide con lo observado en esta investigación y demuestra la conservación de la capacidad antagonista del hongo posterior a la microencapsulación. Sundaramoorthy y Balabaskar (2013) obtuvieron una inhibición del crecimiento del 27,22% cuando utilizaron *T. longibrachiatum* para el control in vitro de *F. oxysporum*. Sallam, Eraky y Sallam (2019) por su parte encontraron que *T. longibrachiatum* redujo la severidad de la enfermedad del marchitamiento en un 24,8%.



**Figura 12.** Antagonismo in vitro de AlgChNc + *T. longibrachiatum* vs *F. oxysporum* posterior a la exposición de la formulación a tres diferentes temperaturas.

#### **4. Conclusiones**

Los resultados de esta investigación demuestran que los polímeros alginato de sodio, quitosano y nanocelulosa, permiten formular microcápsulas que ayudan a la protección y mantenimiento de la viabilidad de los conidios de *T. longibrachiatum* bajo diferentes condiciones de temperatura. Se obtuvo una eficiencia de encapsulación por encima del 92% para las tres formulaciones de microcápsulas y se mantuvo la viabilidad de los conidios al almacenar las microcápsulas a 5, 20 y 37 °C, siendo la formulación con los tres polímeros (AlgChNc) la que mostró el mejor resultado al almacenarse durante 2 meses a la temperatura de 37 °C. Las pruebas de antagonismo *in vitro* demostraron que el microencapsulamiento del hongo no afecta su capacidad antagonista, obteniéndose una categoría II en la competencia por sustrato contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* para las tres formulaciones de microcápsulas, sin embargo, se requieren pruebas para determinar si en condiciones de campo se mantiene esta capacidad.

#### **5. Agradecimientos**

Este trabajo fue apoyado por el Laboratorio Nacional de Nanotecnología (LANOTEC), el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica, y la beca otorgada por el Centro Nacional de Alta Tecnología (CeNAT).

## 6. Referencias bibliográficas

Abd, S., Zain, S., Das, R., Centi, G., 2016. Synergic effect of tungstophosphoric acid and sonication for rapid synthesis of crystalline nanocellulose. *Carbohydrate polymers*, 138, 349-355. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.023>

Adzmi, F., Musa, M., Siddiqui, Y., Yun, W., Hamid, H., Abdu, A., Abiri, R., 2021. Development of Alginate-Montmorillonite-Starch with Encapsulated *Trichoderma harzianum* and Evaluation of Conidia Shelf Life. *International Journal of Agriculture and Biology*, 26(01):87-96. doi: <http://dx.doi.org/10.17957/IJAB/15.1812>

Al-Hosney, H., Grassian, V., 2005. Water, sulfur dioxide and nitric acid adsorption on calcium carbonate: A transmission and ATR-FTIR study. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 7(6), 1266-1276. <https://doi.org/10.1039/B417872F>

Asaturova, A., Shternshis, M., Tsvetkova, V., Shpatova, T., Maslennikova, V., Zhevnova, N., Homyak, A., 2021. Biological control of important fungal diseases of potato and raspberry by two *Bacillus velezensis* strains. *PeerJ*, 9, e11578. <https://doi.org/10.7717/peerj.11578>

Aziz, A., Vineela, V., Vimala, P., 2015. Sodium humate as a promising coating material for microencapsulation of *Beauveria bassiana* conidia through spray drying. *Drying Technology*, 33(2), 162-168. <https://doi.org/10.1080/07373937.2014.938814>

Baranauskaite, J., Kopustinskiene, D., Bernatoniene, J., 2019. Impact of gelatin supplemented with gum arabic, tween 20, and  $\beta$ -cyclodextrin on the microencapsulation of Turkish oregano extract. *Molecules*, 24(1), 176. <https://doi.org/10.3390/molecules24010176>

Barzegar, H., Mehrnia, M., Nasehi, B., Alipour, M., 2018. Fabrication of peppermint essential oil nanoemulsions by spontaneous method: Effect of preparing conditions on droplet size. *Flavour and Fragrance Journal*, 33(5), 351-356. <https://doi.org/10.1002/ffj.3455>

Batista, D., De Oliveira, I., Ribeiro, A., Fonseca, E., Santos, N., de Sena-Filho, J., ... Dornelas, C., 2017. Encapsulation and release of *Beauveria bassiana* from alginate–bentonite nanocomposite. RSC advances, 7(42), 26468-26477. DOI: 10.1039/C7RA02185B

Bejarano, A., Puopolo, G., 2020. Bioformulation of microbial biocontrol agents for a sustainable agriculture. In De Cal, A., Melgarejo, P., y Magan, N. (Eds.). How Research Can Stimulate the Development of Commercial Biological Control Against Plant Diseases (pp. 275-293). Springer, Cham. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-53238-3\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-030-53238-3_16)

Bell, D., Wells, H., Markham, C., 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology, 72(4), 379-382. DOI:10.1094/PHYTO-72-379

Belščak, A., Komes, D., Karlović, S., Djaković, S., Špoljarić, I., Mršić, G., Ježek, D., 2015. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan, and psyllium. Food chemistry, 167, 378-386. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.011>

Benlamoudi, W., Lakhdari, W., Dehliz, A., Guezoul, O., 2021. In Vitro Investigation of *Trichoderma* Strain Potential Against *Fusarium* Wilt of Tomato. Al-Qadisiyah Journal For Agriculture Sciences, 11(1), 32-35. DOI:10.33794/qjas.2021.168288

Böke, H., Akkurt, S., Özdemir, S., Göktürk, E., Saltik, E., 2004. Quantification of CaCO<sub>3</sub>–CaSO<sub>3</sub>· 0.5 H<sub>2</sub>O–CaSO<sub>4</sub>· 2H<sub>2</sub>O mixtures by FTIR analysis and its ANN model. Materials Letters, 58(5), 723-726. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2003.07.008>

Bolimowski, P., Kozera, R., Boczkowska, A., 2018. Poly (urea-formaldehyde) microcapsules–synthesis and influence of stirring speed on capsules size. Polimery, 63(5), 339-346. DOI: [dx.doi.org/10.14314/polimery.2018.5.2](https://doi.org/10.14314/polimery.2018.5.2)

Boukoussa, B., Mokhtar, A., El Guerdaoui, A., Hachemaoui, M., Ouachtak, H., Abdelkrim, S., ... Hamacha, R., 2021. Adsorption behavior of cationic dye on mesoporous silica SBA-15 carried by calcium alginate beads: Experimental and molecular dynamics study. Journal of Molecular Liquids, 333, 115976. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115976>

Braga, A., Costa, C., Pomella, A., Ribeiro, E., Santos, L., Zotarelli, M., 2019. Evaluation of lethality temperature and use of different wall materials in the microencapsulation process of *Trichoderma asperellum* conidias by spray drying. *Powder Technology*, 347, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.02.037>

Braga, A., Costa, C., Ribeiro, E., Zotarelli, M., Santos, L., 2022. Evaluation of the microencapsulation process of conidia of *Trichoderma asperellum* by spray drying. doi: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1602733/v1>

Brondi, M., Florencio, C., Mattoso, L., Ribeiro, C., Farinas, C., 2022. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, 295, 119876. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119876>

Bulatao, R., Samin, J., Salazar, J., Monserate, J., 2017. Encapsulation of anthocyanins from black rice (*Oryza sativa* L.) bran extract using chitosan-alginate nanoparticles. *J. Food Res*, 6(3), 40-47. doi:10.5539/jfr.v6n3p40

Chagas, L., Orozco, B., Rodrigues, G., 2017. Rice growth influence by *Trichoderma* spp. with natural phosphate fertilization under greenhouse conditions. *IJDR*, 7(6), 13147-13152.

Chandrika, K., Prasad, R., Godbole, V., 2019. Development of chitosan-PEG blended films using *Trichoderma*: Enhancement of antimicrobial activity and seed quality. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 282–290. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.208>

Chaudhary, T., Shukla, P., 2020. Commercial bioinoculant development: Techniques and challenges. In Shukla, P (Ed.). (2020). *Microbial Enzymes and Biotechniques* (pp. 57-70). Springer, Singapore. doi: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6895-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6895-4_4)

Corazzari, I., Nisticò, R., Turci, F., Faga, M., Franzoso, F., Tabasso, S., Magnacca, G., 2015. Advanced physico-chemical characterization of chitosan by means of TGA coupled on-line with FTIR and GCMS: Thermal degradation and water adsorption capacity. *Polymer Degradation and Stability*, 112, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.12.006>

Cruz, M., Izquierdo, L., Gómez, M., Santos, A., Uribe, L., Moreno, C., 2022. Hydrogel capsules as new delivery system for *Trichoderma koningiopsis* Th003 to control *Rhizoctonia solani* in rice (*Oryza sativa*). DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2264585/v1>

Dashora, K., Saraf, S., Saraf, S., 2007. Effect of processing variables and in-vitro study of microparticulate system of nimesulide. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 43(4), 555-562. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322007000400008>

De Oliveira, A., Locatelli, G., Barbosa, R., Lobo, M., Moura, G., Luna, C., 2020. Preparation, characterisation and cell viability of encapsulated *Trichoderma asperellum* in alginate beads. *Journal of Microencapsulation*, 37(3), 270-282. <https://doi.org/10.1080/02652048.2020.1729884>

Elnahal, A., El-Saadony, M., Saad, A., Desoky, E., El-Tahan, A., Rady, M., ... El-Tarabily, K., 2022. The use of microbial inoculants for biological control, plant growth promotion, and sustainable agriculture: A review. *European Journal of Plant Pathology*, 1-34. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02393-7>

El-Katatny, M., Hetta, A., Shaban, G., El-Komy, H., 2003. Improvement of cell wall degrading enzymes production by alginate encapsulated *Trichoderma* spp. *Food Technology and Biotechnology*, 41(3), 219-225.

Essifi, K., Lakrat, M., Berraouan, D., Fauconnier, M., El Bachiri, A., Tahani, A., 2021. Optimization of gallic acid encapsulation in calcium alginate microbeads using Box-Behnken Experimental Design. *Polymer Bulletin*, 78(10), 5789-5814. <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03397-9>

Fraceto, L., Maruyama, C., Guilger, M., Mishra, S., Keswani, C., Singh, H., de Lima, R., 2018. *Trichoderma harzianum*-based novel formulations: potential applications for management of Next-Gen agricultural challenges. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 93(8), 2056–2063. <https://doi.org/10.1002/jctb.5613>

French, E., Hebert, T., 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA/CATIE.

[https://books.google.co.cr/books?id=nR8PAQAIAAJ&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](https://books.google.co.cr/books?id=nR8PAQAIAAJ&hl=es&source=gbs_navlinks_s)

Gan, P., Sam, S., Abdullah, M., Omar, M., 2020. Thermal properties of nanocellulose-reinforced composites: A review. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(11), 48544. <https://doi.org/10.1002/app.48544>

Gouveia, A., Munk, M., Oliveira, V., Ferreira, A., Brandão, H., Gern, J., ... Raposo, N., 2020. Preparation, characterization and in vivo biocompatibility studies of cotton cellulose nanofibers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 20(10), 6532-6541.

Hashim, A., Hamed, S., Hamid, H., Abd-Elsalam, K., Golonka, I., Musiał, W., El-Sherbiny, I., 2019. Antioxidant and antibacterial activities of omega-3 rich oils/curcumin nanoemulsions loaded in chitosan and alginate-based microbeads. *International journal of biological macromolecules*, 140, 682-696. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.085>

Herrera, W., Valbuena, O., Pavone, D., 2020. Formulation of *Trichoderma asperellum* TV190 for biological control of *Rhizoctonia solani* on corn seedlings. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1), 1-8. doi: <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00246-9>

Hewedy, O., Mansour, A., Ali, M., Lateif, K., Ismaiel, M., El-Meihy, R., 2022. Comprehensive Characterization and Screening of Different *Trichoderma* Isolates as Plant Growth Promoters: Insight to Metal Solubilization, Enzymatic Activity, and Antagonistic Effect. doi:<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1286108/v1>

Hu, Z., Omer, A., Ouyang, X., Yu, D., 2018. Fabrication of carboxylated cellulose nanocrystal/sodium alginate hydrogel beads for adsorption of Pb (II) from aqueous solution. *International journal of biological macromolecules*, 108, 149-157. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.171>

Huo, X., Li, W., Wang, Y., Han, N., Wang, J., Wang, N., Zhang, X., 2018. Chitosan composite microencapsulated comb-like polymeric phase change material via coacervation microencapsulation. *Carbohydrate polymers*, 200, 602-610. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.08.003>

Hwang, J., Kim, J., Wee, Y., Jang, H., Kim, S., Ryu, H., 2006. Factors affecting the characteristics of melamine resin microcapsules containing fragrant oils. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(5), 391. <https://doi.org/10.1007/BF02932304>

Ishak, A., Zulkepli, F., Hayin, N., Zain, N., Sapak, Z., 2021. Effect of High Inlet Temperature of Spray Dryer on Viability of Microencapsulated *Trichoderma asperellum* Conidia. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 757, No. 1, p. 012023). IOP Publishing. DOI 10.1088/1755-1315/757/1/012023

Jafari, S., Esfanjani, A., Katouzian, I., Assadpour, E., 2017. Release, Characterization, and Safety of Nanoencapsulated Food Ingredients. In *Nanoencapsulation of Food Bioactive Ingredients*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809740-3.00010-6>

Jordan, J., Cheng, H., Easson, M., Yao, W., Condon, B., Gibb, B., 2021. Effect of Nanocellulose on the Properties of Cottonseed Protein Isolate as a Paper Strength Agent. *Materials*, 14(15), 4128. <https://doi.org/10.3390/ma14154128>

Jurić, S., Šegota, S., Vinceković, M., 2019. Influence of surface morphology and structure of alginate microparticles on the bioactive agents release behavior. *Carbohydrate polymers*, 218, 234-242. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.04.096>

Jurić, S., Tanuwidjaja, I., Fuka, M., Kahlina, K., Marijan, M., Boras, A., ... Vinceković, M., 2021. Encapsulation of two fermentation agents, *Lactobacillus sakei* and calcium ions in microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, 111387. doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111387

Kargarzadeh, H., Huang, J., Lin, N., Ahmad, I., Mariano, M., Dufresne, A., . . . Galeski, A., 2018. Recent developments in nanocellulose-based biodegradable polymers, thermoplastic

polymers, and porous nanocomposites. *Progress in Polymer Science*, 87, 197-227. doi:10.1016/j.progpolymsci.2018.07.008

Karunadasa, S. (2019). Dehydration of Calcium Chloride as Examined by High-temperature X-ray Powder Diffraction. *Int. Multidiscip. Res. J*, 4, 37-43.

Kashyap, P., Xiang, X., Heiden, P., 2015. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. *International Journal of Biological Macromolecules*, 77, 36–51. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.02.039>

Khorshidian, N., Mahboubi, A., Kalantari, N., Hosseini, H., Yousefi, M., Arab, M., ... Mahdavi, F., 2019. Chitosan-coated alginate microcapsules loaded with herbal galactagogue extract: formulation optimization and characterization. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 18(3), 1180. doi: <https://doi.org/10.22037/Ijpr.2019.1100776>

Levic, S., Djordjevic, V., Rajic, N., Milivojevic, M., Bugarski, B., Nedovic, V., 2013. Entrapment of ethyl vanillin in calcium alginate and calcium alginate/poly (vinyl alcohol) beads. *Chemical papers*, 67(2), 221-228. <https://doi.org/10.2478/s11696-012-0260-1>

Li, J., Kim, S., Chen, X., Park, H., 2016. Calcium-alginate beads loaded with gallic acid: Preparation and characterization. *LWT - Food Science and Technology*, 68, 667–673. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.012

Li, M., He, B., Chen, Y., Zhao, L., 2021. Physicochemical Properties of Nanocellulose Isolated from Cotton Stalk Waste. *ACS omega*, 6(39), 25162-25169. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c02568>

Li, W., Wei, Q., Chen, Q., Jiang, Z., 2021. Microencapsulation and evaluation of styrene maleic anhydride/epoxy for mechanical triggering self-healing of cementitious materials. *Cement and Concrete Composites*, 124, 104247. <https://doi.org/10.1016/j.cemconcomp.2021.104247>

Lim, G., Ahmad, M., 2017. Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. *Journal of industrial and engineering chemistry*, 56, 382-393. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.07.035>

Lin, N., Huang, J., Chang, P., Feng, L., Yu, J., 2011. Effect of polysaccharide nanocrystals on structure, properties, and drug release kinetics of alginate-based microspheres. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85(2), 270-279. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.02.039>

Liu, C., Liu, S., 2009. Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. *Journal of Microencapsulation*, 26(5), 377-384. doi:10.1080/02652040802365455

Liu, Y., Zhao, J., Zhang, C., Guo, Y., Cui, L., Zhu, P., Wang, D., 2015. Bio-based nickel alginate and copper alginate films with excellent flame retardancy: preparation, flammability and thermal degradation behavior. *RSC advances*, 5(79), 64125-64137. DOI: 10.1039/C5RA11048C

Locatelli, G., dos Santos, G., Botelho, P., Finkler, C., Bueno, L., 2018. Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control*, 117, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>

Lupo, B., Maestro, A., Porras, M., Gutiérrez, J., González, C., 2014. Preparation of alginate microspheres by emulsification/internal gelation to encapsulate cocoa polyphenols. *Food Hydrocolloids*, 38, 56-65. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.003>

Ma, L., Shang, Y., Zhu, Y., Zhang, X., Zhao, L., Wang, J., 2020. Study on microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* LIP-1 by emulsification method. *Journal of Food Process Engineering*, 43(8), e13437. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13437>

Mancera, M., Izquierdo, W., Escalante, A., Ibarra, J., Barrera, J., 2019. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2), 107-130. doi:10.1080/09583157.2018.1535053

Martins, E., Poncelet, D., Marquis, M., Davy, J., Renard, D., 2017. Monodisperse core-shell alginate (micro)-capsules with oil core generated from droplets millifluidic. *Food Hydrocolloids*, 63, 447-456. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.09.018

Mi, Y., Liu, Z., Deng, J., Lei, H., Zhu, C., Fan, D., Lv, X., 2018. Microencapsulation of phosphorylated human-like collagen-calcium chelates for controlled delivery and improved bioavailability. *Polymers*, 10(2), 185. <https://doi.org/10.3390/polym10020185>

Moghaddam, M., Mortazavi, S., Khayamian, T., 2015. Preparation of calcium alginate microcapsules containing n-nonadecane by a melt coaxial electrospray method. *Journal of Electrostatics*, 73, 56-64. <https://doi.org/10.1016/j.elstat.2014.10.013>

Mohamed, S., Hossain, M., Mohamad, M., Ahmad, M., Omar, F., Balakrishnan, V., ... Yahaya, A., 2021. Recycling Waste Cotton Cloths for the Isolation of Cellulose Nanocrystals: A Sustainable Approach. *Polymers*, 13(4), 626. <https://doi.org/10.3390/polym13040626>

Mu, H., Song, Z., Wang, X., Wang, D., Zheng, X., Li, X., 2022. Microencapsulation of algae oil by complex coacervation of chitosan and modified starch: Characterization and oxidative stability. *International Journal of Biological Macromolecules*, 194, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.168>

Mulatu, A., Alemu, T., Megersa, N., Vetukuri, R. R., 2021. Optimization of Culture Conditions and Production of Bio-Fungicides from *Trichoderma* Species under Solid-State Fermentation Using Mathematical Modeling. *Microorganisms*, 9(8), 1675. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081675>

Muñoz, A., Ortiz, M., Vernon, E., Jauregui, J., Galindo, E., Serrano, L., 2012. Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidias in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydrate Polymers*, 88(4), 1141-1148. [doi:https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030)

Murugappan, V., Muthadhi, A., 2022. Studies on the influence of alginate as a natural polymer in mechanical and long-lasting properties of concrete—A review. *Materials Today: Proceedings*. [doi: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.424](https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.03.424)

Nikoo, A., Kadkhodae, R., Ghorani, B., Razzaq, H., Tucker, N., 2018. Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels. *International journal of biological macromolecules*, 116, 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.167>

Nofal, A. M., El-Rahman, M. A., Abdelghany, T. M., Abd El-Mongy, M., 2021. Mycoparasitic nature of Egyptian *Trichoderma* isolates and their impact on suppression *Fusarium* wilt of tomato. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 31, 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00450-1>

Oberoi, K., Tolun, A., Sharma, K., Sharma, S., 2019. Microencapsulation: an overview for the survival of probiotic bacteria. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, 9(2), 280-287. doi: <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2019.9.2.280-287>

Oskiera, M., Szczech, M., Stępowaska, A., Smolińska, U., Bartoszewski, G., 2017. Monitoring of *Trichoderma* species in agricultural soil in response to application of biopreparations. Biological Control, 113, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.07.005>

Pandi, N., Sonawane, S., Kishore, K., 2021. Synthesis of cellulose nanocrystals (CNCs) from cotton using ultrasound-assisted acid hydrolysis. Ultrasonics sonochemistry, 70, 105353. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105353>

Poveda, J., 2021. *Trichoderma* as biocontrol agent against pests: New uses for a mycoparasite. Biological Control, 159, 104634. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104634>

Przyklenk, M., Vemmer, M., Hanitzsch, M., Patel, A., 2017. A bioencapsulation and drying method increases shelf life and efficacy of *Metarhizium brunneum* conidia. Journal of microencapsulation, 34(5), 498-512. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354941>

Qu, B., Luo, Y., 2020. Chitosan-based hydrogel beads: Preparations, modifications and applications in food and agriculture sectors—A review. International Journal of Biological Macromolecules, 152, 437-448. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.240>

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Redda, E., Ma, J., Mei, J., Li, M., Wu, B., Jiang, X., 2018. Antagonistic potential of different isolates of *Trichoderma* against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, and *Botrytis cinerea*. European Journal of Experimental Biology, 8(2), 1-8. DOI: 10.21767/2248-9215.100053

Rivera, W., Brenes, J., Zúñiga, O., 2018. Efectos de la aplicación de *Trichoderma asperellum* y su filtrado en el crecimiento de almácigos de cebolla (*Allium cepa*). *Revista Tecnología En Marcha*, 31(2), 98. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i2.3627>

Rodrigues, C., Bilesky, N., de Lima, R., Fraceto, L., 2020. Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 25(8), 225. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225>

Rosas, W., Ramos, E., Salazar, A., 2013. Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum. *Carbohydrate polymers*, 98(1), 1011-1017. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.06.077>

Rungraung, N., Jain, S., Mitbumrung, W., Khomein, P., Suphantharika, M., McClements, D., Winuprasith, T., 2022. Controlling the in vitro gastrointestinal digestion of emulsified lipids by encapsulation within nanocellulose-fortified alginate beads. *Food Structure*, 32, 100266. <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100266>

Saberi, R., Moradi, M., Mohammadinejad, R., Thakur, V., 2021. Biopolymers for biological control of plant pathogens: Advances in microencapsulation of beneficial microorganisms. *Polymers*, 13(12), 1938. doi: <https://doi.org/10.3390/polym13121938>

Sallam, N., Eraky, A., Sallam, A., 2019. Effect of *Trichoderma* spp. on *Fusarium* wilt disease of tomato. *Molecular Biology Reports*, 46, 4463-4470. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04901-9>

Szczech, M., Maciorowski, R., 2016. Microencapsulation technique with organic additives for biocontrol agents. *Journal of Horticultural Research*, 24(1), 111-122. <https://doi.org/10.1515/johr-2016-0013>

Sehrawat, A., Sindhu, S., Glick, B., 2022. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere*, 32(1), 15-38. doi: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9)

Shi, J., Wu, X., Sun, R., Ban, B., Li, J., Chen, J., 2019. Nano-encapsulated phase change materials prepared by one-step interfacial polymerization for thermal energy storage. *Materials Chemistry and Physics*, 231, 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.04.032>

Shishir, M., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., Chen, W., 2018. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science and Technology*, 78, 34–60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.018>

Silva, K., Carvalho, A., Rabelo, R., Hubinger, M., 2019. Sacha inchi oil encapsulation: Emulsion and alginate beads characterization. *Food and Bioproducts Processing*, 116, 118–129. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2019.05.001>

Singh, T., Chittenden, C., 2021. Synergistic Ability of Chitosan and *Trichoderma harzianum* to Control the Growth and Discolouration of Common Sapstain Fungi of *Pinus radiata*. *Forests*, 12(5), 542. <https://doi.org/10.3390/f12050542>

Siqueira, P., Siqueira, É., De Lima, A., Siqueira, G., Pinzón, A., Lopes, A., ... Botaro, V., 2019. Three-dimensional stable alginate-nanocellulose gels for biomedical applications: Towards tunable mechanical properties and cell growing. *Nanomaterials*, 9(1), 78. <https://doi.org/10.3390/nano9010078>

Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., Ma, X., 2013. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96(1), 181-189. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.068>

Soni, B., Mahmoud, B., 2015. Chemical isolation and characterization of different cellulose nanofibers from cotton stalks. *Carbohydrate polymers*, 134, 581-589. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.031>

Sornakili, A., Thankappan, S., Sridharan, A., Nithya, P., Uthandi, S., 2020. Antagonistic fungal endophytes and their metabolite-mediated interactions against phytopathogens in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 112, 101525. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101525>

Sridharan, A., Sugitha, T., Karthikeyan, G., Nakkeeran, S., Sivakumar, U., 2021. Metabolites of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 inhibits soil borne pathogen, *Macrophomina phaseolina* by triggering amino sugar metabolism. *Microbial Pathogenesis*, 150, 104714. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104714>

Sriram, S., Roopa, K., Savitha, M., 2011. Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium. *Crop Protection*, 30(10), 1334-1339. [doi:https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.06.003](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.06.003)

Srivastava, M., Pandey, S., Shahid, S., Kumar, V., Singh, A., Trivedi, S., Kumar, Y., 2015. *Trichoderma*: A magical weapon against soil borne pathogens. *African Journal of Agricultural Research*, 10(50), 4591-4598. doi: 10.5897/AJAR2015.10192

Srivastava, M., Kumar, V., Shahid, M., Pandey, S., Singh, A., 2016. *Trichoderma*- a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. *African Journal of Agricultural Research*, 11(5), 310–316. <https://doi.org/10.5897/ajar2015.9568>

Sundaramoorthy, S., Balabaskar, P., 2013. Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 1(3), 036-040. <http://dx.doi.org/10.7324/JABB.2013.1306>

Supramaniam, J., Adnan, R., Kaus, N. H. M., Bushra, R., 2018. Magnetic nanocellulose alginate hydrogel beads as potential drug delivery system. *International journal of biological macromolecules*, 118, 640-648. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.043>

TariqJaveed, M., Farooq, T., Al-Hazmi, A., Hussain, M., Rehman, A., 2021. Role of *Trichoderma* as a biocontrol agent (BCA) of phytoparasitic nematodes and plant growth inducer. *Journal of Invertebrate Pathology*, 183, 107626. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107626>

Teo, A., Goh, K., Wen, J., Oey, I., Ko, S., Kwak, H., Lee, S., 2016. Physicochemical properties of whey protein, lactoferrin and Tween 20 stabilised nanoemulsions: Effect of temperature, pH and salt. *Food chemistry*, 197, 297-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.086>

Theivasanthi, T., Christma, F., Toyin, A., Gopinath, S., Ravichandran, R., 2018. Synthesis and characterization of cotton fiber-based nanocellulose. *International journal of biological macromolecules*, 109, 832-836. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.054>

Vaziri, A., Alemzadeh, I., Vossoughi, M., 2018. Improving survivability of *Lactobacillus plantarum* in alginate-chitosan beads reinforced by Na-tripolyphosphate dual cross-linking. *LWT*, 97, 440-447. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.037>

Vemmer, M., Patel, A., 2013. Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380–389. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>

Vinceković, M., Jalsenjak, N., Topolovec-Pintaric, S., Đermić, E., Bujan, M., Juric, S., 2016. Encapsulation of biological and chemical agents for plant nutrition and protection: chitosan/alginate microcapsules loaded with copper cations and *Trichoderma viride*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(43), 8073-8083. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02879>

Vinceković, M., Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., 2017. Kinetics and mechanisms of chemical and biological agents release from biopolymeric microcapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(44), 9608-9617. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04075>

Wickham, H., 2016. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. Retrieved from <https://ggplot2.tidyverse.org>

Yang, N., Wang, R., Rao, P., Yan, L., Zhang, W., Wang, J., Chai, F., 2019. The fabrication of calcium alginate beads as a green sorbent for selective recovery of Cu (II) from metal mixtures. *Crystals*, 9(5), 255. <https://doi.org/10.3390/cryst9050255>

Yang, Z., Song, B., Li, Q., Fan, H., Ouyang, F., 2004. Effects of surfactant and acid type on preparation of chitosan microcapsules. *China Particuology*, 2(2), 70-75. [https://doi.org/10.1016/S1672-2515\(07\)60026-8](https://doi.org/10.1016/S1672-2515(07)60026-8)

Zhang, S., Xu, B., Zhang, J., Gan, Y., 2018. Identification of the antifungal activity of *Trichoderma longibrachiatum* T6 and assessment of bioactive substances in controlling phytopathogens. *Pesticide biochemistry and physiology*, 147, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.006>

Zhao, H., Feng, X., Gao, H., 2007. Ultrasonic technique for extracting nanofibers from nature materials. *Applied physics letters*, 90(7), 073112. <https://doi.org/10.1063/1.2450666>

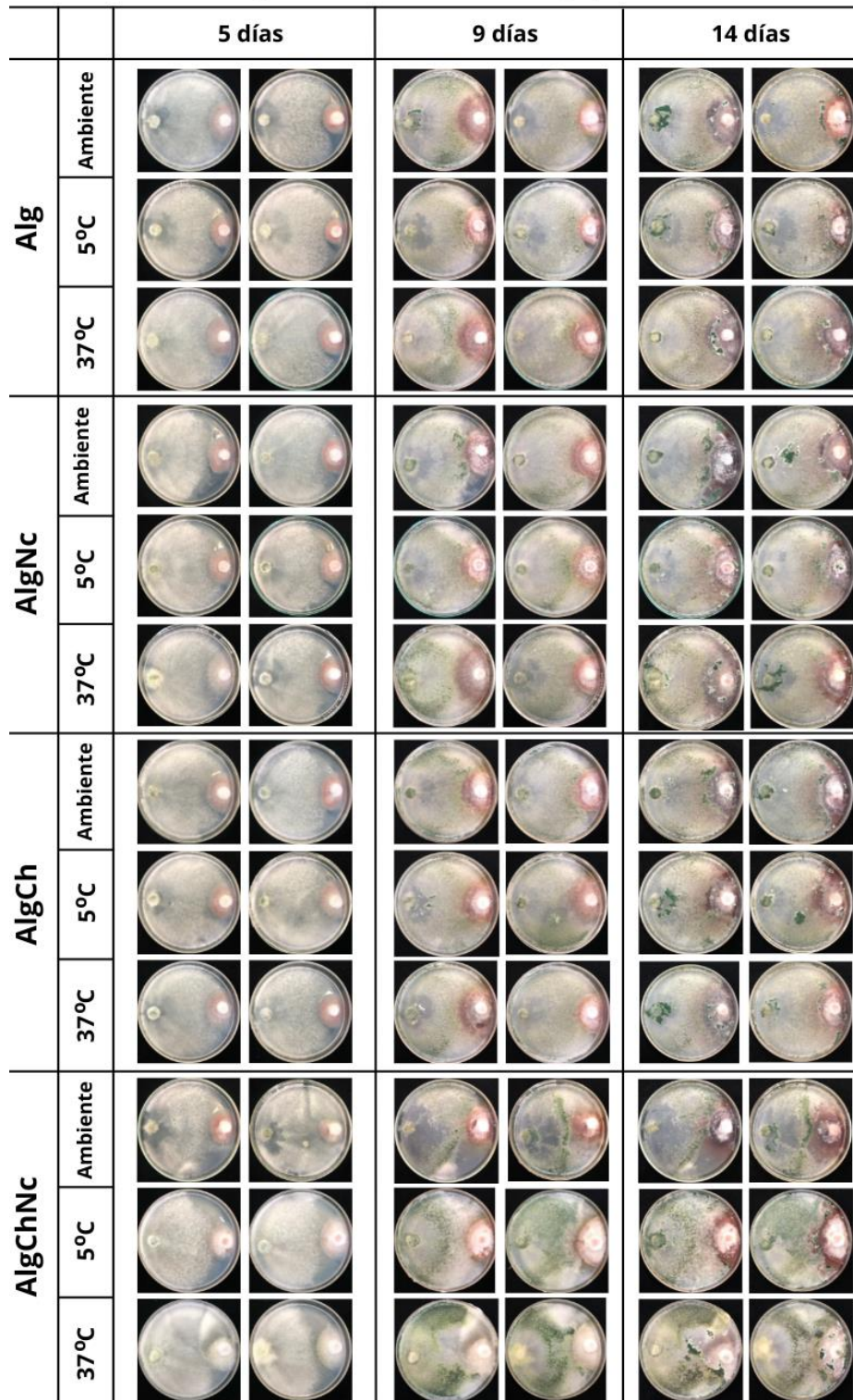
## 7. Material complementario

**Cuadro 3.** Bandas de absorción de los compuestos utilizados para las distintas formulaciones de microcápsulas.

Compuesto	Número de onda (cm <sup>-1</sup> )	Grupo funcional	Referencia
<b>Alginato de sodio</b>	1028	C-O-C	Mi et al., 2018.
	1409	COO-	Li et al., 2016.
	1595	COO-	Li et al., 2016.
	3257	O-H	Essifi et al., 2021.
<b>Qitosano</b>	1025	C-O-C	Mu et al., 2022.
	1152	C-O-C	Khorshidian et al., 2019.
	1374	N-H (Amida III)	Khorshidian et al., 2019.
	1592	N-H (Amida II)	Vaziri, Alemzadeh y Vossoughi, 2018.
	1651	C=O (Amida I)	Vaziri et al., 2018.
	2867	C-H	Khorshidian et al., 2019.
	3358	-NH <sub>2</sub> y -OH	Huo et al., 2018.
<b>Nanocelulosa</b>	1017	C-O-C	Jordan et al., 2021.
	1372	C-O	Pandi, Sonawane y Kishore, 2021.
	1652	O-H	Li, He, Chen y Zhao, 2021.
	3359	O-H	Theivasanthi et al., 2018.
<b>Carbonato de calcio</b>	712	CO <sub>3</sub> (out-of-plane bend)	Al-Hosney y Grassian, 2005.
	874	CO <sub>3</sub> (asymmetric stretch)	Al-Hosney y Grassian, 2005.
	1416	C-O (in-plane bend)	Böke, Akkurt, Özdemir, Göktürk, Saltik, 2004.

	1794	Banda combinada	Al-Hosney y Grassian, 2005.
	2509	Banda combinada	Al-Hosney y Grassian, 2005.
<b>Cloruro de calcio</b>	1627	H-O-H	Karunadasa, 2019.
	3393	-OH	Juric et al., 2019.

***T. longibrachiatum* vs *F. oxysporum***



**Figura 13.** Antagonismo in vitro de los conidios de *T. longibrachiatum* microencapsulado vs *F. oxysporum* posterior a la exposición de la formulación a tres diferentes temperaturas.