



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

QUÍMICA INDUSTRIAL SALIMAX LTDA.

**“APLICACIÓN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS PARA EL CONTROL DE CALIDAD
DE UN BIOPESTICIDA EN BASE A TRICHODERMA, MEDIANTE LA
CUANTIFICACIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO USANDO TÉCNICAS
MICROBIOLÓGICAS Y LA EVALUACIÓN DE SUS PROPIEDADES
FISICOQUÍMICAS”**

PAULA DANIELA CAMPOS VÁSQUEZ

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE QUÍMICO

JOSÉ MARIO LUIS ROMERO

REYES

PROFESOR PATROCINADOR

CLAUDIO ANDRES VALDÉS

RUSSU

DIRECTOR

SANTIAGO DE CHILE

Junio 2022

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Exportación de productos vegetales: Rol de Chile _____	1
1.2. Chile principal exportador de frutales _____	2
1.3. La calidad en frutas _____	3
1.4. Pesticidas en la agricultura _____	5
1.4.1. Pesticidas y sus efectos.....	8
1.5. Nueva mirada: Biopesticidas _____	9
1.5.1 Biopesticidas en Chile _____	11
1.6. Trichoderma <i>Harzianum</i> _____	12
1.7. Control de calidad y biopesticidas _____	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo general _____	18
2.2. Objetivos específicos _____	18
3. HIPÓTESIS	20
4. MATERIAL	21
4.1. Materiales _____	21
4.2. Equipos _____	21
4.3. Reactivos _____	22
5. MÉTODO	23
5.1. Criterios de inclusión y exclusión _____	23
5.2. Elección de la muestra _____	23
5.3. Estudio de la muestra _____	24
5.4. Tamaño muestral _____	24
5.5. Datos de la muestra informados por el fabricante _____	25
5.6. Inocuidad en cabina de seguridad citotóxica _____	28
5.7. Mediciones fisicoquímicas _____	28
5.7.1. pH	28
5.7.2. Densidad.....	29
5.7.3. Color, aspecto y sedimentación.....	29
5.8. Metodologías microbiológicas _____	30
5.8.1. Medio de cultivo.....	30
5.8.2. Cepa liofilizada de Trichoderma <i>harzianum</i>	31
5.8.3. Verificación de la morfología y crecimiento a partir del estándar	31

5.8.4.	Verificación de la concentración de la muestra	33
5.8.5.	Observación de la morfología de <i>Trichoderma harzianum</i>	34
5.9.	Ensayos secundarios	35
5.9.1.	Ensayo PDA	35
5.9.2.	Presencia de microorganismos nocivos para la salud humana en la muestra.....	35
5.9.3.	Ensayo de temperatura.....	36
6.	RESULTADOS	38
6.1.	Verificación de la Inocuidad en cabina de seguridad citotóxica	38
6.2.	Resultados fisicoquímicos	38
6.2.1.	Resultados de pH	38
6.2.2.	Densidad.....	39
6.2.3.	Color, aspecto y sedimentación.....	39
6.3.	Resultados Microbiológicos.....	41
6.3.1.	Validación de la Metodología	41
6.3.2.	Recuento de unidades formadoras de colonia de la muestra.....	43
6.3.3.	Resultados de observación de la morfología de la cepa en estudio.....	44
6.4.	Resultados ensayos secundarios	45
6.4.1.	Ensayo en medio de cultivo PDA.....	45
6.4.2.	Resultados de la presencia de microorganismos nocivos para la salud humana	45
6.4.3.	Resultados ensayo de temperatura.....	46
7.	DISCUSIÓN.....	47
8.	CONCLUSIONES.....	54
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
10.	ANEXOS.....	62
10.1.	Anexo 1: Pesticidas y biopesticidas manufacturados y comercializados en Chile.....	62
10.2.	ANEXO 2: Biopesticidas en el mercado chileno	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación de los plaguicidas según el peligro que presentan (OMS., s.f.).	6
Tabla 2: Clasificación de plaguicidas según vida media (Ramírez, J., y Lacasaña, M., 2001).	6
Tabla 3: Lotes de “Z” y su fecha de vencimiento.	26
Tabla 4: Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos constantes de los certificados de análisis de Z1-Z5.	26
Tabla 5: Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos variables en los certificados de análisis de Z1-Z5.	27
Tabla 6: pH de cada lote de “Z” y pH informado por el fabricante.	38
Tabla 7: Densidad de cada lote de “Z” y densidad informada por el fabricante.	39
Tabla 8: Color, aspecto y presencia de sedimento en reposo de cada lote de “Z”	39
Tabla 9: Promedio de las densidades ópticas, UFC/mL encontradas y SD en C1 y C9 en los distintos lotes de “Z”	43
Tabla 10: Verificación de la Presencia de Salmonella y E. Coli en “Z”.	45

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1: Morfología indicada por fabricante en el certificado de análisis para cada uno de los lotes de “Z”. Aumento de 10x en microscopio óptico.	27
Imagen 2: Ampolla estéril de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa 20522 de la CECT.	31
Imagen 3: Color de cada lote de “Z”.	40
Imagen 4: Aspecto y sedimentación en reposo de cada lote de “Z”.	40
Imagen 5: Control negativo y UFC encontradas en A9, A8 y A7.	42
Imagen 6: Morfología observada en cada uno de los lotes de “Z” a través de microscopio óptico con aumento de 10x.	44
Imagen 7: <i>Trichoderma harzianum</i> cultivada en (1) PDA con ác. Tartárico al 10% y en (2) PDA sin ác. Tartárico al 10%.	45
Imagen 8: Aglomeraciones de <i>Trichoderma harzianum</i> presentes en los lotes de “Z” luego de exponerlo a temperaturas fuera de su rango de estabilidad.	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Porcentajes de participación de las distintas categorías a nivel de exportaciones en Chile en 2018.	1
Figura 2: Frutales exportados por Chile y su porcentaje de participación en las exportaciones globales en el año 2020 (Subrei., 2021).	3
Figura 3: Densidad óptica obtenida en cada uno de los tubos utilizados en los ensayos de validación.	41
Figura 4: Relación entre densidad óptica de A1 con UFC/mL de A9.	42
Figura 5: Densidad óptica del ensayo completo para el lote "Z3".	44

ABREVIATURAS Y SIGLAS

CECT	:	Colección Española de Cultivos Tipo
Doc. G014	:	Density measurement (Guardado en carpeta OCDE)
<i>E. coli</i>	:	<i>Escherichia coli</i>
ODEPA	:	Oficina de estudios y políticas agrarias
OEC	:	The Observatory of Economic Complexity
OIML	:	Organisation Internationale de Metrologie Legale
PDA	:	Potato Agar Dextrosa
PDC	:	Caldo Potato Dextrosa
TSB	:	Tryptic Soy Broth
UFC	:	Unidades Formadoras de Colonias
XLD	:	Xlosa, Lisina y Desoxicolato
Z	:	Biopesticida en análisis
CIPF	:	Convención Internacional de Protección Fitosanitaria
OIE	:	Organización Mundial de la Sanidad Animal
OMS	:	Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Exportación de productos vegetales: Rol de Chile

Chile es el principal exportador en el mundo de diferentes productos vegetales de gran relevancia en el comercio mundial, donde sus destinos más habituales son China, Estados Unidos, Japón y Corea del Sur (OEC., 2019).

En datos reportados por The Observatory of Economic Complexity (OEC) en el año 2018, Chile se encuentra en la posición 42° del ranking de exportaciones a nivel mundial. Las principales exportaciones son lideradas por el rubro de la minería, participando dentro del mercado mundial con un 29%, luego los metales se encuentran en la segunda categoría con mayor tráfico comercial aportando un 26% y finalmente los productos vegetales, con una participación del 10% en el mercado, donde la fruta fresca es la categoría con mayor movimiento comercial (**figura 1**). (OEC., 2019).

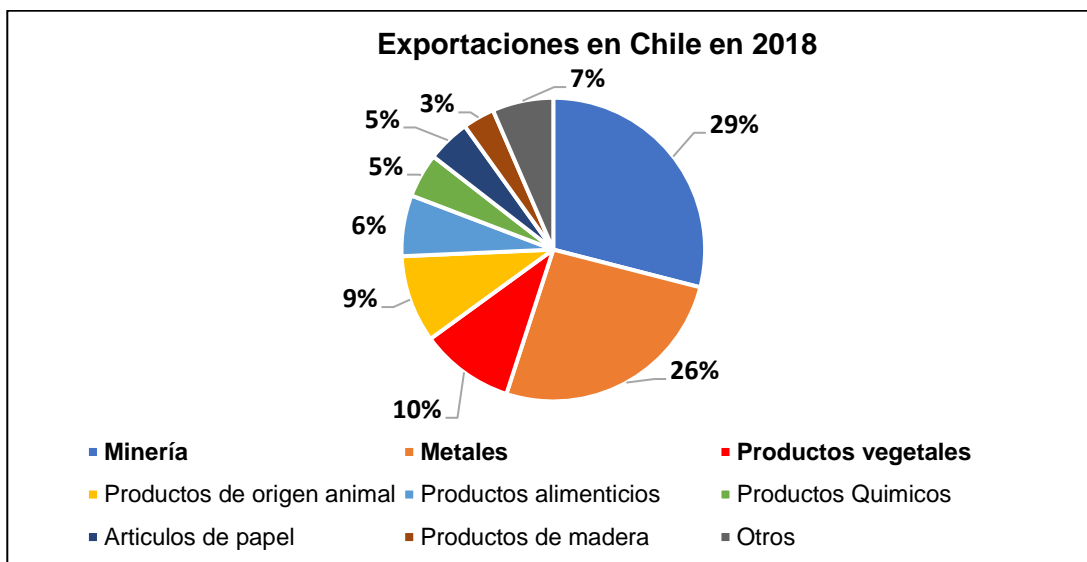


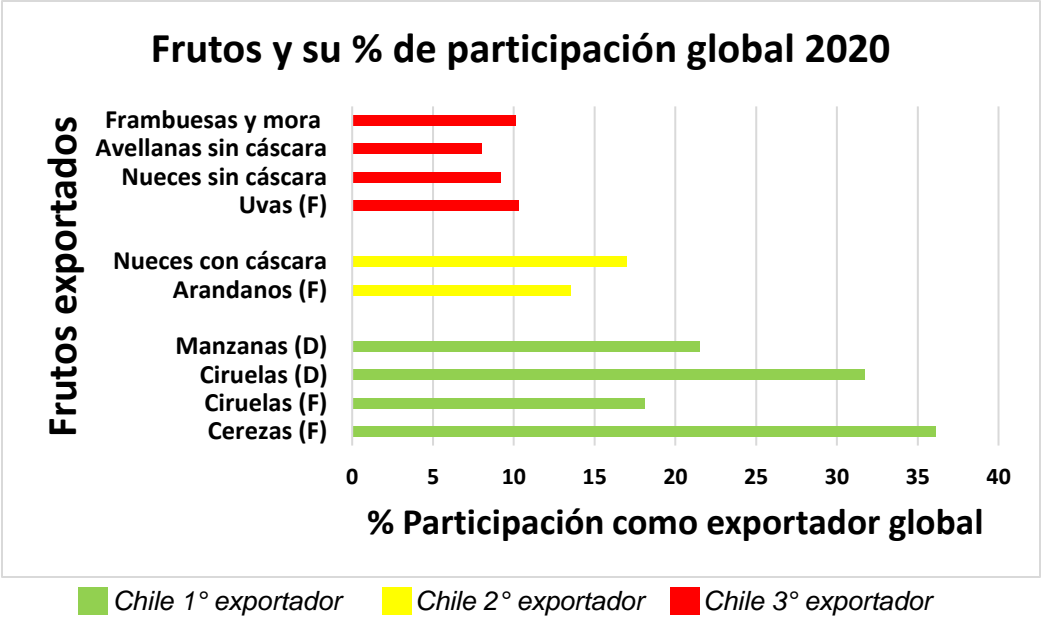
Figura 1: Porcentajes de participación de las distintas categorías a nivel de exportaciones en Chile en 2018.

Dicha tercera categoría con mayor movimiento comercial, compuesta por frutas y verduras, se posiciona como una de las principales fuentes de ingresos de Chile. Asimismo, lo reportó la Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA) del ministerio de agricultura y el ministerio de relaciones exteriores del Gobierno de Chile en el año 2019, donde Chile alcanzó los US\$5.608 millones en la exportación de envíos frutícolas en el periodo Enero-diciembre 2018, valor que corresponde a casi un 16% del total de ingresos aportados por las exportaciones no mineras. (Prochile., 2019). En el mismo sentido, en el 2018 las exportaciones totales de Chile experimentaron el mayor valor desde el año 2014 debido principalmente al movimiento generado por los embarques “no cobre”, alcanzando un total de US\$75.485 millones (Direcon., 2019), posicionando una vez más a los productos vegetales como una importante fuente de ingresos para Chile.

1.2. Chile principal exportador de frutales

Los indicadores globales de exportación del Centro de Comercio Internacional, quienes realizan comparaciones entre todos los países del mundo, presumieron importantes posiciones para Chile a nivel global en el año 2020. En dicho índice, se destaca que Chile lidera en los primeros 3 lugares en las categorías de industria minera, industria forestal, industria acuícola y en la agroindustria. En esta última, Chile se desempeña como el primer exportador mundial de cerezas frescas, ciruelas frescas y manzanas deshidratadas, como segundo mayor exportador global de arándanos y nueces con cáscara y como tercer exportador mundial de uvas, avellanas sin cáscara y frambuesas (Subrei., 2021) (**figura 2**), posicionándose desde el año 2016 como el primer exportador mundial de productos vegetales

(Latorre, B., y col., 2001). Así, Chile se ha convertido en el mayor productor de fruta del hemisferio Sur y el mayor exportador de fruta hacia el hemisferio Norte (Parra, L., y col., 2009), destacándose por la calidad de los alimentos proporcionados a los países receptores (Prochile., 2019).



*D: Deshidratadas, F: Frescas

Figura 2: Frutales exportados por Chile y su porcentaje de participación en las exportaciones globales en el año 2020 (Subrei., 2021).

1.3. La calidad en frutas

En la edad media, la calidad ya formaba parte importante del comercio, condenando a muerte a aquellos artesanos que ofrecían productos en mal estado. Esto se debía a la escasez de productos que existía y al alto costo de los bienes de consumo, considerándose a su vez un delito grave desperdiciar los recursos. (Herrera, J. N., 2002).

La real academia española define la palabra calidad como “*superioridad o excelencia*” y/o “*adecuación de un producto o servicio a las características especificadas*” (Real Academia Española, s.f.). Aceptando esta definición, se puede decir que un producto es de mejor calidad cuando es superior en uno o varios atributos que son valorados objetiva o subjetivamente (Camelo, A., s.f.). No obstante, es difícil otorgarle un significado único, ya que el significado que se le dé dependerá del producto en evaluación, lo que los consumidores esperan de él y lo que el mercado establece como adecuado para su venta. De esta forma, se definen tres aristas principales para la calidad, la aplicada al producto, al uso del producto y a su producción (Griful E., 2005).

Ahora bien, para que un frutal pueda ser comercializado con éxito, debe considerar las características esperadas por el consumidor, tales como, aspecto, aroma, sabor, color, tamaño, y elementos más tangibles que se experimentan al momento de la compra, que se traducen en obtener un fruto de calidad, fresco y sano (Echeverría, G., 2008). Para esto, se necesita proporcionar un cuidado excepcional a los frutales desde la siembra hasta los tratamientos post cosecha, para mantener la seguridad e inocuidad en los alimentos y prevenir heridas, que son vías de penetración para hongos y bacterias que producen pudrición en la fruta (FAO., 2022).

Chile desde el año 2014, pertenece al acuerdo internacional de sanidad vegetal llamado Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) que tiene como objetivo proteger los recursos vegetales mundiales de las plagas y enfermedades, evitando la propagación e introducción de estas en las plantas

(FAO., 2012), asegurando la biodiversidad, preservando la seguridad alimentaria y facilitando el comercio (FAO., 2022).

Asimismo, la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) y el Codex Alimentarium, son dos entidades que en paralelo a la CIPF colaboran con la inocuidad, la equidad en el comercio internacional y la calidad de los alimentos (FAO., 2022), aportando en conjunto al manejo de posibles plagas que se encuentren en los frutales en los procesos pre y post cosecha (FAO., 2022).

1.4. Pesticidas en la agricultura

La agricultura, es la segunda actividad económica con uso intensivo de recursos naturales que más aporta al producto interno bruto de Chile (3,1%), después de la minería (9,8%) (Zúñiga L., y col., 2022). Su protección y cuidado desde hace muchos años se realiza con pesticidas en base a compuestos químicos sintéticos para proteger y cuidar a los cultivos de las plagas que dañan y enferman a un gran número de plantaciones (Pandiselvam, R., y col., 2019). La definición de pesticida hace referencia a las sustancias químicas elaboradas con el fin de controlar, matar o repeler una plaga que provoque daño, pérdidas económicas o que transmita o produzca alguna enfermedad (Departamento de Reglamentación de Pesticidas de California., s.f.).

El uso de pesticidas se intensificó y expandió desde aproximadamente la segunda mitad del siglo XX (Butinof, M., y col., 2020) con el fin de incrementar la productividad y el rendimiento del sector agrícola (Cavieres, M., 2004). Estos, se clasifican en función de algunas de sus características como la toxicidad, vida media, estructura química y su uso (Ramírez, J., y Lacasaña, M., 2001).

La toxicidad y vida media fue establecida por la Organización mundial de la salud (OMS) quien los clasificó en IA, IB, II, III y IV (Véase tabla 1). Según su peligrosidad o toxicidad aguda, medida en dosis letal media (DL₅₀) o concentración letal media (CL₅₀).

Clase		DL ₅₀ para la rata (mg/kg de peso corporal)	
		Oral	Dérmica
Ia	Sumamente peligroso	< 5	< 50
Ib	Muy peligroso	5 - 50	50 - 200
II	Moderadamente peligroso	50 - 2000	200 - 2000
III	Poco peligroso	Más de 2000	Más de 2000
U	Poco probable que presente un peligro agudo	5000 o más	

Tabla 1: Clasificación de los plaguicidas según el peligro que presentan (OMS., s.f.).

Persistencia ^a	Vida media ^b	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico

Tabla 2: Clasificación de plaguicidas según vida media (Ramírez, J., y Lacasaña, M., 2001).

Por su estructura química, se identifican como grupos principales: Organoclorados, Organofosforados y Piretroides (Martínez, C., y col., 2007).

Finalmente, se clasifican según su uso, donde se destacan los funguicidas, bactericidas, herbicidas, acaricidas e insecticidas que controlan y/o previenen el crecimiento de hongos, bacterias, malezas, ácaros e insectos respectivamente (Valderrama, J., y col 2012).

Así, en la última década el uso de pesticidas agrícolas ha aumentado considerablemente, motivado en gran parte por la necesidad de aumentar la productividad agrícola para satisfacer las necesidades alimenticias de la población (Muñoz, M., 2011). Esto se evidencia en el informe entregado por el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) donde se muestra que las ventas de pesticidas han aumentado en aproximadamente un 21% desde el año 2009 (SAG., s.f.). Así, con un total de 1.348 pesticidas formulados de uso agrícola autorizados para la venta, un 41,9% corresponden a fungicidas y bactericidas, un 24,5% son insecticidas, acaricidas, nematocidas, rodenticidas, repelentes de aves y fumigantes, un 23,7% pertenecen a la categoría de herbicidas y finalmente un 9,8% corresponden a los encargados de crecimiento, caïromonas, coadyuvantes, antiescaldante y antitranspirantes (SAG., 2020).

Los principales pesticidas utilizados en la agricultura clasificados según su estructura química son los Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos y Tiocarbamatos (Ramírez, J., y Lacasaña, M., 2001). Estos son usados para el control de plagas y enfermedades comunes en los frutales del territorio nacional, conocidas por su nombre común como la pudrición gris, Mildiu, Chanchito blanco de la uva de mesa, fusariosis, polilla del racimo de la vid, chinche apestoso, mosquita blanca, pudrición blanca, entre otras (Chile Agrícola - Escuela de Capacitación., s.f.).

1.4.1. Pesticidas y sus efectos

Es innegable el efecto positivo que han otorgado los pesticidas en la agricultura, ya que con su uso, se generó un aumento en la productividad de las tierras agrícolas, producto del control de plagas dañinas que afectan y enferman a los cultivos, los cuales provocan pérdidas económicas (Olea, N., y Fernández, M., 2001).

Pero este efecto positivo tiene un costo, tal que su uso constante e indiscriminado para alcanzar los máximos estándares de calidad y de producción, han conllevado a efectos desfavorables en la salud de las personas, el medio ambiente, los suelos, en las aguas y en productos agrícolas. (Lans, E., y col., 2008). Tal es el grado de toxicidad que presentan algunos plaguicidas (Orta, L. 2002), que han provocado daños cognitivos y neuroconductuales, desarrollo de neoplasias, efectos negativos endocrinos y fisiológicos en niños, daños en el sistema nervioso central, trastornos motores, dificultades en la memoria de trabajo, déficits de atención, genotoxicidad (Muñoz, M., 2011), y posible descenso de la calidad seminal en el hombre (Avivar C., y col., 2009).

En el mismo sentido, el uso de pesticidas (principalmente organoclorados), utilizados en el control de plagas en cultivos agrícolas y para evitar crecimiento de malas hierbas, ha provocado importantes daños en los suelos (Piedrabuena, S., 2018), esto se debe a la resistencia que presentan algunos de ellos a la degradación biológica, lo que les permite acumularse en los suelos, clasificándose como pesticidas persistentes (Calva, L., y Torres, M., 1998). Esta acumulación está estrechamente relacionada con la estructura química que presentan (Valderrama, J., y col., 2012), lo que en algunos casos desfavorece la recuperación de suelos

para su reutilización en la plantación de nuevos cultivos, ya que, al permanecer y permear las capas del suelo se contaminan aguas subterráneas y se transportan a través de ellas llegando a aguas habitadas por animales, crustáceos y vida silvestre, lo que tiene como consecuencia una contaminación de las cadenas tróficas (Leal, S., y col., 2014).

En el año 2012 la revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable de la Universidad Autónoma de México publicó que, más del 50 % de las personas que fallecen por enfermedades asociadas a estos compuestos, son trabajadores agrícolas y el resto son envenenamientos por consumo de alimentos contaminados (Nava, E., y col., 2012).

Hasta ahora, se conoce la sintomatología de intoxicaciones agudas, pero no su efecto a largo plazo. De lo que si se tiene evidencia es de los niveles preocupantes de pesticidas en niños/as, trabajadores y población en general, con efectos en el funcionamiento cognitivo, el sistema nervioso, reproductivos, genotóxicos y carcinógenos (Zúñiga L., y col., 2022), lo que es altamente preocupante por el riesgo inminente en el que nos encontramos día a día. En Chile es escasa la información que se tiene respecto a las consecuencias de la exposición laboral y ambiental a los plaguicidas químicos.

1.5. Nueva mirada: Biopesticidas

Debido a la grave crisis ambiental, provocada principalmente por la explotación de los recursos naturales y el mal manejo de los desechos, es que el ser humano se ha replanteado la forma de cuidar y proteger el ecosistema. Grandes entidades, como la ONU han divulgado y promueven un desarrollo sustentable, que implica

satisfacer las necesidades actuales sin comprometer las posibilidades de generaciones futuras (Tommasino, H., y col., 2005). Es por esto, que se hace necesario mantener o aumentar la rentabilidad de la actividad agrícola mediante productos de alta calidad, considerando las exigencias ambientales, sociales y de salud que existen (Vargas, M.,1998).

Una de las grandes soluciones que se han encontrado y destacado desde hace varios años, es el uso de innovadores productos llamados biopesticidas (Castillo, F., y col., 2018). Estos, son elaborados en base a minerales, plantas, microorganismos y/o metabolitos (Resolución N° 9074, Ministerio de Agricultura de Chile), siendo capaces de prevenir, destruir, repeler o mitigar diferentes plagas y enfermedades que afectan a los cultivos (Seguí, E., 2013).

Los biopesticidas se dividen en dos grandes grupos, por un lado, los microbianos elaborados en base a bacterias, hongos, virus y protozoos, y por otro lado los bioquímicos, los cuales abarcan hormonas, reguladores del crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química, los cuales son muy importantes en la relación planta-insecto (Nava, E., y col., 2012).

Las principales ventajas que presentan los biopesticidas es que son más seguros para el ser humano ya que tienen poco riesgo de contaminar el aire, el suelo, el agua y de toxicidad aguda (Del Puerto, A., y col., 2014), su gran especificidad en su acción y su baja resistencia de los agentes patógenos a productos de origen biológico respecto a los productos de origen químico. En este sentido, la aplicación de biopesticidas, junto con otros métodos alternativos a los químicos, pueden alcanzar resultados satisfactorios sin perjudicar el entorno (Fernández, C., y Juncosa, R., 2002).

Como el ingrediente activo de los biopesticidas proviene de origen biológico o productos naturales derivados de plantas, los convierte en sustancias poco invasivas y poco dañinas contra otros organismos vivos como insectos y/o animales, ya que, no producen disminución de la biodiversidad, las plagas no generan resistencia, no generan desequilibrios en los agro sistemas y además son biodegradables. (Mamani de Marchese A., y Filippon, M.P., 2018). De esta manera, los biopesticidas se han transformado en una solución integral para el cuidado de los cultivos, son eficaces en el control y eliminación de plagas, no causan daños graves en el medio ambiente, no permanecen acumulados en suelos y no empeoran la contaminación ya existente (Leng, P., y col., 2011).

1.5.1 Biopesticidas en Chile

En Chile, de todas las empresas que elaboran pesticidas y/o biopesticidas, aproximadamente el 50% elabora biopesticidas. En este sentido, dentro de la gran variedad de productos que se desarrollan en ambas áreas (biopesticidas y pesticidas) son los pesticidas los que lideran estas cifras con alrededor de 230 productos en el mercado nacional y los biopesticidas con aproximadamente 25 productos manufacturados y comercializados en el país, al año 2019 (Anexo 1). En estos últimos mencionados se encuentran productos fungicidas, bactericidas, insecticidas, acaricidas y combinaciones de estos, donde aproximadamente un 50% son formulados en base a hongos y un 30% en base a bacterias y en menor medida en oleínas vegetales purificadas, fenoles, flavonoides, ácido silícico y ácido cafeico encapsulado en una matriz natural estable (Anexo 2).

Por un lado, el costo económico relacionado al uso de biopesticidas es ligeramente más costosa que la aplicación de pesticidas tradicionales (Calderón,

J., y Pacheco, K., 2021) pero tiene beneficios que permiten considerarlos como una opción de ahorro largo plazo, ya que en general facilitan la conservación del medio ambiente, no alteran las condiciones naturales de los cultivos, no tienen repercusiones en la salud humana y podrían presentar inclusive mayor eficacia que los plaguicidas químicos tradicionales al momento del control de plagas (Sandoval, T., 2021).

Además, según constata el “Portal Frutícola” que es un medio de comunicación líder en la industria hortofrutícola, en Chile, se está trabajando en normativas de estándar internacional que armonicen y logren regular la producción y calidad de bioplaguicidas que se comercializan en el país, con el fin de complementar la resolución exenta N°9074, la cual sólo establece los requisitos y condiciones para su autorización (Portal Frutícola., 2021), dejando de lado la regulación de su producción y el control de calidad externo.

1.6. Trichoderma Harzianum

Uno de los biopesticidas que en la actualidad se puede encontrar en el mercado chileno, corresponde a un producto elaborado en base a *Trichoderma* (SAG., 2022). Este género, destaca entre los hongos más importantes para el control biológico, gracias su amplia gama elementos biológicos útiles contra la acción de patógenos en el medio. Hoy en día, es ampliamente usado y comercializado, ya que es capaz de controlar y prevenir el ataque de hongos patógenos como botritis, mildiú, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytium*, *Verticillium* y esclerotinia (Guédez, C., y col., 2012), los cuales afectan a una gran variedad de cultivos de exportación como la vid, arándanos, frutillas, frambuesas,

tomates, lechuga, pimentón, duraznos, ají, palto, nogal, limón, ciruelo, damascos y manzano (Biogram, 2019).

Trichoderma actúa mediante tres tipos de mecanismos de acción, por competencia, mico parasitismo y antibiosis. Además, induce mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos en la planta, elimina toxinas excretadas por los patógenos, solubiliza elementos nutritivos, que en su forma original no son accesibles para las plantas y estimula el crecimiento de la planta aumentando su tolerancia al estrés (Martínez, H., y col., 2017). Todos estos mecanismos de acción lo convierten en un biopesticida eficiente y duradero (Martínez, B., y col., 2013). Además, este género se caracteriza por ser un hongo saprófito, es decir, sobreviven en suelos con materia orgánica, siendo capaces de descomponerla. Este hongo ha demostrado ser altamente específico en su modo de acción de mico parasitismo, logrando ser efectivo sólo contra patógenos determinados (Infante, D., y col., 2009).

El mecanismo de acción por competencia (Martínez, B., y col., 2013), funciona por antagonismo, ya que, debido a la rapidez de su crecimiento, facilidad de adaptación y abundante esporulación, logra reducir la cantidad de espacio y nutrientes disponibles para el patógeno que se desea controlar (Infante, D., y col., 2009).

El mico parasitismo (definido como una simbiosis antagónica entre diferentes organismos) y la actividad lítica (producción de enzimas líticas extracelulares), involucran enzimas extracelulares que logran la degradación de paredes celulares conllevando al debilitamiento del fitopatógeno. Además, el género Trichoderma tienen la característica de tener quimio tropismo positivo, es decir, logra crecer directamente hacia un estímulo químico logrando detectarlo a distancia. En adición,

el *Trichoderma* también actúa por antibiosis, es decir, es capaz de producir ciertos metabolitos que actúan directamente sobre otro organismo sensible a estos (Infante, D., y col., 2009).

Para que este hongo se mantenga estable en el tiempo, es de vital importancia su formulación. En este sentido, los excipientes usados en la formulación no deben tener actividad biológica sobre animales, plantas o insectos benéficos, deben ser inocuos para el medio ambiente y presentar características físicas adecuadas para su mezcla con el principio activo. También, las formulaciones deben considerar viscosidad, protección UV, tensoactivos, solventes y nutrientes o estimulantes que favorezcan la longevidad del hongo (Gato, Y., 2010).

Si lo relacionamos con la actividad comercial de exportación de frutales en Chile, *Trichoderma harzianum*, tiene la característica de ser capaz de controlar y proteger a los principales frutales de exportación del país, como la parra, el manzano, el cerezo, el ciruelo y el palto (Biogram., 2019).

Por otra parte, la morfología que caracteriza al hongo *Trichoderma* se identifica por la formación de anillos concéntricos de un color blanco hasta una tonalidad verdosa, con colonias que presentan un diámetro aproximado de 8-9 cm después de 7 días de incubación y vista bajo microscopio ópticos las esporas crecen de forma piramidal (Acurio, R., y col., 2017).

1.7. Control de calidad y biopesticidas

El control es el conjunto de actividades que se realizan con el fin de verificar que una determinada tarea, producto o actividad se está llevando a cabo bajo los parámetros previamente establecidos para un objetivo y tiene como fin, corregir

cualquier desviación de lo esperado que pueda provocar una condición adversa (Acuña, J., 2012).

La calidad, se define según la RAE como “*Propiedad o conjunto de propiedades inherentes a algo, que permiten juzgar su valor*” (Real Academia Española). En este sentido, el control de calidad hace referencia al proceso que se encarga de garantizar la adecuada realización de todas las etapas necesarias que se desempeñan a lo largo de cualquier proceso productivo y/o prestación de servicios, y con ello tener un respaldo confiable de que el producto y/o servicio cumple con las características especificadas y las legislaciones correspondientes (Raffino M., 2019).

De esta manera, el control de calidad se establece de forma general, como conjunto de inspecciones que se realizan a lo largo de todo proceso, con el fin de realizar las mejoras y correcciones pertinentes para lograr que los parámetros y características previamente especificadas para el producto o servicio requerido se cumplan, evitando así que llegue al consumidor un producto y/o servicio defectuoso (Acuña, J., 2012).

El control de calidad es de vital importancia para la competitividad de las empresas (Cubillo, M., y col., 2009) ya que un producto/servicio que cumpla con los estándares y características deseadas por los consumidores se comercializa rápidamente, genera confianza en el consumidor y va posicionando a la empresa en el mercado como “mejor que otros”, provocando lealtad del cliente (que se traduce en futuras ventas), difusión gratuita (que se traduce en nuevos clientes) y una determinada participación en el mercado (Thompson, I., 2005).

Si hablamos de la producción específica de biopesticidas, el control de calidad es uno de los factores claves a considerar. Éste, consiste en una evaluación rigurosa y exigente de cada uno de los procesos involucrados en su producción, con el objetivo de evitar problemas relacionados a la calidad del producto terminado, ya que existe una gran cantidad de microorganismos contaminantes, de los cuales, algunos son considerados patógenos para los humanos como la *Salmonella spp* (Parra, M., 2002) y la *E.coli* (Momba, M., 2006). En consecuencia, a través del control de calidad se logra obtener productos puros, con buenas características de crecimiento, de eficacia para el control de las plagas y evitar los problemas de contaminación en los productos y en la salud (Monzón, A., 2001).

De esta manera, considerando el importante rol que posee Chile a nivel de exportaciones de frutales y los avances a nivel cultural de ir en pro de una agricultura sustentable, es que se hace necesario consolidar el control de calidad en biopesticidas. Esto contribuiría enormemente a la protección de los cultivos, el medio ambiente, la salud de la población, el suelo y el ecosistema en general.

En Chile, la entidad encargada de controlar y fiscalizar los productos elaborados en base a compuestos químicos y biológicos es el SAG. Si hablamos en específicos de los biopesticidas, su comercialización es regulada a través de la resolución exenta N°923 titulada "*Condiciones y requisitos para autorizar la comercialización de plaguicidas microbianos*", donde se expresan requerimientos analíticos, técnicos y de etiquetado del producto para ser comercializado.

Entre los requisitos analíticos y técnicos más importantes exigidos en la Res. Ex. N°923, se pueden mencionar los siguientes:

- *Metodología y criterios utilizados para la identificación, reconocidos a nivel científico internacional (como morfología, bioquímica, serología, identificación molecular, etc.).*
- *Técnicas aplicadas para garantizar la uniformidad del producto, los métodos de ensayo relativo a la normalización de la producción, el mantenimiento y la pureza del microorganismo, los protocolos o procedimientos de control de calidad de la producción, en especial respecto a la presencia de toxinas (endotoxinas, aflatoxinas, etc.), las técnicas y protocolos aplicados para asegurar la ausencia de patógenos humanos (E. coli, Salmonella, etc.).*
- *Contenido mínimo y máximo del microorganismo en el material utilizado, expresado en unidad de medida que corresponde, como el número de unidades activas (unidades formadoras de colonia, UFC) por volumen o peso, u otra forma que sea pertinente para el microorganismo. Debe estar respaldado por la determinación analítica en al menos 5 lotes de fabricación.*

Estos análisis son realizados por la entidad que busca elaborar y/o comercializar un biopesticida, y son remitidos al SAG para que autorice su comercialización en el territorio chileno. Por otra parte, no se encontró registro sobre la periodicidad con la que el SAG valida y fiscaliza a estas entidades productoras de biopesticidas.

Por estas razones, es se hace relevante en Chile aplicar de forma externa, técnicas analíticas y microbiológicas que permitan controlar la calidad de un biopesticida, mediante la cuantificación del principio activo declarado por el fabricante (supone efectiva para controlar la plaga), la evaluación de la

ausencia/presencia de microorganismos patógenos para humanos y la evaluación de propiedades fisicoquímicas óptimas para su uso, confirmando así, que los productos comercializados se encuentran en regla con lo establecido por el SAG y son coincidentes con lo que estas entidades informan en su certificado de análisis, para lograr un efectivo control de plagas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Aplicar técnicas de análisis fisicoquímicas y microbiológicas para realizar un control de calidad a un biopesticida en base a Trichoderma disponible en el mercado nacional chileno.

2.2. Objetivos específicos

- Seleccionar un producto en base a Trichoderma que tenga directa relación con el control de plagas que afectan a algunos de los cultivos (Frutales) de mayor exportación en Chile.
- Aplicar técnicas microbiológicas para un control de calidad a un biopesticida en base a Trichoderma.
- Aplicar técnicas fisicoquímicas para un control de calidad a un biopesticida en base a Trichoderma.
- Verificar y cuantificar el contenido del biopesticida en base a Trichoderma seleccionado.
- Comparar los resultados obtenidos en este estudio con lo informado en el certificado de análisis otorgado por el fabricante del producto seleccionado.

- Verificar el cumplimiento de los aspectos relacionados con la cuantificación del principio activo, morfología, inocuidad y propiedades fisicoquímicas, expuestos en la legislación chilena vigente para la comercialización de biopesticidas.

3. HIPÓTESIS

Las técnicas fisicoquímicas y microbiológicas usadas para el control de calidad del biopesticida en base a *Trichoderma*, indican que está en condiciones óptimas para su comercialización.

4. MATERIAL

4.1. Materiales

- Micropipetas (0.1 ml y 1 ml)
- Puntas de micropipetas (0.1 ml y 1 ml)
- Tubos falcon de 15 ml
- Microplacas de 96 pocillos
- Placas Petri (10 cm)
- Frascos Schott
- Vasos precipitados
- Picnómetro
- Termómetro de inmersión
- Guantes
- Cubre brazo
- Delantal
- Gafas
- Pipeta serológica

4.2. Equipos

- Cabina de seguridad biológica BIOBASE, modelo BSC-1300II A2-X
- Estufa
- pH metro
- Autoclave DAIHAN, modelo WACS-1080
- Lector de microplacas BIOTEK, modelo Elx800
- Microscopio óptico Konus academy 5304 -10/0.25

4.3. Reactivos

- Alcohol al 70%
- Medio de cultivo Potato Agar Dextrosa (PDA) Himedia – N° de cat. M096
- Medio de cultivo Tryptic Soy Broth (TSB) Becton Dickinson - N° de cat. 257107
- Medio de cultivo Caldo Rappaport Merck – N° cat, 107700.0500
- Medio de cultivo Xlosa, Lisina y Desoxicolato (XLD) Becton Dickinson – N° de cat. PA-254055.06
- Agar MacConkey Merck – N° cat. 1.05396.0500
- Peptona 0,1% Becton Dickinson - N° de cat. 211677
- Ácido tartárico al 10% ICR- ACT-1K

5. MÉTODO

5.1. Criterios de inclusión y exclusión

Se consideraron sólo biopesticidas en base a *Trichoderma* manufacturados en Chile, excluyendo a los biopesticidas que son importados para ser comercializados en Chile.

5.2. Elección de la muestra

Para llevar a cabo la elección del biopesticida, se recopiló información de los biopesticidas en base a *Trichoderma* disponibles en el mercado Chileno que sean capaces de controlar o prevenir las principales enfermedades que dañan a los frutales con mayor porcentaje de participación en las exportaciones, que además, perteneciera al listado de principios activos autorizados para su comercialización por el SAG, que tuviese disponibilidad inmediata de compra y que el principio activo fuese de interés para Química Industrial Salimax Ltda, laboratorio en el cual se desarrolló esta investigación.

En este sentido, los principales frutales para exportación en Chile son Parra (uva), Manzano (manzana), Cerezo (cereza) y Palto (palta). Para cada uno de ellos existen enfermedades perjudiciales que afectan el crecimiento del fruto. Dentro de las más comunes se encuentran el oídio (*Uncinula necator*)(Cruz M., 2004), mildiu (*Plasmopara vitícola*) y podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) (Latorre B., y col., 2001) para el caso de la uva. Asimismo, encontramos la sarna del manzano (*Ingequalis venturia*) y la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), para el manzano, la Moniliasis (*Monilinia spp*), verticilosis (*Verticilium dahliae*) y Pudrición del cuello (*Phytophthora*

cactorum) para el cerezo (Latorre B., 2004), (*Verticillium dahliae*), Verticiliosos, pudrición radical (*Phytophthora cinnamomi*) y marchitez necrótica (*Dothiorella gregaria*) para el palto. (Latorre B., y col.)

De esta manera, se seleccionó el producto “Z”, cuyo principio activo es la cepa *Trichoderma harzianum*, el cual es un hongo anaerobio facultativo, capaz de controlar y proteger a la Parra y Manzano de la podredumbre gris y al Cerezo y Palto de la pudrición radical. Dicho biopesticida se encontraba disponible inmediatamente al momento de realizar la investigación.

5.3. Estudio de la muestra

Para este estudio se realizó la recuperación de un liófilo de *Trichoderma harzianum*, siguiendo las instrucciones dadas por la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), entidad de donde se obtuvo el liófilo. Además, se aplicó diferentes metodologías para la cuantificación del hongo (concentración), para medición de su pH, para medición la densidad, para pruebas de sedimentación, entre otras más, con el fin de comparar los parámetros que indica el fabricante del producto con los obtenidos en el análisis de 5 lotes de fabricación diferentes.

5.4. Tamaño muestral

Según lo expuesto el título IV de la Resolución Exenta N°9074 promulgada el 18 de diciembre del 2018 por el Ministerio de Agricultura, la Subsecretaría de Agricultura, el Servicio Agrícola y Ganadero y la Dirección Nacional del Gobierno de Chile, la cual hace referencia a las condiciones y requisitos establecidos para autorizar la comercialización de plaguicidas microbianos en Chile, se establece que el contenido máximo y mínimo declarado de principio activo de un producto, debe

estar respaldado por la determinación analítica en al menos 5 lotes de fabricación, por lo que se decide trabajar en base a esta determinación.

De esta manera, se consideraron cinco lotes de fabricación para el análisis microbiológico y fisicoquímico del producto seleccionado (en adelante llamado “Z”), con el fin de verificar que los resultados expuestos por el fabricante sean fidedignos y no fortuitos para cualquier análisis. Así, los lotes de fabricación que fueron usados para este estudio serán llamados en adelante como **Z1, Z2, Z3, Z4 y Z5**.

5.5. Datos de la muestra informados por el fabricante

En los certificados de análisis otorgados por el fabricante, se exponen los resultados de análisis fisicoquímicos, microbiológicos y morfológicos para cada lote de producción (**Imagen 1**).

Dentro de lo informado en los certificados de análisis de “Z”, se encuentran parámetros que se mantienen constantes (**Tabla 4**) y otros que son variables (**Tabla 5**), tanto en el área fisicoquímica como en la microbiológica. Además, se adjuntan las fechas de vencimiento de cada lote de fabricación (**Tabla 3**).

LOTE	FECHA DE VENCIMIENTO
Z1	11/05/2020
Z2	02/07/2020
Z3	11/07/2020
Z4	23/07/2020
Z5	26/07/2020

Tabla 3: Lotes de “Z” y su fecha de vencimiento.

PARÁMETROS	UNIDAD	VALOR ESPERADO	RANGO ²	APROBACIÓN	METODOLOGÍA
PH*	-	6.2	5.8-6.5	Aprobado	Potenciométrica
DENSIDAD*	gr/cm ³	0.99	0.98-1.00	Aprobado	Gravimétrica
COLOR	N/A	Verde	N/A	Aprobado	N/A
ASPECTO	N/A	Suspensión líquida	N/A	Aprobado	N/A
SEDIMENTO	N/A	Presencia en reposo	N/A	Aprobado	N/A
RECUENTOS VIABLES**	UFC/mL	1x10 ⁸	≥1x10 ⁸	Aprobado	Diluciones seriadas
GERMINACIÓN***	%	80	75 a 100	Aprobado	N/I
PUREZA	%	100	100	Aprobado	N/I

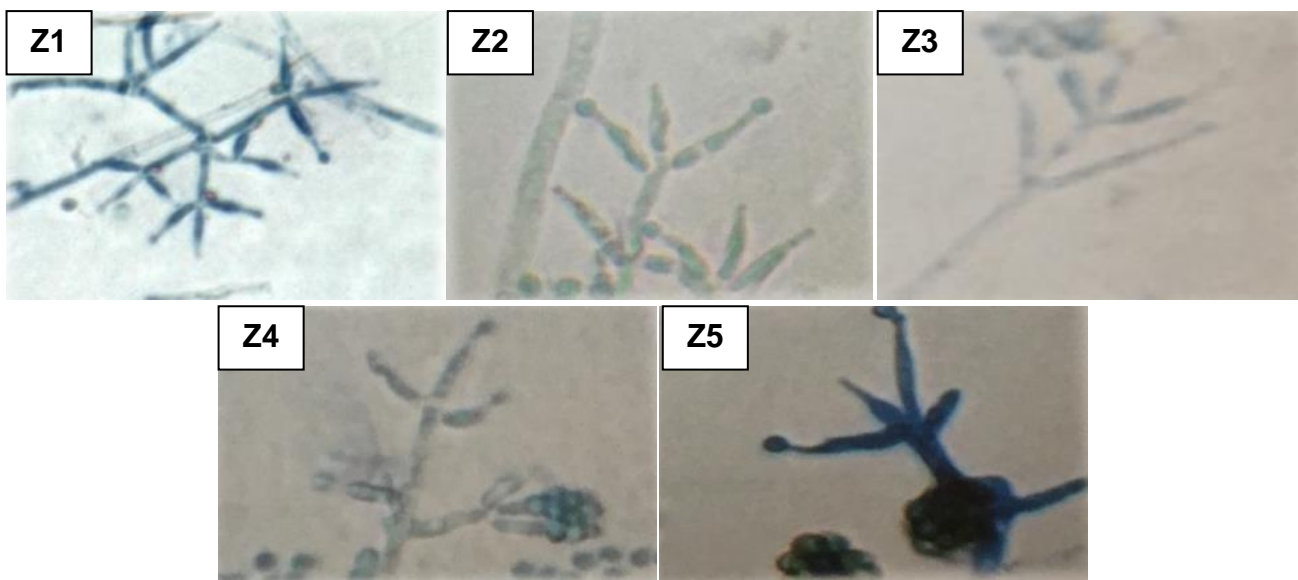
Tabla 4: Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos constantes de los certificados de análisis de Z1-Z5.

(N/A: No aplica, N/I: No informado)(*Medido a 20°C, **Incubación por 5 días a 25°C, ***Lectura de 48hrs.)

PARÁMETRO	VALOR EMPÍRICO Z1	VALOR EMPÍRICO Z2	VALOR EMPÍRICO Z3	VALOR EMPÍRICO Z4	VALOR EMPÍRICO Z5
PH	5.84	6.0	6.05	5.86	5.99
DENSIDAD	1.00	0.98	0.98	0.99	0.98
RECuentos VIABLES (UFC/ML)*	1.41x10 ⁸	1.98x10 ⁸	2.01x10 ⁸	3.45x10 ⁸	3.63 x 10 ⁸
GERMINACIÓN (%) **	100***	100***	100 ***	100***	100***
PUREZA (%)	100	100	100	100	100

Tabla 5: Parámetros fisicoquímicos y microbiológicos variables en los certificados de análisis de Z1-Z5.

(*) Incubación por 5 días a 25°C. (**) Lectura en 48hrs. (***) Lectura en 24hrs



5.6. Inocuidad en cabina de seguridad citotóxica

Antes de comenzar los análisis se realizó limpieza de la cabina de seguridad biológica Biobase, modelo BSC-1300II A2-X, utilizando alcohol al 70% para la desinfección interna de la cabina antes y después de la realización de los análisis, utilizando luz ultravioleta (UV) previo a la limpieza inicial y posterior a la limpieza final, por un tiempo de 15 min (Vallés, G., y col., 2022) y periódicamente se realizó control de esterilidad con medios de cultivos no selectivos para descartar presencia de hongos y/ bacterias en la cabina.

5.7. Mediciones fisicoquímicas

Todas las mediciones se realizaron a una temperatura de 20° C, controlado con termómetro de inmersión. Además, fueron realizadas bajo campana de esterilidad (cabina de seguridad citotóxica), la cual fue limpiada antes y después de cada trabajo y previo a los 15 min con luz ultravioleta. Se usó siempre el equipo de protección personal (EPP) como, guantes, cubre brazo, delantal, gafas y utilizando alcohol al 70% para la limpieza de campana y sanitización de los productos e instrumentos que ingresaban en ella. Por otra parte, antes de tomar la muestra se homogeneizó cada contenedor para obtener una muestra representativa de cada lote.

5.7.1. pH

Se calibró el equipo de medición de pH según las instrucciones entregadas por el fabricante (Thermo Orion Star A1210). Una vez hecho esto, se procedió a la medición por quintuplicado del pH de los diferentes lotes de fabricación del biopesticida (Z1-Z5) a partir de una alícuota de 20ml, medidos con pipeta serológica.

5.7.2. Densidad

Los certificados de análisis de los lotes de producción de “Z”, indican que se trabajó con un método gravimétrico para realizar la medición de densidad. De esta manera, el método gravimétrico utilizado para realizar la medición fue *picnometría*. Este procedimiento se realizó según lo expuesto por la "Organisation Internationale de Metrologie Legale" (OIML) en su documento "Density measurement". La medición se realizó por quintuplicado para cada lote de fabricación (Z1-Z5).

5.7.3. Color, aspecto y sedimentación

Se observó y registró en un Excel de forma manual el color, el aspecto y la sedimentación presente en cada lote del producto “Z”.

5.8. Metodologías microbiológicas

En los datos entregados por el fabricante de cada uno de los lotes de “Z”, se especifica que el método utilizado para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) fue dilución en serie. En consecuencia, se utilizó el mismo procedimiento para realizar las mediciones microbiológicas de *Trichoderma harzianum* en este trabajo de investigación (dilución seriada según la proporción 1:10). Además, todos los procedimientos fueron realizados bajo cabina de seguridad biológica Biobase, modelo BSC-1300II A2-X, estrictas medidas de seguridad y utensilios esterilizados en autoclave DAIHAN modelo WACS-1080.

La cepa *Trichoderma harzianum* de comparación para realizar el recuento de UFC fue importada y obtenida desde la “Colección Española de Cultivos Tipo” (CECT) (*ver punto 5.8.2.*).

5.8.1. Medio de cultivo

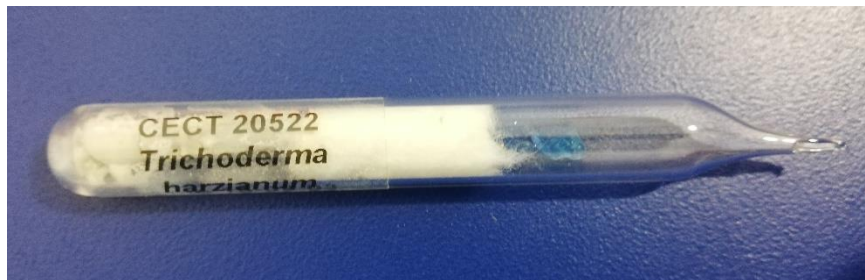
Un medio de cultivo es aquel sustrato o sustancia que le aporta los nutrientes necesarios a un microorganismo para que se desarrolle. Para el caso de *Trichoderma harzianum*, el medio *papa agar dextrosa* (PDA) es óptimo para su desarrollo (Universitat do valencia., 2021), ya que permite el aislamiento de la cepa, otorgándole estabilidad a los parámetros fisicoquímicos de este microorganismo.

5.8.1.1. Preparación de los medios de cultivo

Siguiendo las recomendaciones emitidas por la CECT para la reconstitución y crecimiento de su microorganismo, se preparó medio de cultivo de caldo papa dextrosa (PDC), preparado bajo las indicaciones de la CECT y PDA Himedia – N° de cat. M096.

5.8.2. Cepa liofilizada de *Trichoderma harzianum*

La cepa liofilizada (obtenida desde la CECT) de *Trichoderma harzianum* con código CECT 20522, lote 15-09-03, en formato de ampolla estéril (**Imagen 2**), fue reconstituida, activada e incubada siguiendo paso a paso las instrucciones técnicas y procedimientos expuestos por la misma entidad.



5.8.3. Verificación de la morfología y crecimiento a partir del estándar

Con el fin de verificar la morfología y crecimiento normal de *Trichoderma harzianum* y que los ensayos a realizar en el control de calidad en “Z” sean válidos y comparables con los expuestos por el fabricante, se realizó una validación de la metodología utilizada para el recuento de UFC, usando la cepa CECT antes mencionada. Se procedió de la siguiente manera para obtener una relación entre concentración de la cepa y su densidad óptica:

1. En una gradilla se colocaron 18 tubos *falcon* de 15 mL, donde 9 de ellos correspondían a las concentraciones buscadas de dilución (**grupo A**: A1 – A9) y los otros 9 tubos fueron usados como blancos (**grupo B**: B1 – B9).
2. Se enumeraron los tubos del 1 al 9 en cada grupo.

3. Al primer tubo del grupo A (A1) y del grupo B (B1) se le adicionó 10 ml de agua destilada estéril. Al resto (A2 – A9 y B2 – B9), se le adicionó 9 ml de solución amortiguadora peptona 0,1% Becton Dickinson - N° de cat. 211677.
4. Utilizando un aza estéril se incorporó en A1 pequeñas cantidades de *Trichoderma harzianum* - CECT (cultivada previamente). Una vez que el tubo comenzó a tornarse de color verdoso (característico del hongo en estudio), se procedió a homogeneizar la solución mediante agitación.
5. Desde la solución recientemente preparada de A1, se tomó una alícuota de 1 mL y fue llevada al tubo A2 agitando para homogeneizar. Posteriormente una alícuota de igual volumen fue llevada de A2 a A3 agitando para homogeneizar. De este mismo modo se llevó a cabo las siguientes diluciones hasta el tubo A9.
6. Desde la solución B1, se tomó una alícuota de 1 mL y fue llevada al tubo B2 agitando para homogeneizar. Luego, una alícuota de igual volumen fue llevada de B2 a B3 agitando para homogeneizar. De este mismo modo se llevó a cabo las siguientes diluciones hasta el tubo B9.
7. Se le realizó un barrido de absorbancia para conocer la longitud de onda óptima para la medición de *Trichoderma harzianum* obteniendo mejores resultados de absorbancia a los 630 nm. Por lo que el presente estudio se realizó bajo esta longitud de onda, aun cuando en otros estudios de cuantificación de hongos se trabajaron con longitudes de ondas de 452nm (Rojas, O., y col., 2004) y 595nm (Cruz, M., 2013).

8. Se le realizó la medición de densidad óptica con lector de microplacas BIOTEK, modelo Elx800 a cada tubo del grupo A y B por triplicado a una longitud de onda de 630 nm.
9. Usando medio PDA a 45°C, se cultivó el contenido de cada tubo perteneciente a los grupos A y B. Para esto, se tomó una alícuota de 1 ml a cada uno de los tubos y se depositó en una placa Petri. El procedimiento se realizó en triplicado. Todas las placas fueron llevadas a estufa a 25° C por 7 días.
10. Se realizó el recuento de UFC.

Los datos obtenidos del procedimiento descrito anteriormente fueron utilizados para la construcción de la curva de calibración necesaria para la verificación de la concentración en “Z” (5.8.4.).

5.8.4. Verificación de la concentración de la muestra

La concentración expuesta en el envase de “Z” es de 10^8 UFC de *Trichoderma harzianum*/mL. Para verificar la concentración de cada lote se procedió de manera similar al punto anterior (5.8.3.), exceptuando las siguientes modificaciones:

- A los diferentes tubos de los lotes de “Z” se les asignó una letra “C” (antes llamado “A”). De esta manera, el primer tubo de cada lote de fabricación se le llamó “C1” y al último “C9”. El blanco se preparó de la misma manera descrita.
- **Modificaciones punto 3:** Al primer tubo de cada lote (C1) se le adicionó 10 ml de “Z1 – Z5” según corresponda.
- El **punto 4** no aplica, ya que “Z” es una suspensión líquida.

5.8.5. Observación de la morfología de *Trichoderma harzianum*

Mediante observación simple en microscopio óptico Konus academy 5304 - 10/0.25, se comparó la morfología de la cepa *Trichoderma harzianum* cultivada, con la informada en el certificado de análisis de cada uno de los lotes de “Z”.

5.9. Ensayos secundarios

5.9.1. Ensayo PDA

Según la ficha técnica entregada por el fabricante del biopesticida en estudio, *Trichoderma harzianum* es una especie que prefiere un pH ácido para su crecimiento que va de 5 – 7 y que además se logra desarrollar en áreas con alto contenido de humedad.

Por otra parte, el medio de cultivo PDA es un medio nutritivo no selectivo. Sin embargo, puede lograr ser selectivo, si el medio de cultivo se acidifica mediante adición de ácido tartárico al 10% ICR- ACT-1K, llevándolo a un pH final de 3,5.

Se realizan pruebas de cultivo tanto en PDA acidificado, como en PDA sin modificaciones.

5.9.2. Presencia de microorganismos nocivos para la salud humana en la muestra

Tal como lo exige la legislación vigente (BCN., 2022) se evaluó la presencia de microorganismos nocivos para la salud humana en el biopesticida en estudio, tales como *Salmonella* y *Escherichia coli* (*E.coli*) según United States Pharmacopeia (USP) para la evaluación de estos microorganismos ("microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms", 2016).

Se cultivaron en estufa a 35°C durante 24 horas los distintos lotes de "Z" en medio de cultivo Tryptic Soy Broth (TSB) Becton Dickinson - N° de cat. 257107, el cual favorece el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas (como *Salmonella* y *E.Coli*) y aerobias comunes.

Para *Salmonella*, se tomaron alícuotas de TSB cultivado recientemente y fueron llevadas a un tubo con medio de cultivo Caldo Rappaport Merck – N° cat, 107700.0500 el cual es un medio de enriquecimiento selectivo para *Salmonella*. Del mismo modo se llevó a estufa a 35°C durante 24 horas. Finalmente se utilizaron placas con Xlosa, Lisina y Desoxicolato (XLD) Becton Dickinson – N° de cat. PA-254055.06 para la diferenciación final del microorganismo.

Para la evaluación de *E.Coli*, se tomaron alícuotas de TSB cultivado recientemente y fueron llevadas a un tubo con Caldo MacConkey Merck – N° cat. 1.05396.0500, el cual es un medio de diferenciación selectivo para el aislamiento de enterobacterias como el *E.Coli*. Finalmente se utilizaron placas con agar MacConkey para diferenciación final del microorganismo.

Para el control positivo/negativo de *Salmonella* y *E.coli*, cada una de las especies fue estriada en placas Petri con agar XLD Becton Dickinson – N° de cat. PA-254055.06 y agar MacConkey Merck – N° cat. 1.05396.0500, respectivamente, las cuales fueron llevadas a estufa durante 48 horas a 35°C. También se realizaron blancos, para descartar la presencia de microorganismos en el medio de cultivo.

Finalmente, se evaluó la presencia de estos microorganismos nocivos para la salud humana en el biopesticida mediante comparación entre el cultivo de biopesticida y los controles.

5.9.3. Ensayo de temperatura

Según el fabricante, la temperatura de estabilidad para el almacenamiento del biopesticida es entre los 2° y 5° C. Para comprobar la estabilidad señalada, se realizaron ensayos de recuento de UFC exponiendo el biopesticida a temperaturas

fuera de su estabilidad. Para esto, una de las alícuotas tomadas desde el envase original fue llevada a 0°C. Una vez alcanzada la temperatura deseada se realizó el mismo procedimiento de dilución seriada explicado en el punto 5.8.3. y se incubaron las placas a 25°C en estufa durante 5 días para luego realizar el recuento de UFC.

Este procedimiento se realizó para las temperaturas 0°C, 4°C, 15°C y 30°C.

6. RESULTADOS

6.1. Verificación de la Inocuidad en cabina de seguridad citotóxica

La limpieza pre y post análisis se realizaron exitosamente y no se encontraron microorganismos presentes de ningún tipo en los medios de cultivos utilizados para la verificación de la inocuidad en la cabina de seguridad citotóxica los cuales se realizaron periódicamente a lo largo de todo el análisis.

6.2. Resultados fisicoquímicos

6.2.1. Resultados de pH

En la siguiente tabla 6, se muestran los resultados de pH que se obtuvieron en el análisis de los distintos lotes de "Z" por quintuplicado y los informados por el fabricante.

LOTE	PH					PROMEDIO PH	PH INFORMADO POR FABRICANTE
Z1	6.32	6.31	6.28	6.31	6.31	6.31	5.84
Z2	6.80	6.80	6.82	6.83	6.81	6.81	6
Z3	6.24	6.19	6.21	6.22	6.20	6.22	6.05
Z4	6.47	6.48	6.48	6.48	6.45	6.47	5.86
Z5	6.25	6.32	6.31	6.30	6.32	6.30	5.99

Tabla 6: pH de cada lote de "Z" y pH informado por el fabricante.

6.2.2. Densidad

En la tabla N°7, se informan los resultados de densidad que se obtuvieron en el análisis de los distintos lotes de “Z” y los informados por el fabricante.

LOTE	DENSIDAD (GRAMOS/ML)					PROMEDIO DENSIDAD	DENSIDAD INFORMADA POR FABRICANTE
Z1	0.9987	0.9986	0.9974	0.9978	0.9987	0.9982	0.99
Z2	0.9876	0.9879	0.9875	0.9878	0.9876	0.9877	0.98
Z3	0,9872	0,9848	0,9866	0,9868	0,9853	0,9861	0,98
Z4	0,9867	0,9873	0,9873	0,9870	0,9868	0,9870	0,99
Z5	0,9877	0,9857	0,9868	0,9867	0,9873	0,9868	0,98

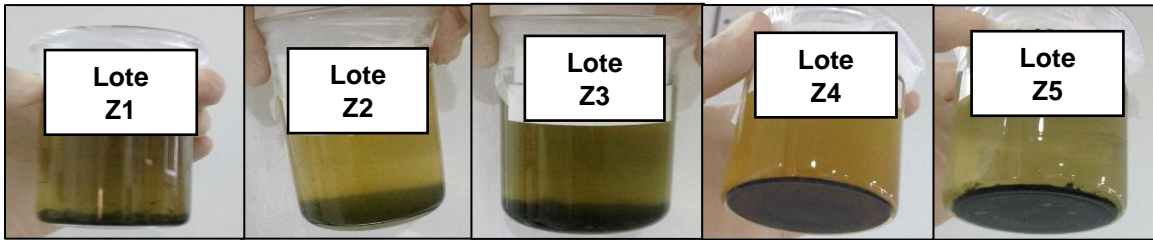
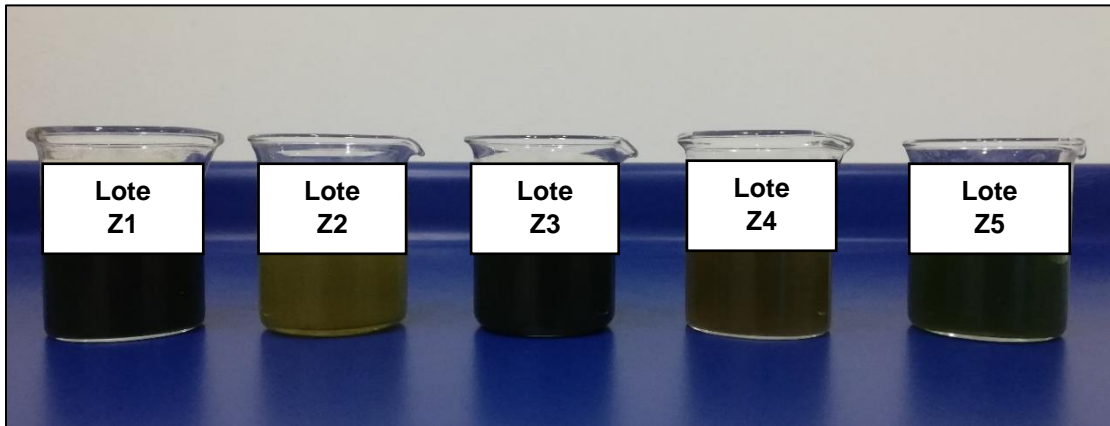
Tabla 7 Densidad de cada lote de “Z” y densidad informada por el fabricante.

6.2.3. Color, aspecto y sedimentación

En la tabla N°8, se especifica cada resultado obtenido mediante observación para el color (**imagen 3**), aspecto y presencia de sedimentación en reposo (**imagen 4**) de cada lote de “Z” analizado.

	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5
COLOR	Verde oscuro	Café verdoso	Verde oscuro	Café oscuro	Verde oscuro
ASPECTO	Suspensión líquida	Suspensión líquida	Suspensión líquida	Suspensión líquida	Suspensión líquida
SEDIMENTO	Presencia en reposo	Presencia en reposo	Presencia en reposo	Presencia en reposo	Presencia en reposo

Tabla 8: Color, aspecto y presencia de sedimento en reposo de cada lote de “Z”



6.3. Resultados Microbiológicos

6.3.1. Validación de la Metodología

En el ensayo 5.8.3., a medida que se diluyó la muestra, la densidad óptica disminuye, llegando a igualar al blanco (**figura 3**). Esta es la razón por la que se descartó relacionar la concentración (UFC/mL) y densidad óptica respectiva de cada tubo en la dilución seriada.

Para relacionar estas variables, se generó un nuevo gráfico (**figura 4**) cuyas variables son la densidad óptica del primer tubo (A1) y la cantidad de UFC/ml obtenidos en el último tubo (A9). Se consideró la información entregada en el envase de “Z”, la cual indica que cada biopesticida tiene a lo menos 1×10^8 UFC/mL, buscando intencionalmente aquella densidad óptica desde la cual se obtenga 1 UFC/ml en el último tubo luego de la dilución seriada.

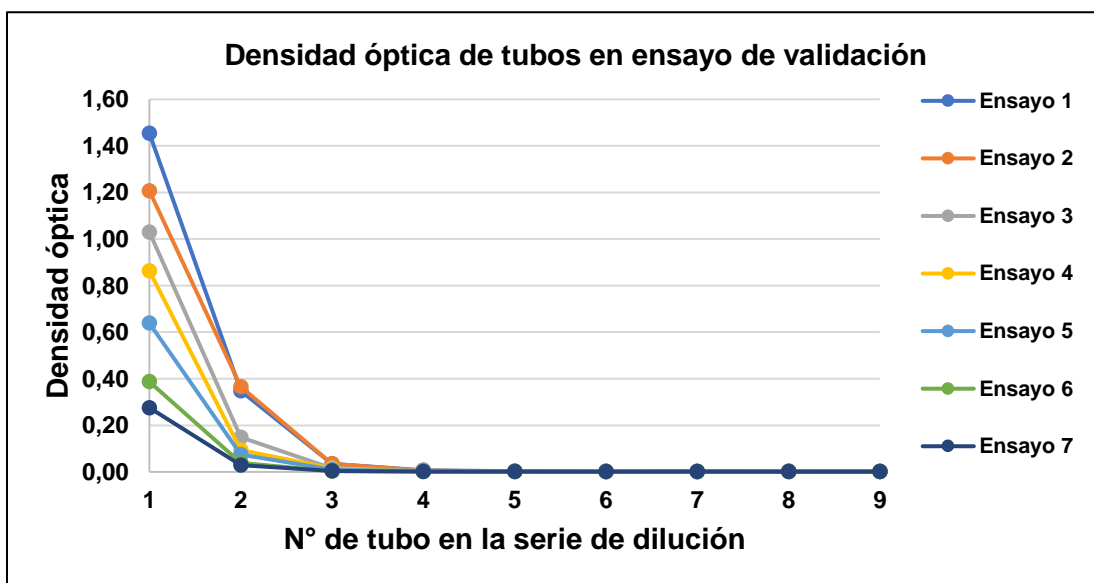


Figura 3: Densidad óptica obtenida en cada uno de los tubos utilizados en los ensayos de validación.

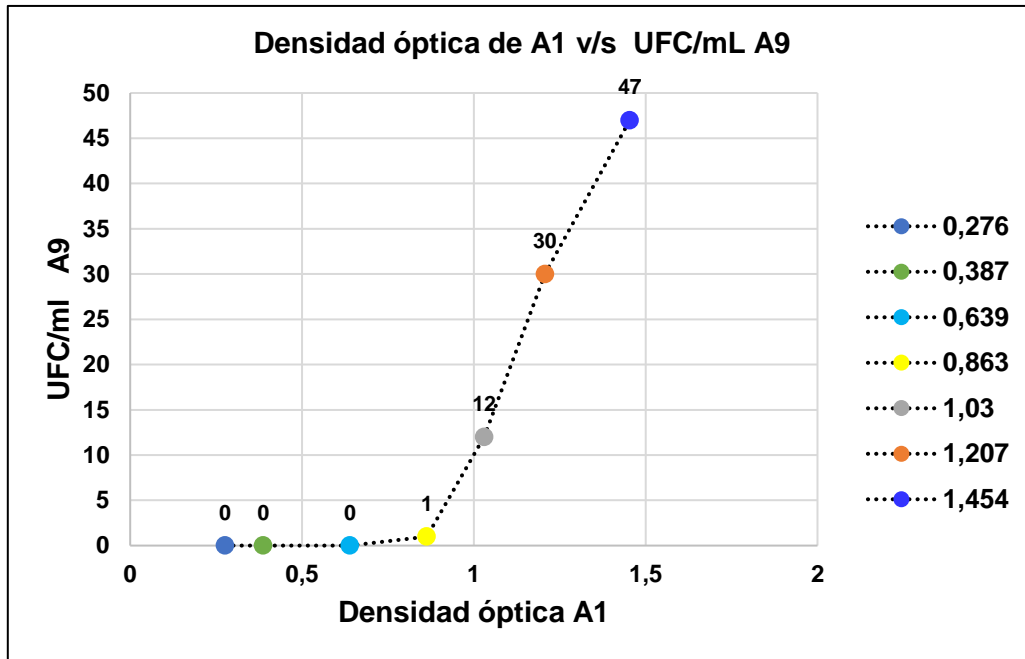


Figura 4: Relación entre densidad óptica de A1 con UFC/mL de A9.

Tal como se muestra en la figura 4, el punto N°4 (amarillo) es aquel en el que se obtuvo una concentración de 1 UFC/mL en su último tubo con una densidad óptica de 0,86.

A continuación, se muestran imágenes de las placas con las UFC encontradas en el ensayo N°3, en su tres últimos tubos de dilución (A9, A8 y A7). Además, se muestra el control negativo del ensayo (**imagen 5**).

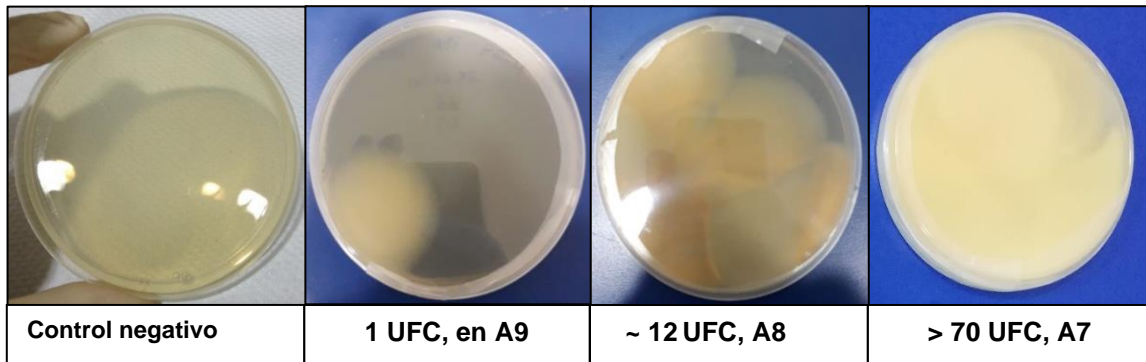


Imagen 5: Control negativo y UFC encontradas en A9, A8 y A7.

6.3.2. Recuento de unidades formadoras de colonia de la muestra

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en los distintos lotes de “Z” (**tabla 9**) para densidad óptica de C1 y C9 (promedios de sus 10 repeticiones), UFC encontradas en el último tubo (C-9) y desviación estándar (SD). Además, en la figura 5 se muestra el comportamiento de los datos a medida que transcurre la dilución en serie del lote “Z3” (el comportamiento fue similar para todos los lotes en análisis).

LOTE	N° TUBO	\bar{X} D. ÓPTICA	UFC/ML	SD
Z1	C1	0,597	-	0,0152
	C9	0,002	0	0,0031
Z2	C1	0.356	-	0.0121
	C9	0.003	0	0.0070
Z3	C1	0,879	>1000	0,0200
	C9	0,001	1	0,0065
Z4	C1	0,350	-	0,0167
	C9	0,002	(B + H)*	0,0048
Z5	C1	0,680	-	0,0115
	C9	0,001	0	0,0005

(B+H)*: Presencia de bacterias y *Trichoderma harzianum*

Tabla 9: Promedio de las densidades ópticas, UFC/mL encontradas y SD en C1 y C9 en los distintos lotes de “Z”

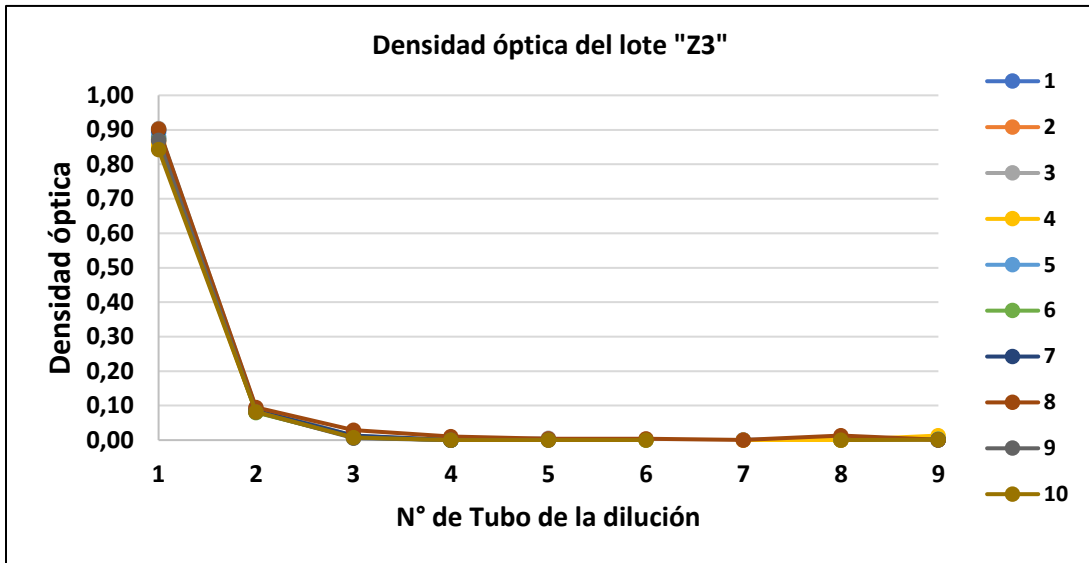


Figura 5: Densidad óptica del ensayo completo para el lote "Z3".

6.3.3. Resultados de observación de la morfología de la cepa en estudio

A continuación, se muestran las imágenes obtenidas a través de la observación en microscopio óptico con un aumento de 10/0.25 en cada uno de los lotes de "Z" en estudio.

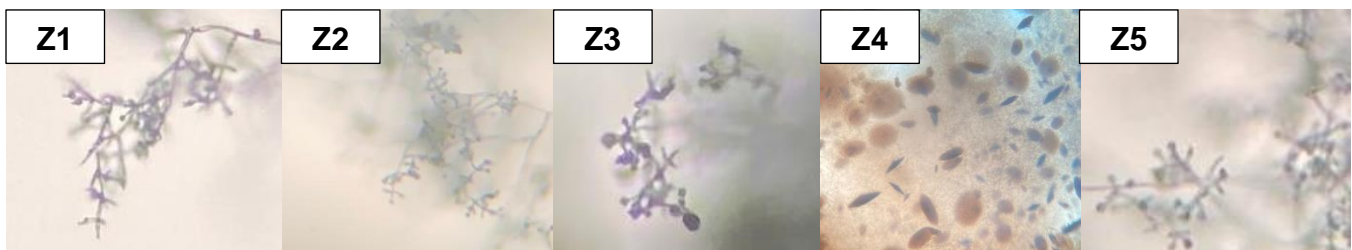


Imagen 6: Morfología observada en cada uno de los lotes de "Z" a través de microscopio óptico con aumento de 10x.

6.4. Resultados ensayos secundarios

6.4.1. Ensayo en medio de cultivo PDA

Los resultados obtenidos para el efecto de la utilización de ácido tartárico en el medio de cultivo se muestran en la imagen 7. En esta, se indica con el número 1 el cultivo donde se utilizó PDA con ácido tartárico y con el número 2 el cultivo desarrollado con PDA sin ácido tartárico.

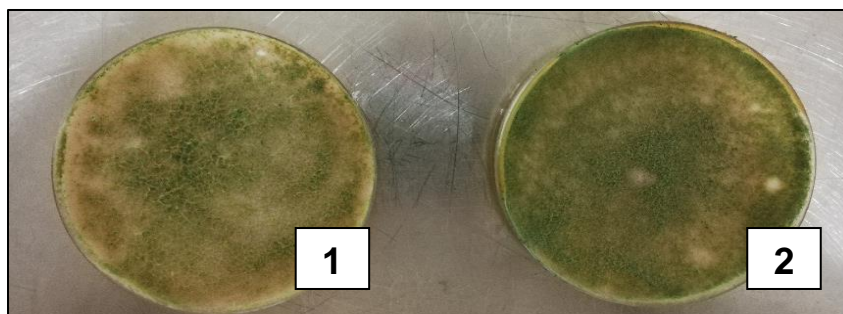


Imagen 7: *Trichoderma harzianum* cultivada en (1) PDA con ác. Tartárico al 10% y en (2) PDA sin ác. Tartárico al 10%.

6.4.2. Resultados de la presencia de microorganismos nocivos para la salud humana

En la tabla N° 10, se muestran los resultados obtenidos para cada uno de los lotes de “Z” analizados en busca de *Salmonella* y *E. Coli*, siendo un resultado positivo la presencia de esta y negativo la ausencia de este microorganismo.

LOTE	SALMONELLA	E. COLI
Z1	Negativo	Negativo
Z2	Negativo	Negativo
Z3	Negativo	Negativo
Z4	Negativo	Negativo
Z5	Negativo	Negativo

Tabla 10: Verificación de la Presencia de *Salmonella* y *E. Coli* en “Z”.

6.4.3. Resultados ensayo de temperatura

Al exponer los lotes de “Z” a las distintas temperaturas se obtuvieron aglomeraciones persistentes, tal como muestra la imagen 8.



Imagen 8: *Aglomeraciones de Trichoderma harzianum presentes en los lotes de “Z” luego de exponerlo a temperaturas fuera de su rango de estabilidad.*

7. DISCUSIÓN

Ya que Chile es uno de los principales exportadores de fruta fresca y es reconocido mundialmente por la calidad de sus productos, tiene la importante misión de mantener y mejorar sus estándares de calidad para seguir entregando conformemente cada producto exportado. En este sentido, la calidad del producto y los procesos que involucra debe ser integral, desde su siembra hasta que llega al consumidor final.

Por otra parte, el daño producido por los pesticidas de formulación tradicional ha sido muy extensa e impactante en todas sus áreas de utilización, generando a través de los años, acumulación de componentes dañinos en los suelos y el agua. En el lado opuesto están los biopesticidas, los cuales producen considerablemente menos daños ambientales, como la no acumulación de componentes dañinos para el ecosistema en suelo y aguas tal como lo describe P. Leng en el artículo titulado "*Applications and development trends in biopesticides*", por lo que ha tomado especial importancia en los últimos años, en países desarrollados como EE.UU, Francia y España según el artículo "*Proyecciones de crecimiento de la industria de los biopesticidas*" del año 2017.

Por todas estas razones, es que se hace necesario contar con altos estándares de calidad en los productos utilizados en el cuidado de los cultivos en la agricultura, de manera que los biopesticidas puedan incorporarse de manera gradual y llegar a posicionarse como líderes en el cuidado integral de los cultivos. Para esto, es necesario tener la seguridad de que se encuentran en condiciones

óptimas de uso para la finalidad que se requiere y que sea coincidente con lo indicado en el certificado de análisis del fabricante del producto.

Las empresas que están dispuestas a innovar en el desarrollo de biopesticidas, cuentan con su propio control de calidad (laboratorio interno) que certifica el contenido y los parámetros de calidad del producto (certificado de análisis). La deficiencia que presenta este modelo, es que los productos comercializados carecen de control por un agente distinto al fabricante (control externo) que compruebe la veracidad de los datos y que indique que el producto está siendo formulado bajo las condiciones necesarias para lograr su objetivo de prevenir y controlar plagas dañinas con una determinada cantidad de principio activo y que a su vez no contenga componentes dañinos para el ecosistema y la salud humana.

De esta manera, si observamos los resultados fisicoquímicos obtenidos para el pH en cada muestra, se demuestra son levemente distintos a los informados por el fabricante y no debería afectar ni alterar la efectividad del producto. Esta pequeña variación podría deberse al equipo de medición utilizado o a la posible variación en la temperatura ambiental y/o de la muestra, ya que un aumento en la temperatura podría catalizar reacciones enzimáticas del microorganismo, lo que explicaría la pequeña variación obtenida. De todos modos, la mayoría de las mediciones se encuentran dentro de los parámetros permitidos y óptimos de pH para el desarrollo del microorganismo presente en el biopesticida en estudio, tal como lo expresa J. Vásquez en el artículo "*Efecto del sustrato y exposición a la luz en la producción de una cepa de Trichoderma sp.*" del año 2010. En específico, el lote **Z2** se encuentra

fuera del rango óptimo informado, esta variación es muy baja y no es preocupante, pero podría afectar en la calidad final del producto.

La densidad obtenida es muy similar a lo que indica el fabricante, lo que confirmaría que la densidad del producto está dentro de los parámetros informados. Además, la composición del biopesticida es 99% agua, por lo que su densidad tiene que ser muy cercana a la del H₂O (1,0 g/mL), confirmando esa situación.

Para el color de cada uno de los lotes de “Z” se encontraron diferencias visibles importantes. Por ejemplo, en el lote **Z2** se visualizó un color café verdoso distinto al verde oscuro informado, que podría explicarse por la menor concentración de *Trichoderma Harzianum* encontrada en este lote. En el lote **Z4** se observó un color café oscuro, el cual no coincide con lo indicado por el fabricante, lo que podría estar relacionado con la presencia de microorganismos encontrados en el recuento de UFC. Por el contrario, los lotes **Z1, Z3 y Z5** coinciden con el color verde oscuro informado en certificado de análisis y coincidente con la coloración experimentada en estudios anteriores (Arenas, O., y col., 2009). El aspecto y sedimentación de todos los lotes de “Z” coinciden completamente con lo expuesto en el certificado de análisis (suspensión líquida y presencia de sedimentación en reposo).

Los resultados obtenidos en este trabajo, relacionan estrechamente el color visible de la muestra, la concentración, la eventual presencia de microorganismos contaminantes con la densidad óptica. No se encontraron registros de utilización de esta técnica de cuantificación para el hongo *Trichoderma*, pero si ha sido utilizado como técnica de cuantificación para hongos como *Cladophialophora carrionii* (Rojas, O., y col., 2004) y *Mycosphaerella fijiensis* (Cruz, M., y col., 2013)

donde en ambos casos se relacionó la densidad óptica con el crecimiento del microorganismo.

La activación y crecimiento de la cepa *Trichoderma harzianum* obtenida desde la CECT se realizó sin inconvenientes, obteniendo la morfología y crecimiento tipo que corresponde al crecimiento de conidios de forma piramidal, coincidente con lo descrito por Acurio V. en el artículo “Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp...”. En este sentido, es importante considerar el uso de estándares de calidad provenientes de entidades certificadas, para validar y garantizar resultados inequívocos con la muestra en evaluación (CECT., 2019).

Uno de los objetivos principales de la validación de la metodología (usando la cepa CECT), fue poder relacionar la concentración de la muestra con su densidad óptica. Esto no fue posible en principio, ya que, al ir avanzando en la serie de diluciones, las densidades ópticas de los tubos fueron disminuyendo a tal punto que se igualaron al blanco (**figura 3**). Esto se debe a que la intensidad de la coloración disminuye conforme la dilución, y con ello su densidad óptica. Para solucionarlo, se estableció una relación entre los datos obtenidos de densidad óptica de A1 y las UFC de A9, logrando obtener una curva de calibración simple (**figura 4**) que relaciona densidad óptica del cultivo CECT con las UFC/ml obtenidos en el cultivo.

Así, al realizar del mismo modo los ensayos para el biopesticida y relacionar las densidades ópticas de los tubos de la dilución en serie, con las UFC encontradas en cada uno de ellos, se observa que los distintos lotes de “Z” se comportan de manera similar al ensayo de validación (**figura 5**), por lo que se puede extrapolar sin problemas en la curva de calibración, obteniendo así la concentración que presenta el biopesticida en estudio.

En este sentido, el fabricante del producto en estudio, declara que cada lote de fabricación tiene **a lo menos** 10^8 UFC/ml. Los resultados obtenidos tienen diferencias notables y variadas a lo informado por el fabricante en 4 de los 5 lotes estudiados. En “**Z1**” La densidad óptica de C1 es de 0,597 y con 0 UFC/ml encontrados en C9, lo que indicaría que la concentración de la muestra está bajo la concentración mínima informada, ya que 0.86 de densidad óptica es el valor correspondiente a una concentración de 10^8 UFC/mL . En “**Z2**”, al igual que “**Z1**”, los datos obtenidos difieren a los del fabricante, siendo 0,356 su densidad óptica y 0 UFC/mL. En “**Z5**” la densidad óptica obtenida es de 0,680 y con 0 UFC/ml encontrados en C9, lo que indica que todos los lotes antes mencionados tienen una concentración inferior a la indicada como mínima en su etiqueta y certificado de análisis. Las causas posibles para estos resultados pueden ser múltiples, como, por ejemplo, la cantidad de microorganismo utilizado para su fabricación sea menor que el indicado. Otra causa puede ser que la cantidad de colonias activas, sean distintas a las expuestas como UFC presentes en cada lote. En “**Z3**” se obtuvo una densidad óptica de 0.879 en C1 con 1 UFC/mL indicando que cumple con la concentración mínima indicada, ya que el valor de su densidad óptica es similar a lo validado en el punto 6.3.1.

Para “**Z4**” la densidad óptica de C1 es de 0,350 y en el recuento de UFC además de encontrarse las colonias de *Trichoderma harzianum*, se encontraron colonias de un microorganismo **no identificado (ver imagen 6)** pero con un aspecto similar a las levaduras que se describen en estudios anteriores (Lara, C., y col., 2002). Esto quiere decir, que el lote “**Z4**” está contaminado. Las razones de esta contaminación pueden deberse a:

1. Contaminación de la muestra durante el estudio: Si bien existe la posibilidad de que la cabina de seguridad biológica haya estado contaminada, esta es muy baja, ya que se realizaron limpiezas y pruebas de inocuidad constantes tal como se describe el punto 5.6. para así evitar la contaminación con otros microorganismos utilizados en el laboratorio.
2. Mala manipulación de la muestra: Queda abierta la posibilidad de contaminación por un mal manejo de la muestra durante este estudio.
3. Contaminación de origen: Es posible que el lote “Z4” estuviese contaminado desde su origen con un microorganismo no identificado, ya sea por mal manejo al momento de envasado o por contaminación cruzada dentro de sus dependencias.

Mediante la observación simple en microscopio óptico de la morfología de los microorganismos encontrados en los distintos lotes de “Z”, se observaron características coincidentes con la morfología de *Trichoderma harzianum* informada por el fabricante. Además, dichas morfologías fueron comparadas con las descritas en el estudio de Acurio V. mencionado en párrafos anteriores. La excepción se evidenció en el lote “Z4”, donde que se obtuvieron 2 tipos de morfologías, una con las características de *Trichoderma harzianum* y otra de un microorganismo no identificado tal como se mostró en la imagen 6 del presente trabajo.

Por otro lado, PDA fue el medio utilizado para el crecimiento de *Trichoderma harzianum* tal como se describe en documentos de la CECT (Arenas, O., y col., 2009. A simple vista se evidencia que existe una diferencia en el volumen de crecimiento de las colonias donde se utilizó ácido tartárico (**imagen 7**), esto se debe

a que la adición de ácido a la muestra hizo que el PH disminuyera hasta aproximadamente pH 3, lo que deja fuera del rango de pH óptimo para el crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum*, ya que *Trichoderma* tiene un pH óptimo de crecimiento entre 4 y 9 (Vásquez, J., 2010).

La presencia de microorganismos nocivos para la salud humana dio como resultado negativo para *Salmonella* y *E.coli*, lo cual concuerda con lo requerido para que el biopesticida pueda ser comercializado en territorio nacional (SAG., 2022).

Los resultados en los ensayos de temperatura dan cuenta de la estabilidad del biopesticida a las distintas T° con las cuales se trabajó. En primer lugar, los resultados encontrados en las placas Petri para las temperaturas 0°C, 4°C, 15°C y 30°C, muestran bajas cantidades de *Trichoderma harzianum*, por lo que en primera instancia se sugiere que la baja cantidad de microorganismos encontrados fue producto de la temperatura. Este motivo, podría ponerse en duda, debido a que los lotes de fabricación evidenciaron menor cantidad de UFC/ml. En el mismo sentido, luego de llevar el biopesticida a 0°C y haber realizado el ensayo para el recuento de unidades formadoras de colonias, el frasco se dejó sobre el mesón de trabajo para ser eliminado dentro de las próximas horas. En este tiempo se formaron aglomeraciones verdosas las cuales persistieron después de ser agitado manual y mecánicamente. Esto se cree debe ser resultado de la T° a la cual fue expuesto el biopesticida (0°C). Se concluye que a una T° de 0°C (bajo el rango de estabilidad indicado por el fabricante) el biopesticida es inestable. Lo que no ocurre con las otras temperaturas de estudio.

Por otro lado, los ensayos realizados para comprobar la inocuidad de la cabina citotóxica dieron como resultado la ausencia de microorganismo dentro de esta.

8. CONCLUSIONES

- Se seleccionó un producto en base al hongo *Trichoderma*, en específico *Trichoderma Harzianum*, el cual tiene directa relación con el control de algunas enfermedades que afectan a los principales frutales de exportación en Chile.

- Se logró aplicar de forma externa, una metodología en serie de análisis químico y microbiológico con técnicas reconocidas a nivel científico internacional, para la realización del control de calidad del biopesticida seleccionado, evaluando los parámetros principales tales como pH, densidad, sedimentación, concentración, presencia de microorganismos nocivos y la verificación de la existencia de *Trichoderma harzianum* como único microorganismo presente en el biopesticida.

- Se logró verificar el contenido en cada lote del biopesticida seleccionado, en este sentido, se encontró la presencia de un microorganismo distinto a *Trichoderma harzianum* en uno de los lotes, evidenciando una probable contaminación en uno de los lotes del producto.

- Se logró comparar los resultados químicos y microbiológico con lo informado en el certificado de análisis otorgado por el fabricante del producto en estudio, en donde se encontró, concordancias y diferencias.

- Se verificó el cumplimiento de los aspectos relacionados con la cuantificación del principio activo, morfología, inocuidad del producto (presencia de microorganismos nocivos para la salud humana) y sus propiedades fisicoquímicas, expuestas en la legislación chilena vigente (BCN., 2022) para la comercialización de biopesticidas. Los resultados de estos ensayos, arrojaron que todos los lotes

estaban sin contaminación de agentes nocivos. Además, pareciera ser que 4 de los 5 lotes en estudio tuvieran una concentración más baja que la informada.

- Se logró utilizar las técnicas de análisis para el control de calidad de un biopesticida en base a Trichoderma, mediante el uso de técnicas químicas y microbiológicas.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, J. A. (2012). *Control de Calidad. Un enfoque integral y estadístico*. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Acurio Vásconez, R. D., y España Imbaquingo, C. K. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor de crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*lolium perenne*) y trébol blanco (*trifolium repens*). *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 25(1), 53-61.
- Arenas, O. R., Lara, M. H., Huato, M. A. D., Hernández, F. D., y Victoria, D. A. A. (2009). Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista colombiana de Biotecnología*, 11(2), 143-151
- BCN-Biblioteca del Congreso Nacional (2022). Ley Chile. [En línea] Disponible en: <<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1127023&idVersion=2022-03-04&idParte=>>
- BIOGRAM. Fungicida SC suspensión concentrada. (s.f.). [En línea] Disponible en: <<https://www.biogram.cl/wp-content/uploads/2021/08/Et-Harztop-1-L-26x15-Pantone.pdf>> [Consulta: 22 Marzo 2020].
- Butinof, M., Fernández, R. A., Lerda, D., Lantieri, M. J., Filippi, I., y Díaz, M. D. P. (2019). Biomonitorio en exposición a plaguicidas y su aporte en vigilancia epidemiológica en agroaplicadores en Córdoba, Argentina. *Gaceta Sanitaria*, 33, 216-221.
- Calderón Bolívar, J. C., y Pacheco León, K. A. (2021). Alternativas al uso de pesticidas en el sector agrícola de la provincia de Sumapaz (departamento de Cundinamarca), para mitigar la disminución de las poblaciones de abejas silvestres del género *Bombus*.
- Calva, L., y Torres, M. (1998). *Plaguicidas organoclorados* [E-book] (p. 35). [En línea] Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/Laura-Calva/publication/333732372_Plaguicidas_Organoclorados/links/5d0173eb4585157d15a69fbd/Plaguicidas-Organoclorados.pdf> [Consulta: 10 Marzo 2022].
- Camelo, A. F. L. Capítulo 5. Calidad en frutas y hortalizas (sin fecha). *Evaluación no destructiva de la calidad e implementación en la industria frutícola*, 60.
- Castillo, F., Castillo, D., Muñoz, H., y Rueda, A. (2018). uso de bio-pesticidas de origen vegetal en el manejo de enfermedades de cultivos en México. [En línea] Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/francisco-castillo-23/publication/335725157_use_of_bio-pesticides_from_vegetal_origin_in_crops_diseases_management_at_mexico/bigines/57d77c51_cultivos-enfermedades-manejo-en-mexico.pdf> [Consulta: 07 Agosto 2021].
- Cavieres, M. F. (2004). Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos: Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental. *Revista médica de Chile*, 132(7), 873-879.
- CECT. (2019). Instrucciones- apertura de un liófilo. [En línea] Disponible en: <https://www.uv.es/cect2/47_ITs_Apertura_liofilo> [Consulta: 10 Diciembre 2019].
- Chile Agrícola - Escuela de Capacitación. (sin fecha). [En línea] Disponible en: <<https://www.chileagricola.cl/category/cursos/control-de-plagas-y-enfermedades/?f3=Ficha>> [Consulta: 10 marzo 2022].

- Cristóbal Avivar Oyonarte, Ignacio Durán Salas, María Angustias Molina Arreb, José Antonio Castilla Alcalá, Nicolás Olea Serrano, Mariana Fernández Cabrera. (2009). La exposición a plaguicidas se asocia con la disminución del recuento espermático Pesticide exposure and decreased sperm count [E-book] (p. 1). Disponible en: <<https://doi.org/10.1016/j.labcli.2009.07.002>> [Consulta: el 20 de mayo de 2020].
- Cruz, M., 2004. Enfermedades de la vid en el secano interior de la VII y VIII Regiones de Chile : manejo Integrado. Bibliotecadigital.ciren.cl. [En línea] Disponible en: <<http://bibliotecadigital.ciren.cl/handle/123456789/32082>> [Consultado 03 de abril de 2020].
- Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Mena, E., Roque, B., Leiva-Mora, M., Pichardo, T., y Alvarado-Capó, Y. (2013). Cuantificación del crecimiento in vitro de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. *Biotecnología Vegetal*, 13(4).
- Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Mena, E., Roque, B., Leiva-Mora, M., Pichardo, T., y Alvarado-Capó, Y. (2013). Cuantificación del crecimiento in vitro de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. *Biotecnología Vegetal*, 13(4).
- Cubillos Rodríguez, M. C., y D. Roza Rodríguez (2009). El concepto de calidad: Historia, evolución e importancia para la competitividad. *Revista de la Universidad de La Salle*, (48), 80-99.
- De Marchese, A. M., y Filippone, M. P. (2018). Bioinsumos: componentes claves de una agricultura sostenible: Bio-products: key components of sustainable agriculture. *Revista Agronómica del Noroeste Argentino*, 38(1), 9-21.
- Del Puerto Rodríguez, A. M., Suárez Tamayo, S., y Palacio Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Revista Cubana de Higiene y epidemiología*, 52(3), 372-387
- Departamento de reglamentación de pesticidas de california. lo que debes saber de los pesticidas ¿qué es un pesticida. *departamento de reglamentación de pesticidas de california*. [En línea] Disponible en: <<https://www.cdpr.ca.gov/docs/dept/factshts/spanish/what-s.pdf>> [Consulta: 06 agosto 2021].
- Direcon. (2019). Comercio exterior de Chile- Anual 2018. [En línea] Disponible en: <https://www.subrei.gob.cl/docs/default-source/estudios-y-documentos/reporte-trimestral/reporte-anual-2018.pdf?sfvrsn=27ca0b13_0> [Consulta: 02 enero 2020].
Disponible en: <<https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=1127023&idVersion=2022-03-04&idParte=>> [Consultado el 12 de junio de 2022].
- Echeverría, G., Graell, J. O. R. D. I., López, L. U. I. S. A., y Lara, I. S. A. B. E. L. (2008). La calidad organoléptica de la fruta. *Horticultura internacional*, 61, 26-36.
- FAO (2022). Acerca del Codex. [En línea] Disponible en: <<https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/#c453333>> [Consulta: 16 mayo 2022].
- FAO. (2022). Capítulo 4. Aspectos higiénicos y sanitarios. [En línea] Disponible en: <<https://www.fao.org/3/y4893s/y4893s07.htm#TopOfPage>> [Consulta: 20 mayo 2022].
- FAO. Acerca de la FAO. (2022). [En línea] Disponible en: <<https://www.fao.org/about/en/>> [Consulta: 22 mayo 2022].

- FAO. Capítulo 1. Cosecha. (2022). [En línea] Disponible en: <<https://www.fao.org/3/y4893s/y4893s04.htm#TopOfPage>> [Consulta: 18 mayo 2022].
- FAO. *Convención Internacional de Protección Fitosanitaria*. (2012). [En línea] Disponible en: <<https://www.ippc.int/static/media/files/mediakit/IPPCGenericFlyer-es.pdf>> [Consulta: 23 mayo 2022].
- Fernández, C., y Juncosa, R. (2002). Biopesticidas: ¿ la agricultura del futuro. *Phytoma*, 141, 14-19.
- Gato Cárdenas, Yohana. (2010). conservation and formulation methods of *Trichoderma harzianum* Rifai. *fitosanidad*, 14(3), 189-195. [En línea] Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1562-30092010000300008&lng=es&tlng=en> [Consultado el 07 de agosto de 2021].
- Griful, E. (2005). *Gestión de la calidad* (Vol. 85). Univ. Politèc. de Catalunya.
- Guédez, C., Cañizalez, L., Castillo, C., y Olivar, R. (2012). Evaluación in vitro de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32(1), 44-49.
- Herrera, J. N. (2002). Introducción a la calidad. *Curso de calidad por internet-CCI*, 1.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21.
- Lans, e., Marrugo Negrete, j., y Díaz, B. (2008). estudio de la contaminación por pesticidas organoclorados en aguas de la ciénaga grande del valle bajo del río Sinú. *temas agrarios*, 13(1), 49-56.
- Lara, C., y Álvarez, G. C. (2002). Nuevo medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos ruminales. *Archivos de Zootecnia*, 51(195), 401-404.
- Latorre B., 2004. Enfermedades de las plantas cultivadas. [En línea] Disponible en: <https://books.google.cl/books?hl=es&lr=&id=u-tTDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA129&dq=Enfermedades+frutales+chile&ots=noBL_IIOVn&sig=HnPoODZPrNHk1YwTaBFLslki9Qw&redir_esc=y#v=onepage&q=Enfermedades%20frutales%20chile&f=false> [Consultado 02 de marzo de 2020].
- Latorre, B. (2001). Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación.
- Latorre, B., Lillo, C. y Rioja, M. (2001). Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de *Botrytis cinerea* de la vid en función de la época de aplicación. [E-book] Santiago, p.61. Disponible en: <<https://repositorio.uc.cl/xmlui/bitstream/handle/11534/8617/000356096.pdf>> [Consulta: 03 abril 2020].
- Leal Soto, S., Valenzuela Quintanar, A., Gutiérrez Coronado, M., Bermúdez Almada, M., García Hernández, J., y Aldana Madrid, M. (2014). Residuos de plaguicidas organoclorados en suelos agrícolas. [En línea] Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-57792014000100001&script=sci_arttext>
- Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., y Zhao, M. (2011). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*, 10(86), 19864-19873.

- María Estela Raffino. (2019). Control de Calidad: Concepto, Importancia y Métodos. [En línea] Disponible en: <https://concepto.de/control-de-calidad/#ixzz6CkloaW3K>. [Consultado 02 de abril de 2020].
- Martínez, B., Infante, D., y Reyes, Y. (2013). Trichoderma spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Martínez, C., y Gómez, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(4), 185-200.
- Martínez-Padrón, H. Y., Osorio-Hernández, E. O., Estrada-Drouaillet, B., López-Santillán, J. A., Varela-Fuentes, S. E., Torres-Castillo, J. A., ... & Victoria, T. (2017). CONTROL BIOLÓGICO DE FITOPATÓGENOS MEDIANTE AISLADOS DE Trichoderma spp. *AGRO*.
- Microbiological examination of nonsterile products: tests for specified microorganisms. (2016). [En línea] Disponible en: https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/harmonization/gen-method/q05a_pf_ira_34_6_2008.pdf [Consultado el 12 de agosto de 2021].
- Momba, M. N., Malakate, V. K., & Theron, J. (2006). Abundance of pathogenic Escherichia coli, Salmonella typhimurium and Vibrio cholerae in Nkonkobe drinking water sources. *Journal of water and health*, 4(3), 289-296.
- Monzón, A. (2002). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua.
- Muñoz Quezada, M. T. (2011). Aspectos bioéticos en el control y aplicación de plaguicidas en Chile. *Acta bioethica*, 17(1), 95-104.
- Nacional, B. (2021). Núm. 9.074 exenta. establece condiciones y requisitos para autorizar plaguicidas microbianos para comercialización. Disponible en: <http://bcn.cl/2i51z> [Consultado 07 de agosto del 2021].
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., y Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17-29.
- OEC. (2019). Chile (CHL) Exports, Imports, and Trade Partners. [En línea] Disponible en: <https://oec.world/es/profile/country/chl/> [Consulta: 29 enero 2020].
- OEC. (sin fecha). Chile (CHL) Exportaciones, Importaciones, y Socios comerciales. [En línea] Disponible en: <https://oec.world/es/profile/country/chl/> [Consultado 29 de enero de 2020].
- Olea, N., y Fernández, M. (2001). Plaguicidas persistentes. In *Congreso Implementación del Convenio de Contaminantes Orgánicos Persistentes. Madrid* (pp. 26-27).
- OMS (sin fecha). Clasificación recomendada por la OMS de los plaguicidas por el peligro que presentan y directrices para la clasificación de 2019. [E-book] (p. 6). Disponible en: <http://file:///C:/Users/campo/Downloads/9789240016057-spa.pdf> [Consulta: 04 abril 2022].
- Orta, L. (2002). Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fito sanidad*, 6(3), 55-62.

- Pandiselvam, R., Kaavya, R., Jayanath, Y., Veenuttranon, K., Lueprasitsakul, P., Divya, V., y Ramesh, S. V. (2020). Ozone as a novel emerging technology for the dissipation of pesticide residues in foods—a review. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 38-54.
- Parra, L., Mutis, A., Aguilera, A., Rebolledo, R., y Quiroz, A. (2009). Estado del conocimiento sobre el cabrito del frambueso (CF), *Aegorhinus superciliosus* (Guérin)(Coleoptera: Curculionidae). *Idesia (Arica)*, 27(1), 57-65.
- Parra, M., Durango, J., y Máttar, S. (2002). Microbiología, patogénesis, epidemiología, clínica y diagnóstico de las infecciones producidas por Salmonella. *Revista MVZ Córdoba*, 7(2), 187-200.
- Piedrabuena, S. B. (2018). *Electro-biorremediación de suelos contaminados con plaguicidas* (Doctoral dissertation, Universidad de Castilla-La Mancha).
- Portalfruticola.com. 2021. *chile: analizan normativas de bioplaguicidas para regular estándar y calidad - portalfruticola.com*. [En línea] Disponible en: <<https://www.portalfruticola.com/noticias/2021/03/16/chile-analizan-normativas-de-bioplaguicidas-para-regular-estandar-y-calidad/>> [Consulta: 07 agosto 2021].
- Prochile. (2019). Sectores productivos. Gobierno de Chile. [En línea] Disponible en: <<https://www.prochile.gob.cl/landing/sectoresproductivos/>> [Consulta: 15 enero 2020].
- Prochile. (2019). Sectores productivos. Gobierno de Chile. [En línea] Disponible en: <<https://www.prochile.gob.cl/landing/sectoresproductivos/>> [Consulta: 15 enero 2020].
- Ramírez, J. A., y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, 4(2), 67-75.
- Real Academia Española. (sin fecha). Calidad. En *Diccionario de la lengua española*. [En línea] Disponible en: <<https://dle.rae.es/calidad>> [Consulta: 18 mayo 2022].
- Red agrícola. (2017). Proyecciones de crecimiento de la industria de los biopesticidas. (En línea) Disponible en: <<https://www.redagricola.com/cl/proyecciones-crecimiento-la-industria-los-biopesticidas/>> [Consultado el 10 de agosto de 2021].
- Red Agrícola. (2022). Proyecciones de crecimiento de la industria de los biopesticidas. (Online) Disponible en: <<https://www.redagricola.com/cl/proyecciones-crecimiento-la-industria-los-biopesticidas/>> [Consultado el 10 de agosto de 2021].
- Rojas García, O. C., Vivas Alcalá, J. J., y Guerrero Onofretti, A. J. (2004). Estandarización del inóculo de *Cladophialophora carrionii* por el método espectrofotométrico para estudios de sensibilidad in vitro de hongos filamentosos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 89-94.
- Rojas García, O. C., Vivas Alcalá, J. J., y Guerrero Onofretti, A. J. (2004). Estandarización del inóculo de *Cladophialophora carrionii* por el método espectrofotométrico para estudios de sensibilidad in vitro de hongos filamentosos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1-2), 89-94.
- SAG (2020). DECLARACIÓN DE VENTAS DE PLAGUICIDAS DE USO AGRÍCOLA AÑO 2019. [En línea] Disponible en: <https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/declaracion_de_ventas_de_plaguicidas_ano_2019_0.pdf> [Consulta: 08 marzo 2022].

- SAG. (sin fecha). Declaraciones. [En línea] Disponible en: <<https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/declaraciones/1380/publicaciones>> [Consulta: 04 abril 2022].
- Sandoval, T. J. R. (2021). FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL.
- Seguí, E. M. (2013). Los bioplaguicidas: expectativas y nuevos retos. *Phytoma España: La revista profesional de sanidad vegetal*, (245), 14.
- Subrei. (2021). Liderazgo exportador en Chile 2020. [En línea] Disponible en: <https://www.subrei.gob.cl/docs/default-source/estudios-y-documentos/otros-documentos/liderazgo-exportador-2020.pdf?sfvrsn=db2121e4_1> [Consulta: 06 febrero 2021].
- Thompson, L. M., y Troeh, F. R. (2012). *Los suelos y su fertilidad*. Reverté.
- Tommasino, H., Foladori, G., y Taks, J. (2005). La crisis ambiental contemporánea. *Sustentabilidad*, 9-26
- Universitat do Valencia (2021). Lista de hongos. (En línea) Disponible en: <https://www.uv.es/uvweb/coleccion-espanola-cultivos-tipo/es/cect/catalogo-cepas/medios-cultivo/lista-hongos/t-1285892323955.html> [Consultado el 24 de junio de 2021].
- Valderrama, J. F. N., Baena, J. A. P., y Pérez, F. J. M. (2012). Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad: Una revisión de los procesos de degradación natural. *Gestión y ambiente*, 15(3), 27-38
- Vallés, G., y Rodríguez, A. (2022). *Cabina de flujo laminar* [E-book] (pp. 1-3). PDF. Retrieved from [https://www.idipaz.es/ficheros/files/Que%20es/2015/CABINA%20FLUJO%20LAMINAR\(1\).pdf](https://www.idipaz.es/ficheros/files/Que%20es/2015/CABINA%20FLUJO%20LAMINAR(1).pdf)
- Vargas, M. (1998). Racionalización del uso de pesticidas en Chile. *Dialogo-IICA/Procisur (Uruguay)*.
- Vásquez Cárdenas, J. A. (2010). Caracterización microbiológica y producción de *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* en cultivo artesanal.
- Zúñiga, L., Saracini, C., Pancetti, F., Muñoz, M., Lucero, B., Foerster, C., y Cortés, S. (2022). Exposición a plaguicidas en Chile y salud poblacional: urgencia para la toma de decisiones. [En línea] Disponible en: <<https://www.scielosp.org/pdf/gs/2021.v35n5/480-487/es>> [Consulta: 10 junio 2022].

10.ANEXOS

10.1. Anexo 1: Pesticidas y biopesticidas manufacturados y comercializados en Chile

Total de Empresas			
N°	Empresa	Categoría	N° de Productos
1	Bioinsumos Nativa	Biopesticida	5
2	Agrotrust	Biopesticida	2
3	Biogram	Biopesticida	1
4	Ferpac	Biopesticida	3
5	Chemie	Biopesticida	1
6	Nutraterra	Biopesticida	4
7	Biocrop	Biopesticida	9
1	Anasac	Pesticida	1
2	Sygenta	Pesticida	79
3	Basf	Pesticida	34
4	Bayer	Pesticida	5
5	Anagra	Pesticida	5
6	Bioamerica	Pesticida	1
7	G.M.T	Pesticida	91
8	M&V	Pesticida	15
Total Productos			256
Empresas			
	Categoría	Cantidad	Porcentaje (%)
	Pesticidas	8	53%
	Biopesticidas	7	47%
Productos			
	Categoría	Cantidad	Porcentaje (%)
	Pesticidas	231	90%
	Biopesticidas	25	10%

10.2. ANEXO 2: Biopesticidas en el mercado chileno

Sub-categorías de Biopesticidas		
Biopesticidas	Cantidad	
Fungicidas	6	6 hongo
Bactericidas	4	4 bacteria
Herbicida	0	-
Nematicida	2	1 bacteria, 1 hongo
Insecticida	6	3 bacterias, 3 hongo
Fungicida-Bactericida	2	1 bacteria, 1 extracto citrico
Acaricida	2	2 hongos
biocontrolador	2	2 hongos
Insecticida- Acaricida	1	1 aceite de linaza
Total	25	
Subcategorías		
Categoría	Cantidad	Porcentaje
hongo	14	56%
bacteria	9	36%
natural	2	8%