



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA,
BIOTECNOLOGÍA Y MATERIALES

ESTUDIO PARA EL DESARROLLO DE ENVOLTURAS DE ENCAPSULAMIENTO
QUE PERMITAN UNA LIBERACIÓN CONTROLADA DE ESPORAS DE HONGOS
BAJO CONDICIONES DE MICROGRAVEDAD

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
INGENIERA CIVIL QUÍMICA

SARA FERNANDA MALLEA CASTILLO

PROFESORA GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
FRANCK QUERO
STEPHANIE BRAIN ISASI
MARCOS DÍAZ QUEZADA

SANTIAGO DE CHILE
2022

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR
AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL QUÍMICA
POR: SARA MALLEA CASTILLO
FECHA: 2022
PROF. GUÍA: MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

ESTUDIO PARA EL DESARROLLO DE ENVOLTURAS DE ENCAPSULAMIENTO QUE PERMITAN UNA LIBERACIÓN CONTROLADA DE ESPORAS DE HONGOS BAJO CONDICIONES DE MICROGRAVEDAD

En el Laboratorio de Exploración Espacial y Planetaria, de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile, se tiene el interés de realizar investigaciones biológicas espaciales mediante misiones en Cubesat. Considerando la alta supervivencia de los hongos en condiciones extremas, en particular de sus esporas, sumado a las ventajas a la supervivencia humana que proporciona *Trichoderma reesei*, es de interés estudiar la tolerancia de este microorganismo a condiciones de microgravedad dentro de un microsatélite, con la precaución de no contaminar otros experimentos que se desarrollen a bordo.

El objetivo de este trabajo fue estudiar y diseñar una metodología para desarrollar microcápsulas que permitan una liberación controlada de esporas de *T. reesei* bajo condiciones de microgravedad.

La metodología se basó en la compilación de información atinente a *T. reesei*, a polímeros que puedan ser utilizados para encapsular la spora del hongo y a los métodos de encapsulación existentes. Por otro lado, se gestionaron y coordinaron entrevistas con expertos relacionados a encapsulación y microgravedad, lo que permitió acotar la búsqueda a técnicas viables en el microorganismo de interés. Con esto, se procedió a determinar los costos de reactivos necesarios para implementar cada una de las técnicas de encapsulado.

Se evaluaron cuatro alternativas de encapsulación, gelificación iónica, montaje capa por capa (LbL), electrohilado y secado por aspersion, escalando las técnicas para que utilicen el mismo número de esporas. Se determinó que la gelificación iónica con alginato de calcio es sencilla y de bajo costo (\$184 por $2,39 \cdot 10^8$ esporas), además, puede permitir la germinación y el desarrollo del organismo dentro de las perlas, al estar inmersas en un medio de cultivo líquido. El montaje LbL, con lignina catiónica y lignosulfonato, es una técnica más costosa (\$14.833 por $2,39 \cdot 10^8$ esporas) y compleja de implementar, además, requiere la presencia de enzimas específicas que destruyan la cápsula.

El electrohilado, el cual genera fibras de quitosano que contienen las esporas, es una metodología relativamente económica (\$3.589 por $2,39 \cdot 10^8$ esporas) y de fácil acceso, la cual permite que la cápsula se desintegre al entrar en contacto con un medio de cultivo sólido apropiado. Por otro lado, el secado por aspersion, donde se obtienen cápsulas compuestas de dextrina, hidroxipropilmetilcelulosa, leche descremada y quitosano, es la técnica más costosa (\$17.838 por $2,39 \cdot 10^8$ esporas); sin embargo, permite que la cápsula se desintegre al entrar en contacto con un medio con alto contenido de agua.

El estudio permitió comparar diversas técnicas de encapsulación, adaptando las metodologías, para que sean aplicables al microorganismo objetivo. Se concluye que la gelificación iónica es la técnica más apropiada de encapsulación, considerando costos de reactivos y accesibilidad para ser desarrollada. Adicionalmente, la gelificación iónica puede entregar la ventaja de estudiar la germinación y el crecimiento de las esporas dentro de las mismas cápsulas, por lo que no se correría riesgo de contaminación en el satélite.

A cada persona que estuvo conmigo en este camino

Agradecimientos

Primero, quiero agradecer a la profesora María Elena Lienqueo y a Stephanie Brain, por darme la oportunidad de realizar este trabajo que me permitió ver cómo dos áreas que amo pueden colaborar entre sí y generar innovación espacial. Gracias a ambas por su ayuda a lo largo de todo este proceso, por su disposición y consejos para conseguir los mejores resultados.

También, quiero agradecer al ente intangible que es la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, porque, a pesar de llevar años cargándome de estrés, me dio la posibilidad de explorar otras áreas. Gracias a esa oportunidad pude acercarme a la astronomía y enamorarme profundamente de las maravillas que guarda el espacio.

En este punto y pensando en cómo escribir una parte tan emotiva como esta, decidí ir recordando cronológicamente a las personas más significativas en mis años de estudio y en mi vida en general. De más está decir, que a pesar de que no mencione a todos los que han pasado por mi vida aquí, me gustaría agradecer a toda y cada una de las personas que creyeron en mis capacidades y que vieron en mí un potencial que por muchos años desconocí.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis abuelos, Braulio y Pilar, por estar conmigo, desde antes que mi memoria pueda recordarlo, por su amor y enseñanzas, por nunca dejarme sola, por cada viaje realizado y por cada recuerdo que llevo en mi interior, gracias por demostrarme siempre que están orgullosos de la persona que soy.

Quiero también agradecerle a mi mamá, Fabiola Castillo, por siempre estar conmigo, acompañándome y cuidándome, por nunca dejar de pensar en lo mejor para mi y mis hermanos, por ser una mujer tan valiente y fuerte. Gracias por instarme a seguir adelante en mis estudios.

Avanzando un poco en mi vida, quiero agradecer a Ana María Rojas, quien fue mi profesora de matemáticas en mis últimos cursos de educación básica en el Colegio República de Guatemala. Quizá no lo sepa y quizá nunca se lo pueda decir, pero al final me gustaron las matemáticas por usted, por su dedicación y entrega, gracias por creer en mí y por ver que yo sí tenía habilidad para los números (incluso antes que yo misma), no estaría aquí hoy si usted no hubiese sido mi profesora.

En esta misma línea, quiero agradecer a María Loreto Mejías, quien fue mi profesora de química en mi amado Liceo 7 de Providencia. Gracias por enseñar de forma tan cariñosa y alegre, con todo su carisma y amabilidad consiguió que me encantara la química, al final escogí esta ingeniería por el amor a esta ciencia que sembró en mí.

Quiero agradecer al primer amigo que hice en la universidad, Julián Contreras, gracias por acogerme en momentos donde mi ansiedad social era máxima y por siempre hacerme reír, los viajes en micro siempre fueron más entretenidos cuando ibas conmigo.

Tengo que hacer una mención honrosa a un grande, José Ortiz. Gracias por ayudarme y enseñarme una y mil veces, el paso por plan común fue mucho más ameno junto a ti, gracias por todas esas horas jugando en la biblioteca y por tener siempre tan buena voluntad conmigo.

No puedo dejar de mencionar a mi grupo eterno, a los que para mí son los hombres más simpáticos e inteligentes que tiene el departamento de química jajaja no puedo más que agradecer a Felipe Sánchez, Alexis Pino y Javier Marqués. Estos años juntos han estado cargados de aprendizajes y de risas, desde ese mensaje en el foro de análisis que me han ido abriendo las alas, creo que nunca habría salido a la luz mi verdadero yo si no los hubiese conocido a ustedes. Gracias por cada momento que hemos compartido, por cada vez que me levantaban la manito para que los pudiera identificar en una sala (porque estoy ciega), por cada almuerzo y cada salida. Gracias Pipe Sánchez por ayudarme a entender mejor los ramos, gracias por todas esas veces que te quedaste explicándome, sobre todo cuando tuve que estudiar para sólidos, gracias por tu infinita solidaridad y por tu inmensa disposición, en el mundo faltan más personas como tú. Gracias Pipe Pino, por esas conversaciones tan variadas e inteligentes, por ser tan buen amigo y por la confianza que me tienes, ojalá podamos degustar infinitos pastelitos y dulces chinos juntos, aún queda una lista enorme. Gracias Jota, por ayudarme a ser más sociable y por siempre ser un buen confidente, somos tan parecidos que casi siempre terminábamos haciendo las tareas juntos y sufriendo el estrés de ir atrasados, todo por ser los que dejaban las cosas para el final, gracias por siempre acompañarme a donde se me ocurría. Gracias a los tres, han sido luz para mi corazón.

Sara Fernanda Mallea Castillo

Tabla de Contenido

1. Introducción	1
1.1. Objetivos del trabajo	4
1.1.1. Objetivo general	4
1.1.2. Objetivos específicos	5
2. Antecedentes	6
2.1. <i>Trichoderma reesei</i>	6
2.1.1. Proliferación	6
2.1.2. Fuentes de carbono	8
2.2. Condiciones favorables para la conidiación del organismo	9
2.2.1. Exposición lumínica	9
2.2.2. Estado de carbono y nitrógeno	10
2.2.3. pH ambiente	10
2.2.4. Señalización de calcio	11
2.2.5. Compuestos orgánicos volátiles (COV)	11
2.3. Microgravedad	11
2.3.1. Física	11
2.3.2. Implicancias generales en la vida	13
2.3.3. Viabilidad fúngica en el espacio	14
3. Métodos de encapsulación	17
3.1. Encapsulación fisicoquímica	17

3.1.1.	Coacervación	17
3.1.2.	Inclusión molecular	18
3.2.	Encapsulación química	19
3.2.1.	Polimerización interfacial	19
3.3.	Encapsulación mecánica	19
3.3.1.	Gelificación iónica	19
3.3.2.	Co-cristalización	20
3.3.3.	Atrapamiento en liposomas	21
3.3.4.	Secado por aspersión	22
3.3.5.	Enfriamiento por aspersión	23
3.3.6.	Montaje capa por capa (LbL)	23
3.3.7.	Extrusión	24
3.3.8.	Electrohilado	25
4.	Metodología de trabajo	27
5.	Evaluación de factibilidad	30
5.1.	Gelificación iónica	30
5.1.1.	<i>Trichoderma asperellum</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	30
5.1.2.	Componentes de la cápsula	32
5.2.	Montaje capa por capa (LbL)	32
5.3.	Secado por aspersión	33
5.3.1.	<i>Beauveria bassiana</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	33
5.3.2.	Componentes de la cápsula	34
5.4.	Electrohilado	35
5.4.1.	<i>Trichoderma viride</i> y <i>Trichoderma reesei</i>	35
5.4.2.	Componentes de la cápsula	36
6.	Metodologías de encapsulación propuestas	37

6.1.	Crecimiento de <i>T. reesei</i> y recolección de esporas	37
6.2.	Propuesta de encapsulación vía gelificación iónica	37
6.2.1.	Materiales	37
6.2.2.	Instrumentos	38
6.2.3.	Encapsulación de esporas por gelificación iónica	38
6.3.	Propuesta de encapsulación vía montaje LbL	39
6.3.1.	Materiales	39
6.3.2.	Instrumentos y técnicas de caracterización	39
6.3.3.	Síntesis de lignina catiónica Kraft	39
6.3.4.	Encapsulación LbL de esporas de <i>T. reesei</i>	40
6.4.	Propuesta de encapsulación vía secado por aspersión	40
6.4.1.	Materiales	40
6.4.2.	Instrumentos y técnicas de caracterización	41
6.4.3.	Preparación de cápsulas mediante secado por aspersión	41
6.5.	Propuesta de encapsulación vía electrohilado	41
6.5.1.	Materiales	41
6.5.2.	Instrumentos y técnicas de caracterización	42
6.5.3.	Preparación de poliacrilamida	42
6.6.	Encapsulación de esporas	42
7.	Comparación de costos	44
7.1.	Gelificación iónica	44
7.2.	Montaje LbL	44
7.3.	Secado por aspersión	45
7.4.	Electrohilado	45
7.5.	Comparación de las metodologías	46
8.	Evaluación de viabilidad	48

8.1. Estudio de crecimiento	48
8.1.1. Liberación de esporas	48
8.1.2. Preparación del medio de cultivo	49
8.1.3. Porcentaje de germinación	49
8.1.4. Propuestas de estudio	50
8.2. Desarrollo bajo microgravedad	50
8.3. Montaje experimental	52
9. Conclusión	53
Bibliografía	56
Anexos	71
A. Cálculos para la demostración de la microgravedad	71
A.1. Fuerza de gravedad	71
A.2. Velocidad tangencial	71
B. Fuentes de carbono	73
B.1. Fuentes de carbono solubles	73
B.2. Fuentes de carbono polisacáridos puros e insolubles	74
B.3. Fuentes de carbono lignocelulosas e insolubles	75
C. Diámetro promedio de esporas	76
C.1. <i>Trichoderma reesei</i>	76
C.2. <i>Trichoderma asperellum</i>	79
D. Determinación de costos	81
D.1. Gelificación iónica	81
D.2. Montaje LbL	86
D.3. Secado por aspersión	94

D.4. Electrohilado	98
E. Escalamiento y costos proyectados	105
E.1. Estimación de materiales	105
E.1.1. Gelificación iónica	105
E.1.2. Montaje LbL	105
E.1.3. Secado por aspersión	106
E.1.4. Electrohilado	106
E.2. Escalamiento	107
F. Aproximación de tiempos de implementación	108
F.1. Gelificación iónica	108
F.2. Montaje LbL	109
F.3. Secado por aspersión	110
F.4. Electrohilado	111

Índice de Tablas

4.1. Científicos expertos entrevistados, institución donde desarrollan funciones y sus respectivas áreas de conocimiento.	28
7.1. Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología de gelificación iónica y los costos asociados.	44
7.2. Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología LbL y los costos asociados.	45
7.3. Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología de secado por aspersión y los costos asociados.	45
7.4. Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología de electrohilado y los costos asociados.	46
7.5. Tabla comparativa de las metodologías propuestas.	47
C.1. Datos obtenidos relativos a <i>T. reesei</i>	77
C.2. Datos obtenidos relativos a <i>T. asperellum</i>	80
E.1. Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología de gelificación iónica y los costos asociados.	105
E.2. Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología LbL y los costos asociados.	106
E.3. Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología de secado por aspersión y los costos asociados.	106
E.4. Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología de electrohilado y los costos asociados.	107

Índice de Ilustraciones

1.1. Representación del satélite PLANTSAT y los experimentos que transportará (adaptación) [9].	3
1.2. Esquema del proceso de digestión de celulosa por parte de <i>T. reesei</i> . La línea discontinua refleja el límite de los balances de masa (adaptación de Antonov et al., 2016) [13].	4
2.1. Crecimiento de <i>T. reesei</i>	7
2.2. Microorganismo de interés.	7
2.3. Forma modelada de una espora de la cepa QM9414 de <i>T. reesei</i> [33].	8
3.1. Diagrama genérico ilustrativo de encapsulación por coacervación compleja (adaptación de Timilsena et al., 2019) [68].	18
3.2. Ilustración esquemática de la encapsulación con ciclodextrinas por inclusión molecular [69].	18
3.3. Diagrama genérico ilustrativo del método de encapsulación por polimerización interfacial (adaptación de Jamekhorshid et al., 2014) [70].	19
3.4. Diagrama genérico de encapsulación por gelificación iónica externa (adaptación de Norambuena-Contreras et al., 2019) [74].	20
3.5. Diagrama genérico de encapsulación por co-cristalización (adaptación de Kaur et al., 2021) [79, 82].	21
3.6. Representación de una estructura de encapsulación en base a una bicapa de liposomas hidratadas (adaptación de Schoebitz et al., 2013) [71].	21
3.7. Diagrama de encapsulación vía secado por aspersion (adaptación de Mohammed et al., 2020) [83].	22
3.8. Diagrama genérico de encapsulación vía secado por congelación (adaptación de Favaro-Trindade et al., 2021) [89].	23

3.9. Representación esquemática del proceso de encapsulación por montaje capa por capa de un ingrediente activo con superficie cargada negativamente (adaptación de Pawlak & Belbekhouche, 2021) [92].	24
3.10. Representación del proceso de encapsulación por extrusión (adaptación de Martin et al.,2017) [94].	25
3.11. Diagrama del proceso de encapsulación por electrohilado (adaptación de Rodríguez-Tobías et al., 2019) [96].	25
4.1. Diagrama de flujo de la metodología seguida en el presente trabajo.	29
5.1. Fotografía de cultivos en placas de Petri de los organismos <i>T. reesei</i> y <i>T. asperellum</i> (adaptación de Wang et al., 2015) [102].	31
5.2. Microscopía óptica de esporas, obtenidas al cultivar el microorganismo en medio agar papa dextrosa por 14 días a 25 °C [31].	31
5.3. Vista comparativa del tamaño de spora.	33
5.4. Esporas de las especies de interés.	36
6.1. Equipo de electrohilado, Electroris de Fanavaran Nano-Meghyas [132].	43
8.1. Cámara de termovació modelo NDT-4000, marca Nano-Master [143].	51
B.1. Efecto de las diferentes fuentes de carbono soluble sobre la tasa de crecimiento y la actividad de celulasa total de la cepa QM6a de <i>T. reesei</i> [35].	73
B.2. Comparación del crecimiento de la cepa QM6a de <i>T. reesei</i> en las diferentes fuentes de carbono soluble después de 4 días (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].	74
B.3. Efecto de las diferentes fuentes de carbono de polisacáridos puros insolubles sobre la tasa de crecimiento y la actividad de celulasa total de la cepa QM6a de <i>T. reesei</i> [35].	74
B.4. Comparación del crecimiento de la cepa QM6a de <i>T. reesei</i> en las diferentes fuentes de carbono de polisacáridos puros insolubles después de 4 días (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].	74
B.5. Efecto de las diferentes fuentes de carbono lignocelulósico insoluble sobre la tasa de crecimiento y la actividad de celulasa total de la cepa QM6a de <i>T. reesei</i> [35].	75
B.6. Comparación del crecimiento de la cepa QM6a de <i>T. reesei</i> en las diferentes fuentes de carbono lignocelulósico insoluble después de 4 días (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].	75

C.1. Imagen de <i>T. reesei</i> cargada en la plataforma.	76
C.2. Imagen de <i>T. reesei</i> cargada en la plataforma y con los diámetros marcados.	77
C.3. Imagen de <i>T. asperellum</i> cargada en la plataforma.	79
C.4. Imagen de <i>T. asperellum</i> cargada en la plataforma y con los diámetros marcados.	79

Capítulo 1

Introducción

En el año 2010, en el Laboratorio de Exploración Espacial y Planetaria (LEEP) de la Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas (FCFM), de la Universidad de Chile, surge un proyecto para desarrollar el primer satélite nacional [1]. Así, un grupo multidisciplinario de investigadores, logró explorar la industria de los microsátélites, creando el primer Cubesat, que fue bautizado con el nombre de SUCHAI I [1]. Su construcción fue de bajo costo, en comparación con proyectos similares de la industria aeroespacial [1]. El satélite fue lanzado desde la base de lanzamiento de la Indian Space Research Organization (ISRO), ubicada en Sriharikota, India, el día 22 de junio de 2017 [1]. El cohete impulsor llevó un satélite, cuatro microsátélites, y 18 satélites tipo cubesat, entre los cuales se encontraba SUCHAI I [1].

SUCHAI I transportaba en su interior los implementos necesarios para llevar a cabo tres experimentos científicos: medir las variables que afectan el comportamiento físico de un circuito electrónico que se encuentra fuera de su equilibrio térmico; evaluar distintas técnicas que se utilizan para predecir fallas en baterías de iones de litio; y también medir la densidad de electrones en el plasma ionosférico [1]

Debido al éxito de SUCHAI I, el proyecto sumará 2 futuras misiones, con los satélites SUCHAI II y III, los que se encuentran en la fase de desarrollo en el LEEP, con investigadores de la FCFM y del Departamento de Física de la Facultad de Ciencias, conocido como el proyecto Anillo “Fundamental Processes in Space Physics” [2, 3].

A la construcción del segundo nanosatélite, se suma la adquisición de una Cámara de Termovisión, la que permite simular la hostilidad del ambiente de microgravedad espacial [2]. Se tiene así, que el objetivo del SUCHAI II es aumentar el volumen del Cubesat, desarrollar y evaluar distintos sistemas tecnológicos que utilizará el nanosatélite, tales como sistema de control, un sistema de comunicación, un sistema de baterías, entre otros [2].

En cuanto al proyecto SUCHAI III, este cuenta con la colaboración de la FCFM y la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, la Universidad de Santiago de Chile y la Universidad de Concepción [3]. En proyectos futuros, se espera estudiar el comportamiento de distintos microorganismos y organismos mayores en condiciones de microgravedad [3].

Por otro lado, se constata la presencia de esporas de hongos en los satélites y misiones

espaciales [4]. Se puede ejemplificar lo anterior con lo que sucede en la Estación Espacial Internacional (EEI), donde se han encontrado esporas de hongos, siendo más comunes los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* [4]. Estos organismos son capaces de sobrevivir en condiciones de altas temperaturas, luz ultravioleta de alta frecuencia, condiciones con ausencia de agua y a una exposición de rayos X hasta 200 veces mayor que la capaz de matar a un ser humano, ya que la radiación ionizante destruye las células dañando el ADN y distintas estructuras celulares básicas [4]. A pesar de no ser hongos reconocidos como dañinos para los seres humanos, la inhalación de sus esporas en grandes cantidades, puede causar enfermedades en personas inmunodeprimidas [4].

Las esporas de los hongos son una parte primordial del ciclo de vida de estos microorganismos y se caracterizan por encontrarse en un estado de latencia, donde disminuyen las actividades metabólicas [5]. Las esporas se encuentran rodeadas por una capa externa de proteínas hidrofóbicas y melanina, lo que evita la transferencia de masa desde el medio hacia el interior de la espora, reduciendo la hinchazón y la germinación hasta que se encuentre en un ambiente adecuado, momento en que se da comienzo al proceso de germinación [5, 6]. Por lo anterior, se supone que habría una alta probabilidad de supervivencia de las esporas de hongo en el espacio, por lo que surge la necesidad de prevenir que se contaminen los satélites con microorganismos terrestres o las naves espaciales. Es así como se debe considerar la presencia y proliferación de los distintos organismos microscópicos, que pueden estar presentes en una misión aeroespacial de larga duración, debiendo planificar y plantear el protocolo que se debe seguir en la presencia de esporas de hongos.

Sin embargo, existen organismos que son capaces de proporcionar grandes beneficios para la supervivencia humana, incluso, pueden llegar a reducir la carga de suministros a llevar en una misión espacial, debido a que permiten generar distintos productos «in situ» [7]. Tal es el caso del hongo filamentoso *Trichoderma reesei*, el que produce enzimas que degradan la pared celular de las plantas. Se plantea que puede llegar a permitir el desarrollo de alternativas más sostenibles y viables en el área de biocombustibles, producción y reciclaje textil, conversión química mediante enzimas, procesamiento de alimentos, biorremediación y agricultura [7]. De aquí surge el interés de estudiar los efectos de la microgravedad en *T. reesei*.

En la actualidad, los científicos de LEEP se encuentran trabajando en sus nuevas misiones, el que incluye un nanosatélite llamado PLANTSAT, que tiene por objetivo realizar experimentos biológicos en el espacio, como parte de un sistema que operará como constelación junto con SUCHAI 2, SUCHAI 3 y dos pequeños femtosatélites [8]. El primero corresponde a un clavel del aire, planta que no requiere tierra para su desarrollo, pero que puede servir de alimento y cumplir la función de producir oxígeno [9]. El objetivo es estudiar su tolerancia a la microgravedad y la radiación [9, 10]. Por otro lado, también se contará con microorganismos extremófilos obtenidos de zonas extremas de Chile, los que pueden purificar el agua o hacer minería espacial mediante biolixiviación, ver Figura 1.1 [9, 10].

Siguiendo con este interés por estudiar el crecimiento y proliferación de microorganismos terrestres, en condiciones de microgravedad espacial, es que desea incluir, dentro de las siguientes misiones de SUCHAI, un experimento científico que permita amplificar los conocimientos respecto al tema. En función de lo anterior, el trabajo de memoria plantea desarrollar la metodología teórica que se debe seguir para encapsular esporas del hongo filamentoso *T. reesei*, de forma que puedan ser transportadas en el interior del Cubesat. La encapsulación

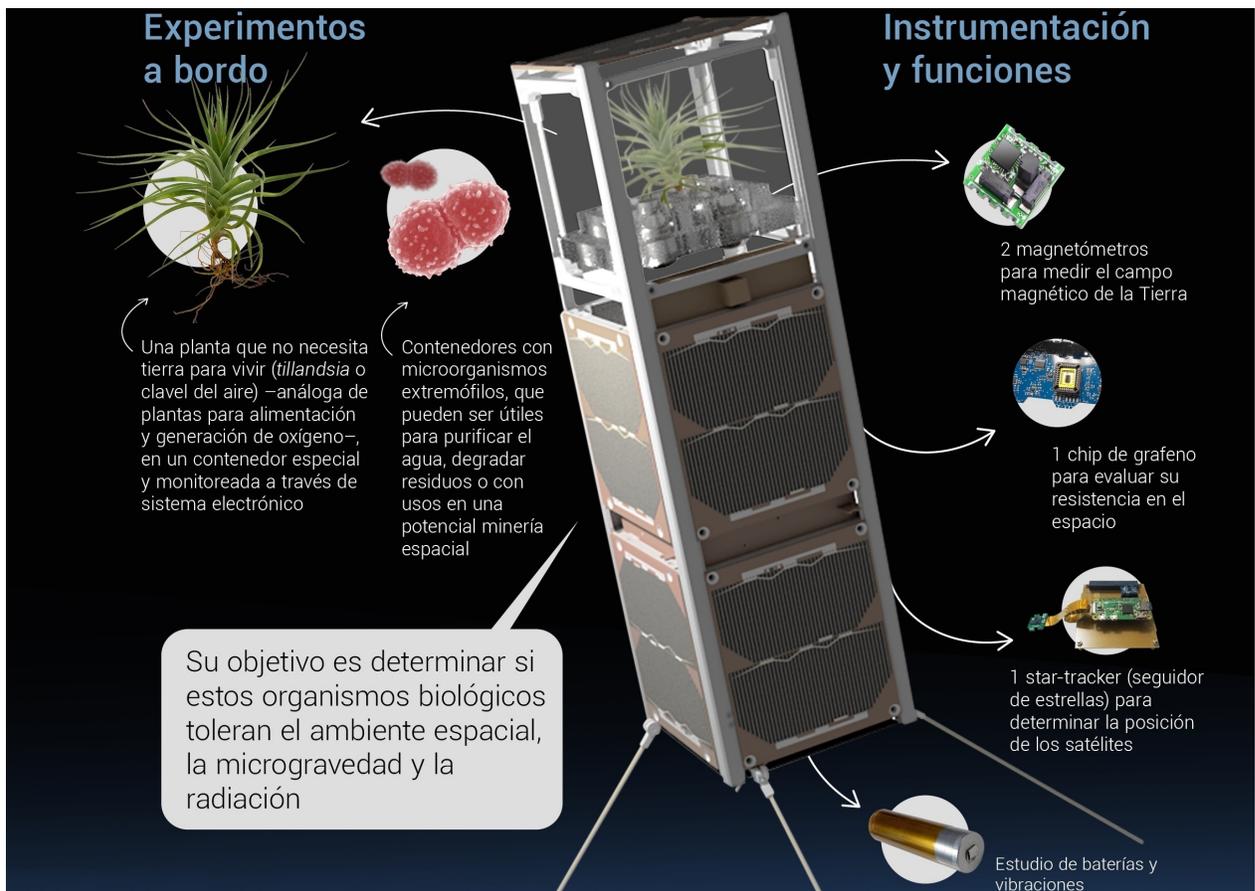


Figura 1.1: Representación del satélite PLANTSAT y los experimentos que transportará (adaptación) [9].

debe ser capaz de asegurar que no se entorpecerá el desarrollo de los otros experimentos científicos. En virtud de lo anterior, es necesario que las esporas se encuentren en un medio de cultivo, el que debe estar en condiciones específicas, en un recipiente que pueda ser depositado en el interior del microsatélite. Por lo anterior, se plantea desarrollar un dispositivo, que en su interior contenga el medio de cultivo y dentro de este se encuentren las esporas encapsuladas, de forma que se permita la liberación controlada de dichas esporas en condiciones de microgravedad. Es así como, la encapsulación de las esporas debe permitir que la liberación se produzca luego de un periodo de tiempo, posterior al lanzamiento, con el fin de monitorear el crecimiento del hongo en las circunstancias de interés científico. Por otro lado, el dispositivo, que contiene las esporas encapsuladas en el interior del medio de cultivo, debe impedir la liberación de esporas fuera de este, con el fin de asegurar que no se produzca en ninguna circunstancia la contaminación del interior del satélite.

La especie *T. reesei* corresponde a un hongo mesófilo y filamentoso, teleomorfo de la especie *Hypocrea jecorina*, con un estilo de vida micotrófico y es ampliamente reconocido como productora de enzimas hidrolíticas y degradadoras de celulosa [11, 12, 13, 14, 15]. El proceso de digestión de celulosa se produce debido a que el hongo consume azúcares, glucosa y celobiosa, para producir celulasas, hidrolizando la celulosa, a la vez que absorbe oxígeno y libera dióxido de carbono, como se muestra en la Figura 1.2 [13]. La hidrólisis enzimática de la celulosa se debe a que *T. reesei* produce un complejo de enzimas celulolítica, compuesto

principalmente por exoglucanasas, endoglucanasas, β -glucosidasas [16, 17, 18].

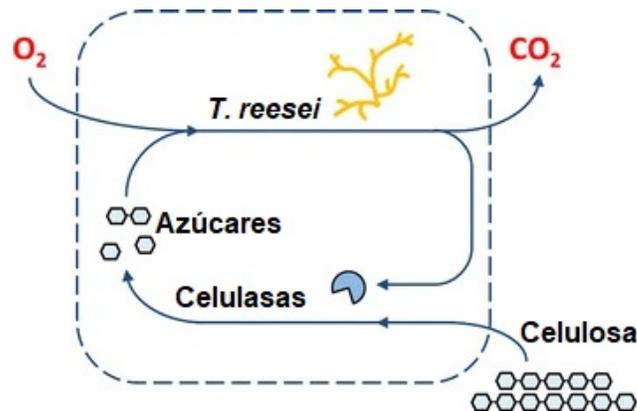


Figura 1.2: Esquema del proceso de digestión de celulosa por parte de *T. reesei*. La línea discontinua refleja el límite de los balances de masa (adaptación de Antonov et al., 2016) [13].

El ciclo de vida del hongo *T. reesei* es simple y se basa en la producción de esporas asexuales [11, 12]. Es una especie ubicua, encontrándola en variados tipos de suelos y diversos ecosistemas, dado que permite producir enzimas celulolíticas multifuncionales de bajo costo lo que genera que sea frecuentemente utilizado en la industria de alimentos, piensos, biorrefinería, papelera, fármacos, combustibles, agricultura, bioenergía y de productos químicos [12, 14, 15, 19].

Debido a que este hongo es altamente versátil, se puede encontrar en diversas industrias, tal como ya se ha mencionado. En cuanto a la industria de piensos y textiles, se aprovecha la eficiencia que otorga en la producción de celulasas [20], mejorando la digestibilidad de celulosa en ciertos animales, aportando suavidad a las telas. En agricultura es utilizada para biocontrol, debido a que es una especie micotrófica, permite controlar plagas al desintegrar agentes patógenos. Por otro lado, ayuda a incentivar el crecimiento y desarrollo de las plantas, promoviendo el crecimiento de las raíces y disminuyendo los requerimientos de fertilizante nitrogenados [11]. Se destaca en la industria papelera, al ser capaz de nutrirse de los residuos industriales líquidos de esta industria, lodos papeleros cargados de fibras de celulosa defectuosa, rellenos inorgánicos y metales pesados [15].

1.1. Objetivos del trabajo

1.1.1. Objetivo general

Estudiar y diseñar una metodología para desarrollar envolturas de encapsulamiento que permitan una liberación controlada de esporas de hongos bajo condiciones de microgravedad.

1.1.2. Objetivos específicos

- Determinar metodologías capaces de permitir un encapsulamiento eficaz de las esporas del hongo.
- Identificar un grupo de polímeros que permitan una correcta encapsulación de las esporas del organismo *T. reesei*.
- Determinar parámetros de evaluación que permitan definir la factibilidad técnica y económica de la encapsulación.
- Seleccionar técnicas en base a los parámetros anteriormente determinados.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. *Trichoderma reesei*

La especie *Trichoderma reesei* corresponde a un hongo filamentoso septado y teleomorfo¹ de *Hypocrea jecorina* el que en su estado natural, es capaz de desarrollar colonias sobre materia en descomposición [7, 22, 23, 24]. Destaca principalmente por producir enzimas que degradan la pared celular de las plantas, lo que ha permitido ampliar los estudios respecto a la regulación de la celulasa. Además, se plantea que su completa comprensión podría permitir el desarrollo de alternativas más sostenibles y viables en el área de biocombustibles, producción y reciclaje textil, conversión química mediante enzimas, procesamiento de alimentos, biorremediación y agricultura [7].

2.1.1. Proliferación

El ciclo de vida de *T. reesei* comienza con una espora² que es capaz de germinar al estar en un ambiente con sustratos adecuados y condiciones favorables, ya sea de luminosidad, estado C:N, pH, presencia de calcio extracelular y de COV [26, 27]. Al germinar, emerge un tubo germinal desde la espora, el que corresponde a una delgada hifa, que posteriormente crece y se ramifica, las que a su vez se ramifican y forman un sistema complejo de hifas conocido como micelio, ver Figura 2.1 [26]. Los organismos que se desarrollan de esta manera también son llamados organismos modulares, ya que crecen por la iteración repetida de módulos, que da lugar a un patrón de ramificación. La ventaja de proliferar de esta manera radica en que los organismos pueden explotar plenamente los recursos disponibles, alejándose de la zona agotada [26]. Sin embargo, se debe destacar, que el organismo tiene un crecimiento homogéneo y radial a escala de laboratorio, por la disponibilidad de nutrientes que se le proporciona, por lo que dista de lo que se puede encontrar en la naturaleza [26, 28]. Las hifas están constituidas por células cilíndricas que se extienden al crecer desde un extremo, aumentando el diámetro de la colonia y penetrando hacia el interior del sustrato [26]. Al acercarse al agotamiento de

¹Corresponde a estados sexuales o perfectos de los hongos [21].

²Son esporas fúngicas producidas asexualmente, normalmente diferenciadas de hifas especializadas [25].

nutrientes, comienza la conidiogénesis, donde las esporas serán dispersadas o entrarán en un periodo de latencia en los conidioforos [26, 29].

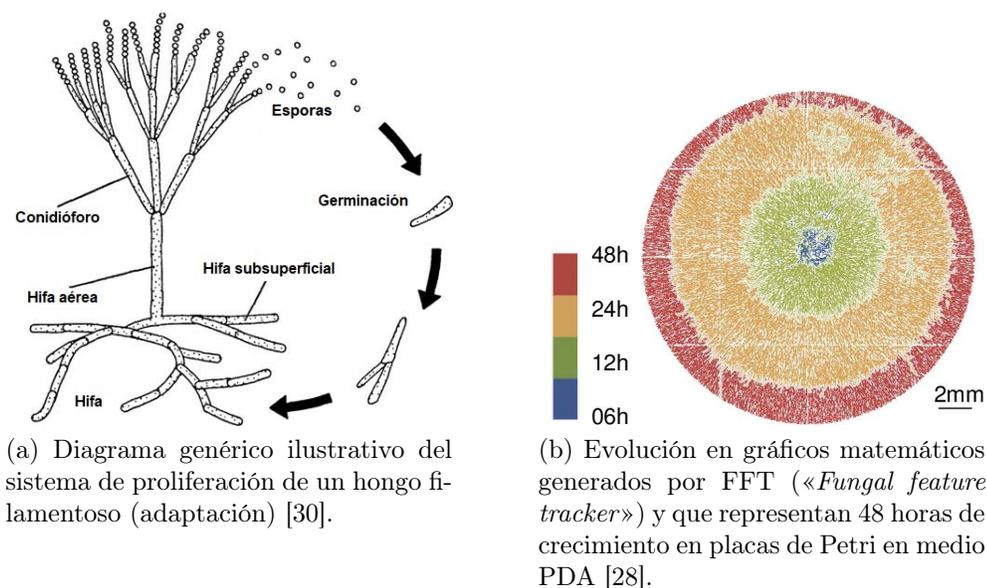


Figura 2.1: Crecimiento de *T. reesei*.

Considerando lo anterior, es de esperar que las esporas de *T. reesei* estando en el espacio y al ser liberadas de la cápsula que las recubre, sean capaces de germinar al entrar en contacto con un sustrato compatible, cuyo desarrollo permita visualizar el crecimiento del organismo, de manera semejante a lo presentado en la Figura 2.2a. Además, es de utilidad mencionar que la mayoría de las cepas utilizadas en laboratorio son capaces de producir esporas, por lo que se trabajaría con esta unidad [25].

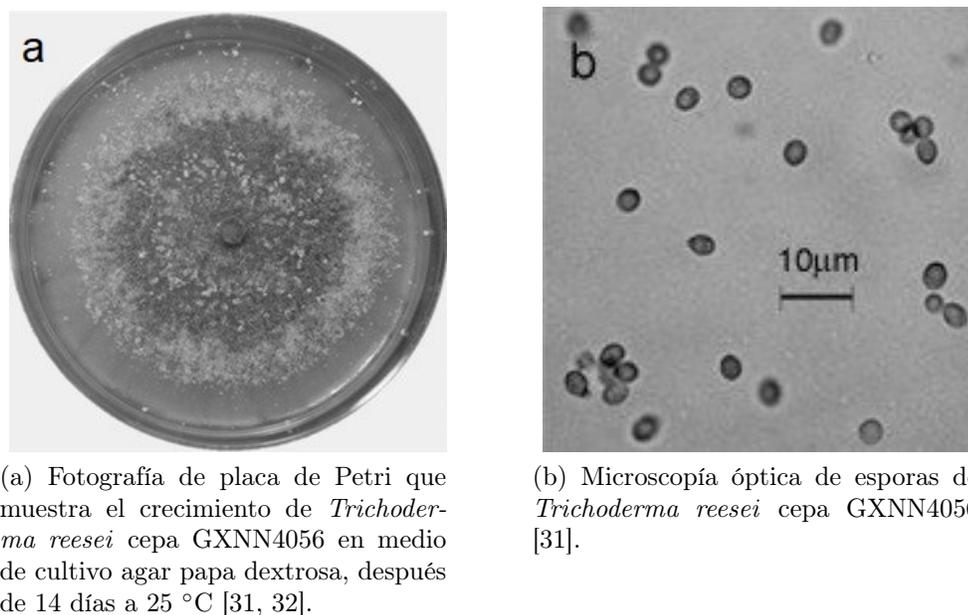


Figura 2.2: Microorganismo de interés.

Por otro lado, se han realizado modelamientos matemáticos de las esporas de distintas cepas de *Trichoderma reesei*, en particular de la cepa mutante QM9414, que describe las esporas como una elipsoide [33]. Lo anterior, permite conocer el rango de confianza donde se encuentra el valor de los ejes de la elipsoide que describe la spora, correspondiente a α [μm] = $1,6 \pm 0,1$ y β [μm] = $2,2 \pm 0,1$, el volumen de la spora, correspondiente a V [μm^3] = $32,8 \pm 3,8$, y la superficie de la spora, correspondiente a S [μm^2] = $50,5 \pm 3,8$ [33]. Con la información mencionada, es posible realizar cálculos que permitan escalar los métodos de encapsulación, consiguiendo, así, realizar una comparación entre las metodologías que sea más confiable.

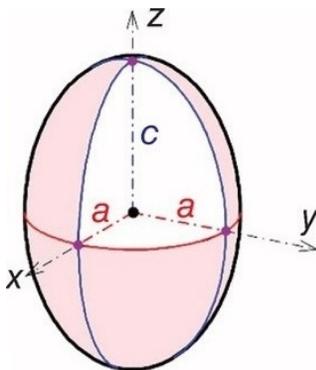


Figura 2.3: Forma modelada de una spora de la cepa QM9414 de *T. reesei* [33].

2.1.2. Fuentes de carbono

Al estudiar la cepa QM6a de *T. reesei* (Wild-type), correspondiente al ancestro de las cepas mutantes productoras de celulasa de la actualidad [34], para determinar el efecto que generan diversas fuentes de carbono en la producción de celulastas, se evaluó su crecimiento empleando distintas fuentes de carbono solubles e insolubles [35].

Se realiza el cultivo de esporas de *T. reesei* en MA-medio (descrito por Mandel y Andreotti) enriquecido individualmente por la adición de distintas fuentes de carbono, correspondientes a: D-glucosa, D-xilosa, D-lactosa, celobiosa, extracto de malta, carboximetilcelulosa (CMC), dextrosa de papa, xilano (espelta de avena), polvo de celulosa (linter de algodón), dos marcas de celulosa microcristalina (celulosa microcristalina de JT Baker y Avicel PH-101 de Sigma Aldrich), muestras de pino, muestras de pino pretratadas con organosolv y lodos de papeleras [35]. Además, se considera el MA-medio puro como control y se utilizan matraces de agitación y placas de agar para el cultivo [35]. Mediante la determinación del peso seco, se observó un menor crecimiento en el control con MA-medio y en los casos en que el MA-medio se enriqueció individualmente con CMC, xilano, muestras de pino, muestras de pino pretratadas con organosolv y lodos de papeleras como fuentes de carbono [35]. En cuanto a las fuentes de carbono lignocelulosas e insolubles, existen estudios que refuerzan los resultados ya mencionados, donde se señala que las lignocelulosas pretratadas no son capaces de estimular la producción de enzimas [36]. Por otro lado, se destaca la D-lactosa, polvo de celulosa, celulosa microcristalina y Avicel como buenas fuente de carbono, ya que muestran una gran actividad de celulasa total en equivalentes de glucosa, debido a que agotan más lentamente tales sustratos. Los resultados mencionados y los cultivos del microorganismo en

las mismas fuentes de carbono en medio sólido, se pueden ver de mejor manera en el Anexo B [35].

2.2. Condiciones favorables para la conidiación del organismo

Se plantea que para poder observar el crecimiento del organismo desde la Tierra, es necesario que las esporas produzcan micelio fúngico y este, a su vez, continúe produciendo esporas para aumentar la masa micelial [37]. Por otro lado, se realiza el supuesto que las condiciones favorables para la conidiación son a su vez favorables para la subsistencia del micelio [37]. Sabiendo que el proceso de conidiación está estrictamente relacionado a las condiciones ambientales del medio donde se encuentra el micelio, es importante mencionar, que uno de los factores por sí solo no implica necesariamente la producción de esporas, sino que se requiere una combinación de estas condiciones para generar este evento [37]. Además, se debe considerar como premisa, que el desarrollo de *Trichoderma* requiere que exista un equilibrio entre la conidiogénesis y la proliferación de las hifas [25].

2.2.1. Exposición lumínica

En la industria comercial de producción de esporas se da especial énfasis a la exposición a la luz, implementando regímenes lumínicos en ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La producción de esporas sucede en una serie de cinco etapas, en un periodo de 24 horas a 5 días luego de un estallido de luz, dependiendo de la especie de *Trichoderma*. Se plantea que la fotoconidiación depende del estado metabólico de la hifa y se restringe exclusivamente a la zona del organismo que sufre la exposición lumínica, disminuyendo la capacidad de generar esporas desde los límites de la colonia hacia el centro [37].

Además, existe una estricta relación entre la intensidad de la luz y el período de exposición, los que dan lugar al nivel de conidiación. Tal relación se rige por la ley de reciprocidad de Bunsen-Roscoe, que dicta que duraciones proporcionales de exposición a la luz e intensidades lumínicas proporcionales desencadenan la misma producción de esporas [37]. De tal manera que, recibir una intensidad de luz de X por un periodo de tiempo de Y , genera las mismas esporas que recibir una intensidad lumínica de $X/2$ durante un periodo de tiempo de $2Y$ [37].

Se tiene que la conidiación es independiente de la temperatura, en el rango de los 3°C a los 26°C [37]. Lo que sí tiene amplia relevancia en la producción de esporas es la presencia de oxígeno, ya que a pesar de que el micelio reciba un breve estallido de luz, si el microorganismo no está en presencia de oxígeno, el proceso de conidiación se detiene hasta recuperar la presencia de este gas [37].

Considerando la importancia de la presencia de oxígeno, se toma como referencia la construcción del satélite PLANTSAT, el que en su interior transportará un clavel del aire. Este estudio que se llevará a cabo posteriormente al lanzamiento del satélite, permitirá conocer la factibilidad y eficiencia de esta planta para producir oxígeno, lo que podría ser de utilidad

para definir el cumplimiento de este requerimiento [9, 10].

2.2.2. Estado de carbono y nitrógeno

El nivel de carbono, el nivel de nitrógeno y la relación C:N se encuentran dentro de los principales factores nutricionales asociados a la conidiación en *Trichoderma* [37]. Pese a lo anterior, no se conoce un solo conjunto de parámetros óptimos para cada especie en particular, por dificultades asociadas a la identificación de los organismos [37].

La tasa de conidiación varía dependiendo de la fuente de carbono que se utilice en el medio. Además, la luz puede incluso inhibir la conidiación en presencia de ciertas fuentes de carbono [37]. Con esto, es importante realizar el trabajo utilizando fuentes de carbono eficaces para el organismo, así y como ya se ha mencionado anteriormente, la glucosa, la lactosa, el polvo de celulosa, la celulosa microcristalina y Avicel (Sigma Aldrich), han demostrado ser fuentes de carbono efectivas para la cepa nativa QM6a de *T. reesei* [35].

Por otro lado, se tiene que el nivel de nitrógeno en el medio y el tipo de fuente que lo provee, permiten regular de manera cruzada la conidiación inducida por la luz [37]. En particular, las fuentes primarias de nitrógeno promueven que ocurra de forma simultánea la conidiación y el crecimiento de la colonia. En este punto es importante mencionar que las fuentes primarias de nitrógeno de *Trichoderma* corresponden a las basadas en el grupo amino [37]. Al estar en condición de bajo nivel de nitrógeno o cuando las fuentes secundarias son mayoritarias, correspondientes a nitratos, el organismo produce desrepresión [37]. Es importante considerar que la catalización de la fotoconidiación, al utilizar una fuente primaria de nitrógeno, depende netamente de la especie, ya que no todos los organismos responden de igual manera a este estímulo [37].

La relación relativa entre carbono y nitrógeno influye fuertemente en la conidiación y el crecimiento del micelio [37]. Considerando que la respuesta interactiva entre los niveles de carbono y nitrógeno dependen de la especie, por lo general se tiene que al aumentar los niveles de nitrógeno disminuye la conidiación y aumenta el crecimiento del micelio; y que por el contrario, al disminuir los niveles de nitrógeno aumente de masa micelial pero se reduce la conidiación [37].

2.2.3. pH ambiente

Se sabe que el pH inicial del medio de cultivo afecta la conidiación, de tal manera que calibrar este parámetro a un valor óptimo, favorece la formación de esporas de manera simultánea al crecimiento del micelio [37]. El pH óptimo varía dependiendo de la cepa de *Trichoderma*, pero un rango adecuado va desde un pH 4,0 a un pH 6,8 [37]. Además, el cultivo mismo de *Trichoderma* es capaz de alterar el pH del medio en función de las fuentes de nitrógeno utilizada, donde una fuente de nitrógeno primaria disminuye el pH y el uso de fuentes secundarias de nitrógeno alcaliniza el medio [37].

2.2.4. Señalización de calcio

El calcio cumple un rol relevante en el proceso de la diferenciación celular, existiendo evidencia que sustenta la idea de que el calcio induce la conidiación, sin importar el estado nutricional y las condiciones de luz en que se encuentre *Trichoderma* [37]. Por lo anterior, asegurar una fuente de Ca^{2+} extracelular puede mejorar el desarrollo del organismo en condiciones precarias de crecimiento [37]. Por lo mismo, se propone garantizar su presencia en trabajos futuros y en particular los que involucran condiciones de microgravedad.

2.2.5. Compuestos orgánicos volátiles (COV)

Se ha identificado una gran variedad de COV en cultivos de diversas especies de *Trichoderma*, los que son producidos de manera natural, como resultado de los procesos metabólicos; también se pueden producir como respuesta a la esporulación, para inhibir el crecimiento de competidores e incentivar el crecimiento del huésped [37]. Existen COV que se relacionan con el metabolismo de ácidos grasos, los que estimulan la conidiación de *Trichoderma*, debido a que probablemente genera señales para sincronizar la conidiación. Sin embargo, estas señales no son suficientes por sí mismas para inducir la conidiación [37].

2.3. Microgravedad

2.3.1. Física

Comúnmente se utiliza el término de microgravedad para referirse a la condición de ingravidez o de gravedad cero [43]. Tal estado se produce por la caída libre de un cuerpo en presencia de un campo gravitacional, donde el peso aparente del objeto es menor que el de su peso en reposo en la Tierra [43]. Por tal razón, se refiere a microgravedad todo estado en el que la gravedad aparente se reduce a magnitudes insignificantes, haciendo énfasis en que es algo netamente aparente, debido a que en la práctica, no existe la ingravidez [43]. Lo anterior se constata por medio de la Ley de Gravitación Universal de Newton, que define que todo cuerpo en el universo interactúa gravitacionalmente con todos los demás cuerpos existentes en el espacio. Así, se definió que la fuerza de gravedad que existirá entre dos objetos es proporcional al producto de sus masas y es inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que separa a los centros de masa de ambos objetos [43], lo que se resume en la Ecuación 2.1.

$$F_g = G \cdot \frac{m_1 \cdot m_2}{r^2} \quad (2.1)$$

Donde:

- F_g : Módulo de la fuerza ejercida entre los cuerpos en unidad de N.

- G : Constante de gravitación universal, tiene un valor aproximado de $6,67 \cdot 10^{-11} \left[\frac{\text{N} \cdot \text{m}^2}{\text{kg}^2} \right]$.
- m_1 : Masa del cuerpo 1 en unidad de kilogramos, en este caso corresponde a la masa del planeta Tierra.
- m_2 : Masa cuerpo 2 en unidad de kilogramos, en este caso corresponde a la masa del satélite.
- r : Distancia entre los centros de masas de ambos cuerpos en unidad de metros.

Para el caso en estudio, debido a la amplia diferencia entre las masas de ambos cuerpos, se desprecia la masa del satélite dentro del cálculo, así, al desarrollar la Ecuación 2.1 considerando lo antes mencionado, se obtiene una expresión para la aceleración de gravedad que experimenta el satélite, como se presenta en la Ecuación 2.2 [43].

$$g_s = G \cdot \frac{m_1}{r^2} \quad (2.2)$$

Lo anterior, permite corroborar que los satélites que orbitan el planeta Tierra si experimentan fuerza gravitacional. Haciendo uso de la Ecuación 2.2, considerando que la Tierra tiene una masa de $5,97 \cdot 10^{24}$ kilogramos [44] y teniendo en cuenta que SUCHAI I tenía una masa de 1 kilogramo y que siguió una órbita a una distancia de 505 kilómetros de la Tierra [45], es posible determinar la aceleración de gravedad que experimentó. El cálculo detallado se presenta en el Anexo A.1. Es importante recordar que a tal distancia de la órbita se le debe añadir los 6371 kilómetros del radio terrestre [46], ya que el término « r » corresponde a la distancia que separa los centros de masa.

$$g_s = 8,4 \left[\frac{m}{s^2} \right]$$

Sabiendo que la masa del satélite no cambia y que la aceleración de gravedad en la superficie de la Tierra es de $9,81 \text{ m/s}^{-2}$ [46]; además, considerando que la relación entre la fuerza de gravedad y la aceleración de gravedad que experimenta el satélite es $F_g = m_2 \cdot g_s$ [43, 47], se constata que el satélite en el espacio siente un 86,7% de la fuerza gravitatoria que experimenta en la superficie terrestre. Esto da paso a comprender el porqué los satélites al estar en órbita no caen hacia la Tierra. Esto se debe a la fuerza centrípeta, como se explica a continuación.

La fuerza centrípeta es una fuerza real que le permite a un cuerpo moverse en una órbita circular y su dirección siempre se dirige hacia el centro de la misma [48]. Por otro lado, se encuentra la fuerza centrífuga, que es la fuerza ficticia necesaria que le permite a un marco de referencia no inercial no acelerar aparentemente; es sentida por el objeto en movimiento y se dirige hacia afuera [49]. Se tiene, por ende, que ambas fuerzas discrepan en el marco de referencia, pero son en esencia la misma fuerza apuntando en direcciones opuestas [49].

Así, para conseguir el estado de ingravidez, se requiere un equilibrio entre la fuerza centrípeta y la fuerza de gravedad; esto permite, además, determinar la velocidad tangencial « v »

con la que debe transitar el satélite para no caer sobre la Tierra [50]. Por otro lado, se sabe que la Ecuación 2.3 corresponde a la expresión conocida para la fuerza centrípeta [51].

$$F_c = \frac{m \cdot v^2}{r} \quad (2.3)$$

Donde:

- F_c : Fuerza centrípeta.
- m : Masa del cuerpo en movimiento.
- v : Velocidad tangencial.
- r : Distancia entre el cuerpo en movimiento y el centro de la órbita.

Con lo anterior y los valores ya conocidos, es posible determinar la velocidad tangencial del satélite. El cálculo detallado se presenta en el Anexo A.2.

$$v = 7,6 \left[\frac{km}{s} \right]$$

El valor obtenido se corrobora, debido a que el equipo de SUCHAI declaró que la velocidad a la que transitó el satélite era de aproximadamente 7 kilómetros por segundo [45].

Con todo lo anterior, se tiene que el aparente estado de ingravidez se produce porque el satélite y su contenido están cayendo en órbita cuasicircular alrededor de la Tierra [43]. Considerando que los elementos en el espacio están en permanente caída libre y en presencia de vacío, lo que genera que todos caigan con la misma aceleración, sin importar su masa [43, 52]. Por todo lo anterior, la nave espacial y todo su contenido se encuentran en caída libre constante en dirección al centro de la Tierra, pero gracias a la alta velocidad tangencial determinada por la mecánica orbital, que le permite moverse a una velocidad que coincide con la curva de la Tierra, se produce el estado de ingravidez ya comentado [43, 52].

En la FCFM se encuentra un equipo para simular una condición de microgravedad [50], lo que permite que se puedan realizar estudios previos que permitan evaluar de mejor manera la viabilidad de las metodologías propuestas.

2.3.2. Implicancias generales en la vida

Es importante considerar esta condición de aparente ingravidez para el desarrollo y funcionamiento de cualquier organismo. Por lo anterior, se describirán los efectos nocivos sobre otras especies que puede desencadenar una exposición prolongada a microgravedad, debido a que la ausencia de la gravedad genera alteraciones desde el punto de vista fisiológico, desencadenando problemas de salud temporales y a largo plazo [43].

Una gran cantidad de personas que han experimentado una exposición prolongada a microgravedad han padecido de descalcificación esquelética y atrofia muscular [43]. Además, se puede sufrir del síndrome de adaptación espacial, que incluye síntomas como náuseas, dolor de cabeza, vértigo, vómitos y letargo general; generado por una redistribución ascendente de líquidos y la inmovilización de la sangre [43, 53].

2.3.3. Viabilidad fúngica en el espacio

Se tiene que la Estación Espacial Internacional (ISS, por sus siglas en inglés) corresponde a un tecnológico complejo orbital, que es el resultado del trabajo conjunto de 16 países y lleva más de quince años orbitando a 400 kilómetros de la superficie de la Tierra [54]. Destaca por ser el objeto artificial más grande en la órbita terrestre, con unas dimensiones que actualmente llegan a los 110 metros por 100 metros, por permitir la habitación humana y evidenciar los efectos de la microgravedad [54, 55].

Lo anterior permite comprender la necesidad de conocer a cabalidad la composición del microbioma viable de la ISS, lo que da paso a planificar adecuadamente las labores de seguridad y mantenimiento del complejo orbital [55]. Se ha constatado la presencia de bacterias y hongos que han prosperado en la ISS, siendo la fracción fúngica considerablemente menor, destacando principalmente especies del género filamentoso *Aspergillus* [55, 56].

Sin embargo, se ha constatado que las células y los organismos no humanos, al estar en presencia de microgravedad, también pueden presentar efectos perjudiciales para su metabolismo [43]. Un ejemplo de lo anterior es el experimento PROTECT, donde se expuso esporas de la bacteria *Bacillus subtilis* a un ambiente en ausencia de luz UV y bajo condiciones simuladas de Marte, por un extenso periodo de tiempo. Lo anterior, generó que se expresaran genes relacionados a estrés en respuesta a daño del ADN, daño de proteínas, estrés oxidativo y estrés de la envoltura celular [56, 57].

Por otro lado, es importante considerar que los hongos cuentan con diversos mecanismos de defensa contra la radiación solar, tal como la producción de enzimas capaces de eliminar especies de oxígeno reactivo (ROS). También cuentan con mecanismos de reparación de ADN y pueden producir pigmentos, ya sea melaninas o semejantes, y metabolitos que absorban la radiación UV [56].

En virtud de lo anterior y considerando que en la Tierra se utilizan comúnmente microorganismos para producir recursos valiosos de diversas industrias, tal como la farmacéutica y la alimentaria, se ha planteado que para realizar misiones lejanas de exploración espacial se podría utilizar biotecnología, permitiendo generar abordo de la misma nave espacial alimentos y medicinas [58]. En particular, los hongos filamentosos son ampliamente utilizados en la elaboración de diversos compuestos de interés, los que abarcan distintos rubros industriales, entre los que se pueden destacar: alimenticio, biorremediación, odontológico, combustible, cosmético, higiene, farmacéutico, papelería, polímeros y textil [58].

Para evaluar con mayor profundidad los efectos que puede generar una permanencia prolongada de hongos filamentosos bajo condiciones de microgravedad, se han desarrollado estudios donde se simula este ambiente. Con lo anterior, se ha determinado que la tasa de

germinación de esporas bajo condiciones de gravedad terrestre es similar a la que se produce bajo condiciones de microgravedad y que incluso para ciertos organismos esta tasa puede aumentar [59].

Por otro lado, la condición de microgravedad provoca que el micelio presente hifas homogéneas con pared celular lisa, lo que genera que no existan diferencias con el desarrollo del organismo bajo condiciones terrestres normales [59]. Además, considerando que las microfibrillas de quitina corresponden a un factor relevante dentro de la pared celular fúngica, contribuyendo a la integridad general de su estructura, no se registraron evidencias diferenciadoras significativas entre la presencia de quitina para el crecimiento de un organismo bajo condiciones de microgravedad en comparación a uno que crece bajo condiciones gravitatorias terrestres [59].

Se ha constatado que estar bajo condiciones de microgravedad no genera alteraciones de la distribución subcelular, sin embargo, existen ocasiones donde se produce una mayor distribución de la estructura extracelular a lo largo de la pared celular, asemejándose a un melanosoma³ [59]. Así mismo, se ha constatado un aumento del número de mitocondrias generadores de energía celular al estar bajo condiciones de microgravedad [59].

Otro indicador de estrés ambiental fúngico es el nivel de transcripción del gen *gfaA*, el que se relaciona con la acumulación de quitina en la pared celular [59]. Sin embargo, se ha observado que no existen diferencias significativas entre la tasa de transcripción de este gen para un organismo que se desarrolla bajo condiciones de microgravedad en comparación a un organismo que se desarrolla bajo condiciones terrestres [59].

Por otro lado, se tiene evidencia de experimentos con esporas secas sobre diferentes polímeros, los que fueron llevados a la ISS para analizar su viabilidad luego del transcurso de un tiempo a bordo del complejo orbital. En estos estudios se constató que al realizar misiones breves, menores a un mes, las esporas secas lucen de manera similar a las del control terrestre y, además, todas son capaces de producir cultivos altamente viables [61]. Sin embargo, cuando se trata de una misión espacial de larga duración, correspondiente a varios meses, genera comúnmente alteraciones en las esporas, de tal manera que la viabilidad es escasa y depende netamente del microorganismo [61].

Además, se tiene evidencia que el micelio aéreo que se genera a partir de las esporas secas, de viajes espaciales largos y cortos, es denso y corto para todos los organismos y bases⁴ utilizadas, existiendo leves diferencias con el control de laboratorio terrestre [61].

En cuanto a experimentos desarrollados con cultivos vivos enviados en placas de Petri a la ISS, estos se diferencian principalmente del control de laboratorio porque presentan comúnmente márgenes irregulares, cuentan con un micelio sumergido que se extiende más allá de la colonia y las hifas tienen diámetros menores; además, al desarrollar pruebas de viabilidad a las esporas producidas bajo condiciones de microgravedad se constató que una cantidad mínima de estas es capaz de germinar, pero que estas no son capaces de desarrollarse

³Orgánulo intracelular especializado, en el que se sintetiza y almacena pigmentos de melanina [60].

⁴Correspondiente a sustratos de obleas de silicio, policarbonato y hierro, en las que se deja caer diferentes suspensiones de esporas, para luego dejarla secar, de tal manera que las esporas queden adheridas a cada base.

hasta convertirse en hifas largas y ramificadas, por lo que no pueden formar colonias [61, 62].

Capítulo 3

Métodos de encapsulación

La microencapsulación corresponde a una técnica mediante la cual es posible recubrir con una cápsula un material de valor, el que es llamado material activo, permitiendo así conservar sus propiedades [63]. Actualmente, la microencapsulación es ampliamente utilizada en diversas industrias, donde destaca la industria farmacéutica, alimentaria, perfumería y de biocontrol, permitiendo recubrir grasas y aceites, compuestos aromáticos y oleorresinas, vitaminas, minerales, colorantes y enzimas [63, 64].

Existen diversas metodologías para desarrollar un proceso de microencapsulación, las que pueden ser divididas en tres grupos principales [63, 64, 65, 66]. Por un lado se tienen los métodos de encapsulación vía procesos químicos, donde los monómeros y las moléculas pequeñas se polimerizan para formar la cápsula polimérica; se caracterizan principalmente porque la pared es producida en un tanque o reactor que contiene líquido [63, 64, 66, 67]. Por otro lado, se tienen los métodos de encapsulación vía procesos mecánicos o físicos, la formación de la cápsula depende del cambio de fase sólido-líquido a consecuencia de calentamiento o disminución de solubilidad por la evaporación del solvente; se desarrollan generalmente en equipos o sistemas adquiridos comercialmente [63, 64, 66, 67]. Finalmente se tienen los métodos de encapsulación vía procesos fisicoquímicos, donde los materiales que forman la pared se encuentran previamente disueltos y precipitan en la solución, después de una variación de temperatura, del pH o de la concentración de electrolitos, lo que genera que se deposite gradualmente en la superficie del compuesto activo, cubriéndolo [66].

A continuación se presentan las técnicas de encapsulación más conocidas y la forma de desarrollarlas, ahondando en aquellas más relacionadas al objetivo del presente trabajo.

3.1. Encapsulación fisicoquímica

3.1.1. Coacervación

La coacervación compleja consiste en añadir un soluto líquido polimérico, llamado coacervado, sobre una solución polimérica, polímeros de cargas opuesta que en conjunto forman la

pared [63, 64, 68]. Al realizar un cambio de pH, de temperatura o al añadir una sal, el polímero se comienza a adherir a la pared del coacervado, generando la encapsulación. Luego de un proceso de secado se obtiene una pasta o polvo con el producto final, como se muestra en la Figura 3.1 [63]. En cuanto a la coacervación simple, esta involucra un único tipo de polímero, donde son añadidos agentes altamente hidrofílicos [63, 64, 68]. Permite encapsular partículas de $5 \mu\text{m}$ a $200 \mu\text{m}$ y conlleva costos relativamente bajos, por lo que es ampliamente utilizada en diversas industrias, tales como farmacéutica, alimentaria, agrícola y textil [63, 68]. Algunos procesos productivos donde se utiliza la coacervación es la elaboración de goma de mascar, pasta de dientes, alimentos horneados, alcohol polivinilo, gelatina-acacia [64].

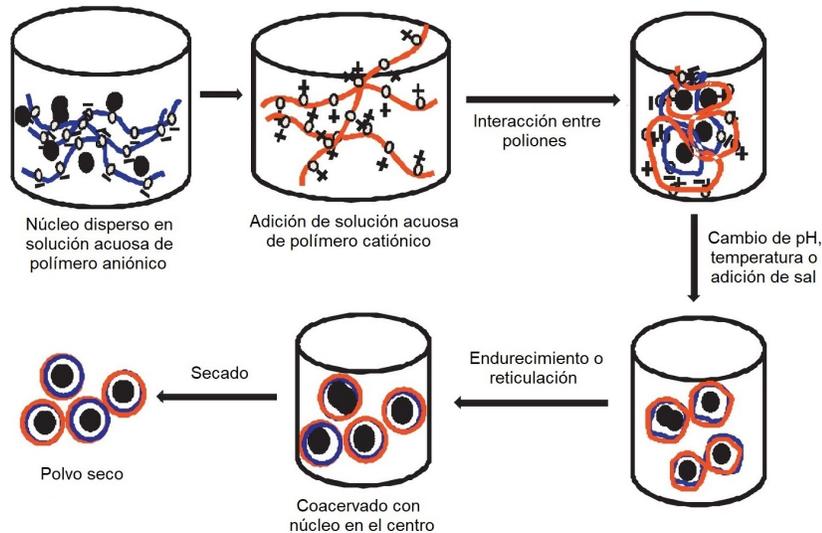


Figura 3.1: Diagrama genérico ilustrativo de encapsulación por coacervación compleja (adaptación de Timilsena et al., 2019) [68].

3.1.2. Inclusión molecular

La inclusión molecular se produce cuando una molécula de mayor tamaño es capaz de rodear a una de menor tamaño, dejándola encapsulada, como se muestra en la Figura 3.2 [63, 64]. Este proceso permite encapsular partículas de $5 \mu\text{m}$ a $50 \mu\text{m}$ y da como resultado un polvo [63]. La inclusión molecular permite proteger sabores e ingredientes sensibles al calor, por lo que es utilizada en los procesos de producción de confites, bebidas instantáneas, snack extruido, aceite de ajo, cebolla y vitaminas [63, 64].

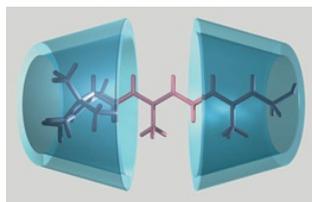


Figura 3.2: Ilustración esquemática de la encapsulación con ciclodextrinas por inclusión molecular [69].

3.2. Encapsulación química

3.2.1. Polimerización interfacial

Una solución que contiene un reactivo lipófilo se emulsiona en una fase acuosa que contiene un emulsionante. Luego, se añade un reactivo hidrofílico a la fase acuosa, lo que origina la polimerización interfacial y la formación de la cubierta, como se muestra en la Figura 3.3 [70]. Así, esta metodología se basa en la polimerización de monómeros hidrofílicos y lipofílicos en la interfase de dos sustancias inmiscibles, correspondiente a una emulsión de aceite en agua, lo que produce una membrana que da lugar a la pared de la cápsula [64, 70].

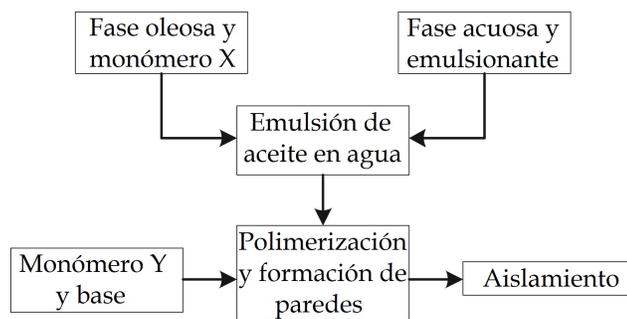


Figura 3.3: Diagrama genérico ilustrativo del método de encapsulación por polimerización interfacial (adaptación de Jamekhorshid et al., 2014) [70].

3.3. Encapsulación mecánica

3.3.1. Gelificación iónica

Este método permite encapsular células, enzimas y suspensiones, dando como resultado perlas de encapsulación [71]. La gelificación iónica se divide en dos grupos, la gelificación iónica externa y la interna [64]. En cuanto a la gelificación iónica externa, los iones Ca^{2+} son añadidos por medio de una emulsión, donde la fase externa es oleosa y la interna es acuosa, como se muestra en la Figura 3.4 [64, 72]. La principal desventaja de este método es que no se puede controlar el tamaño final de las cápsulas, debido a que las partículas tienden a coagular en grandes masas de $400 \mu\text{m}$ a 1mm en el transcurso del proceso de encapsulación [64]. Por otro lado, la gelificación interna se basa en una solución del material a encapsular con alginato de sodio, donde la presencia de iones Ca^{2+} la otorga una sal, generalmente carbonato de calcio; luego de homogenizar la solución, esta es dispersada en una fase oleosa, donde se genera la acidificación del sistema, formando una emulsión acuooleosa [64]. Posteriormente, se añade una carga adicional de la fase oleosa mezclada con un disolvente de compuestos orgánicos, logrando la solubilización del carbonato cálcico y la encapsulación [64, 73]. Así, la gelificación iónica interna, da como resultado partículas de aproximadamente $50 \mu\text{m}$, tamaño considerablemente menor que la gelificación iónica externa [64, 73].

La gelificación iónica es ampliamente utilizada en la industria farmacológica, un ejemplo

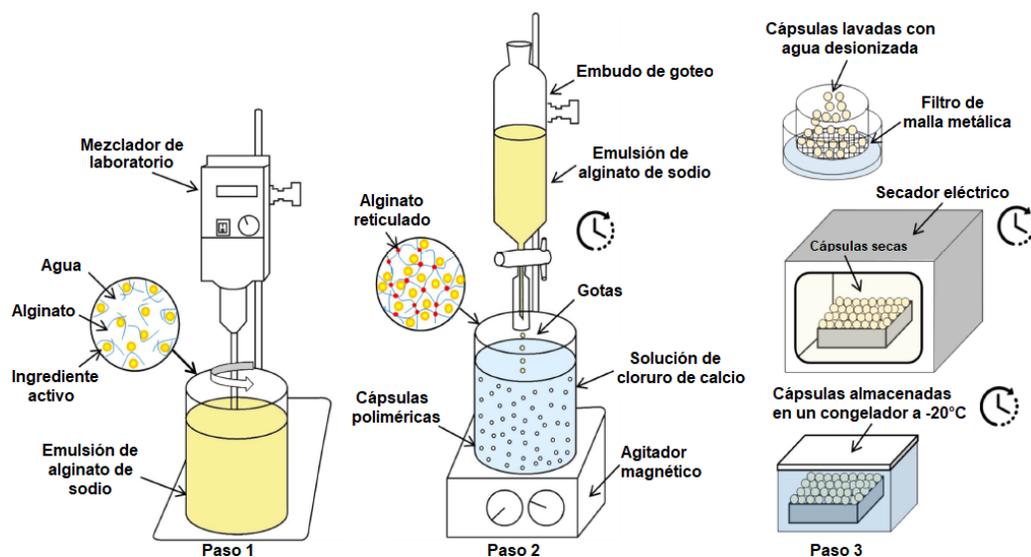


Figura 3.4: Diagrama genérico de encapsulación por gelificación iónica externa (adaptación de Norambuena-Contreras et al., 2019) [74].

de esto es la encapsulación de diclofenaco de sodio en perlas de alginato tratadas con quitosano, resultado que se obtiene por gelificación iónica con Ca^{2+} [75]. El recubrimiento permite la liberación controlada del medicamento, en función del pH, previniendo la liberación del medicamento a nivel gástrico [75].

Sin embargo, la versatilidad de esta técnica ha permitido recubrir esporas de hongos, como *Aspergillus nidulans*, *T. asperellum* y *T. reesei*, consiguiendo, incluso, el desarrollo de microcolonias dentro de las perlas [76, 77]. Además, es importante considerar que la implementación de la gelificación iónica es sencilla, de tal manera que se puede construir el equipo de manera artesanal, por lo que no existen inconvenientes en su implementación [78]. Lo anterior es de gran relevancia, ya que incorpora la gelificación iónica como una alternativa a evaluar para cumplir con el objetivo del presente trabajo.

3.3.2. Co-cristalización

Se basa en la preparación de una solución de sacarosa supersaturada, a la que se añade el material a encapsular, luego se homogeneiza la mezcla, para posteriormente calentarla de manera espontánea y rápida hasta la temperatura de cristalización, como se muestra en la Figura 3.5 [79]. Debido a la adición del ingrediente activo, la mezcla cristaliza de manera irregular y aglomerada, generando que el compuesto de interés se deposite en los espacios vacíos, quedando incrustado en la matriz porosa de cristales [79].

La co-cristalización permite encapsular partículas de tamaño de nanómetros a micrómetros, un ejemplo de esto, es que permite recubrir biomacromoléculas, que tienen un diámetro que va desde $1 \mu\text{m}$ a los 10 nm [79, 80, 81]. La co-cristalización es flexible y económica, por lo que es utilizada en distintos procesos de producción, tal como de jugos de frutas, aceites esenciales, saborizantes, aromatizantes, azúcar morena, fenoles y vitaminas [64, 79].

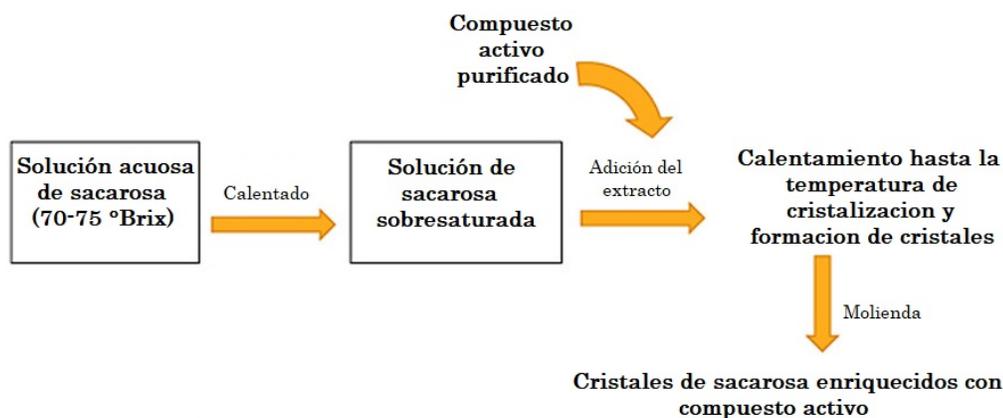


Figura 3.5: Diagrama genérico de encapsulación por co-cristalización (adaptación de Kaur et al., 2021) [79, 82].

3.3.3. Atrapamiento en liposomas

Este método permite encapsular partículas del orden de micras, dando como resultado cápsulas más pequeñas que $2 \mu\text{m}$ [71]. Esta técnica de encapsulación se basa en una única o múltiples capas de fosfolípidos hidratados, que guardan en su interior un componente lipofílico, como se presenta en la Figura 3.6 [65, 71]. El proceso se lleva a cabo cuando películas de fosfolípidos se dispersan en un medio acuoso, las que son selectivamente permeables a ciertos iones y la cápsula se forma cuando una solución acuosa de sustancia activa es mezclada con la película del lípido [71].

La liberación del compuesto de interés se genera por difusión a través de las capas de fosfolípidos, por destrucción de la cápsula, por presencia de una concentración crítica de iones de calcio o por un cambio de pH [65, 71].

El atrapamiento en liposomas es utilizada en sistemas alimenticios líquidos, ya que es capaz de proteger ingredientes hidrosolubles, también puede ser útil para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas [64, 71].

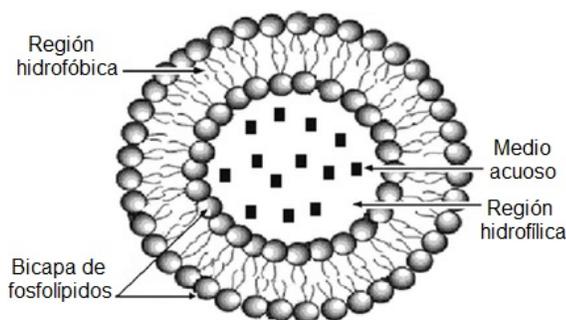


Figura 3.6: Representación de una estructura de encapsulación en base a una bicapa de liposomas hidratadas (adaptación de Schoebitz et al., 2013) [71].

3.3.4. Secado por aspersión

Se prepara una solución de un polímero con el compuesto de interés, el que debe ser inmiscible en agua, luego, la solución se homogeneiza y se atomiza en forma de pequeñas gotas sobre una corriente de gas caliente, lo que produce la vaporización del solvente, generando la cápsula en la superficie del material de interés, como se muestra en la Figura 3.7 [64, 67, 71]. Este método permite encapsular partículas de $1\ \mu\text{m}$ a $50\ \mu\text{m}$ y da como resultado un polvo de cápsulas de tamaño variable [63]. El secado por aspersión es un método ampliamente utilizado en los procesos de producción de ingredientes alimenticios, ya sea vitaminas, esencias, aceites, probióticos, lípidos, minerales, pigmentos y leche en polvo, confites, postres instantáneos, y bebidas instantáneas [63, 64, 67]. Es un proceso de bajo costo, con flexibilidad de implementación y procesamiento, cuenta con una buena disponibilidad de equipos, además, provee una gran estabilidad de las cápsulas finales y alta eficiencia de encapsulación, lo que permite desarrollar una producción a gran escala en modo continuo [63].

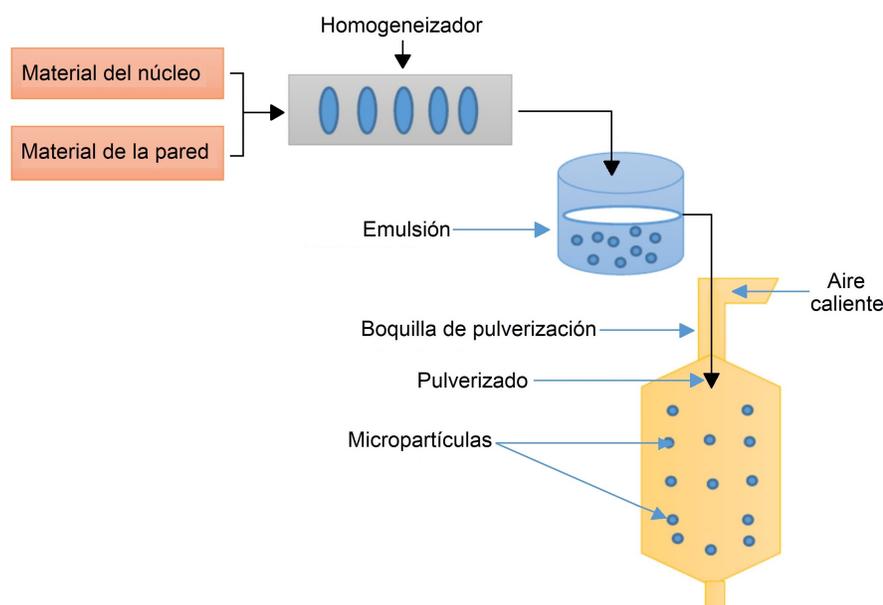


Figura 3.7: Diagrama de encapsulación vía secado por aspersión (adaptación de Mohammed et al., 2020) [83].

El secado por aspersión es ampliamente utilizado en la industria alimenticia. Un ejemplo de esto es el secado por aspersión de un jugo concentrado de espárragos y la posterior sustitución parcial de maltodextrina por fibras de espárragos como matriz portadora, dando como resultado mejores propiedades físicas y una mayor retención de aroma [84].

Sin embargo, la versatilidad del secado por aspersión ha permitido recubrir esporas de hongos, como *Beauveria bassiana* [85]. Por lo anterior, es importante considerar que la implementación de esta metodología requiere el uso de equipos especializados. Sin embargo, existe gran disponibilidad de estos, contando con la alternativa de colaborar con laboratorios de otras universidades, teniendo como referencia la Universidad de Santiago de Chile [86, 87]. Lo anterior es de gran relevancia, ya que incorpora el secado por aspersión como una alternativa a evaluar para cumplir con el objetivo del presente trabajo.

3.3.5. Enfriamiento por aspersión

El proceso consiste en disolver o dispersar el ingrediente activo con el material pared; luego, se atomiza la emulsión o suspensión resultante en una cámara de enfriamiento, donde las gotas al entrar en contacto con el aire frío se solidifican y forman las microcápsulas [63, 64, 88]. Para llevar a cabo esta técnica de encapsulación se utiliza el mismo equipo de secado por aspersión, sin embargo, se debe calentar la corriente de alimentación y enfriar el aire de la cámara al desarrollar el proceso, como se muestra en la Figura 3.8 [88]. Esta técnica permite utilizar grasas, ceras o aceites como materiales de pared, además, permite que el ingrediente activo sea sólido o líquido, debido a la temperatura de operación es recomendado para recubrir materiales biológicos y alimentos sensibles al calor [64, 88].

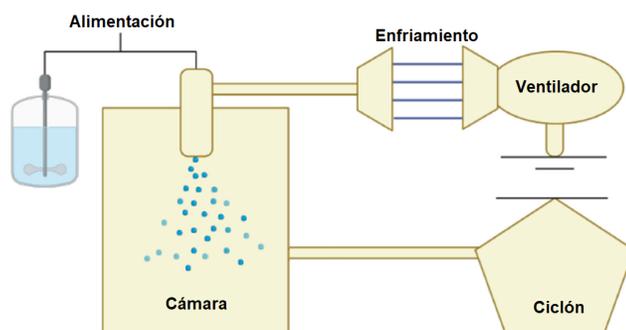


Figura 3.8: Diagrama genérico de encapsulación vía secado por congelación (adaptación de Favaro-Trindade et al., 2021) [89].

Permite encapsular partículas de $20 \mu\text{m}$ a $200 \mu\text{m}$ y da como resultado un polvo [63]. El enfriamiento por aspersión es una metodología poco costosa, por lo que es frecuentemente utilizada en procesos de producción de platos preparados y helados, además, se utiliza para encapsular sulfato ferroso, vitaminas, minerales, acidulantes, compuestos aromáticos, productos de panadería, sopas en polvo y alimentos con alto contenido de grasa [63, 64, 88].

3.3.6. Montaje capa por capa (LbL)

Se basa en el autoensamblaje de películas poliméricas, por adsorción secuencial de distintos polímeros, sobre un sustrato sólido, como se muestra en la Figura 3.9 [90, 91]. Corresponde a un autoensamblaje de polielectrolitos, el que encuentra su fundamento en las interacciones electrostáticas de las capas de polímero con carga opuesta, es decir polianión y policación [92]. Es un método flexible, ya que permite elegir el tipo de polímeros con el cual recubrir y la cantidad de polímeros en la cápsula polielectrolítica. Además, cuenta con un amplio espectro de estímulos para controlar el proceso de encapsulación y la liberación del ingrediente activo; en particular, para deshacer de manera controlada la cápsula se puede aplicar cambios de pH, de la fuerza iónica o del campo eléctrico [90, 91].

Las películas de recubrimiento formadas por este método de encapsulación son ultrafinas, yendo desde 1 nm a 1000 nm de espesor, proporcionando la ventaja de controlar fácilmente el espesor del recubrimiento [91, 92]. Debido a las ventajas que provee el montaje capa por capa, es un método ampliamente utilizado en distintos procesos, ya sea para proteger

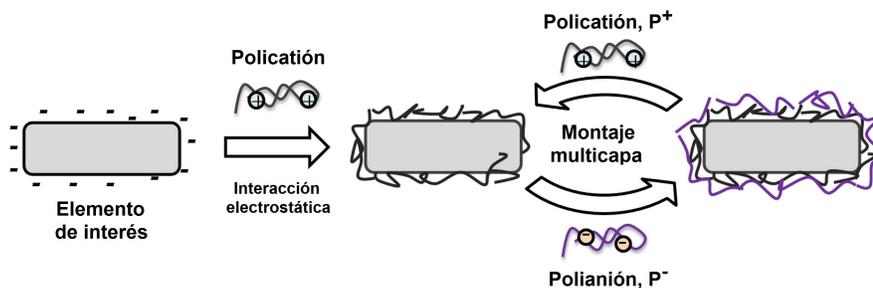


Figura 3.9: Representación esquemática del proceso de encapsulación por montaje capa por capa de un ingrediente activo con superficie cargada negativamente (adaptación de Pawlak & Belbekhouche, 2021) [92].

contra la corrosión, entrega intracelular, la detección y el biosensado, diodos emisores de luz, dispositivos ópticos no lineales y membranas de gas permselectivas, además, gracias al control sobre la descomposición de la película se puede utilizar, incluso, en sistemas de liberación de fármacos [90, 91].

Debido a la versatilidad del montaje capa por capa, es un método ampliamente utilizado en la industria farmacéutica, un ejemplo de esto es la encapsulación de *Escherichia coli* con un recubrimiento poroso, utilizando quitosano y alginato, a través del que se pueden difundir los nutrientes requeridos por la bacteria, de tal forma que se mantiene la viabilidad del organismo a la vez que se retrasa su crecimiento en ambientes extraintestinales [92].

Cabe destacar, que por la versatilidad ya mencionada de esta técnica, se ha podido encapsular esporas de hongos, en particular, esporas de *T. reesei* con capas de lignina cationica y lignosulfonato [38]. Considerando que esta técnica ya se ha aplicado en el organismo de interés y, tal como ya se ha mencionado, el procedimiento de implementación es relativamente sencillo, debido que no requiere el uso de equipos especializados, se espera contar con una gran disponibilidad de estos. Lo anterior es de gran relevancia, ya que incorpora el montaje capa por capa como una alternativa destacada a evaluar para cumplir con el objetivo del presente trabajo.

3.3.7. Extrusión

Esta técnica de encapsulación involucra la generación de una emulsión, del compuesto de interés y el material de pared, que luego es empujada a través de alta presión, como se muestra en la Figura 3.10 [64]. Así, el diámetro de las cápsulas generadas depende principalmente del diámetro de la aguja utilizada para extruir la emulsión, tanto como la viscosidad y la concentración de esta última [93].

Este proceso de encapsulación permite recubrir partículas de $200\ \mu\text{m}$ a $2000\ \mu\text{m}$ y da como resultado polvo o granulado de cápsulas de un tamaño relativamente grande, desde $250\ \mu\text{m}$ hasta algunos milímetros de diámetro [63, 67]. La extrusión es utilizada en los procesos de producción de bebidas instantáneas, confitería, té, debido a que permite encapsular adecuadamente sabores volátiles e inestables, ya que proporciona estabilidad frente a la oxidación [63].

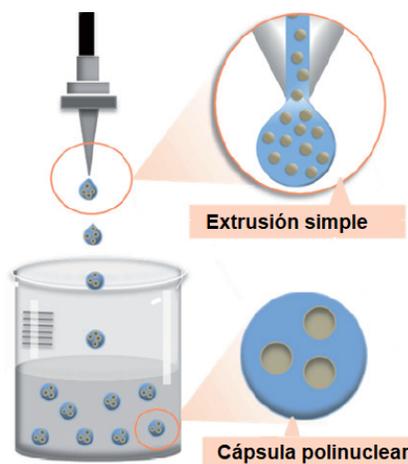


Figura 3.10: Representación del proceso de encapsulación por extrusión (adaptación de Martin et al.,2017) [94].

3.3.8. Electrohilado

Consiste en generar una solución o dispersión, del ingrediente activo con el material pared, que es atomizada mediante la aplicación de un alto voltaje, donde el campo eléctrico estira la solución polimérica, formando fibras con alta superficie específica, como se muestra en la Figura 3.11 [64] [95]. El alto voltaje puede ser aplicado a las gotas de solución en la punta del capilar, como también a una distancia específica del mismo. Lo anterior, genera que las cargas eléctricas produzcan una fuerza electrostática en la solución, deformándola en lo que se conoce como cono de Taylor, donde al superar la tensión superficial se expulsan gotas más pequeñas que se aceleran hacia el colector conectado a tierra, además, de manera simultánea, ocurre la evaporación del solvente [96, 97]. La versatilidad de la técnica de electrohilado se debe a que el tamaño de las gotas puede ser inferior a $1 \mu\text{m}$, las partículas producidas son de tamaño casi uniforme, con ausencia de coagulación y por ende menor aglomeración [96].

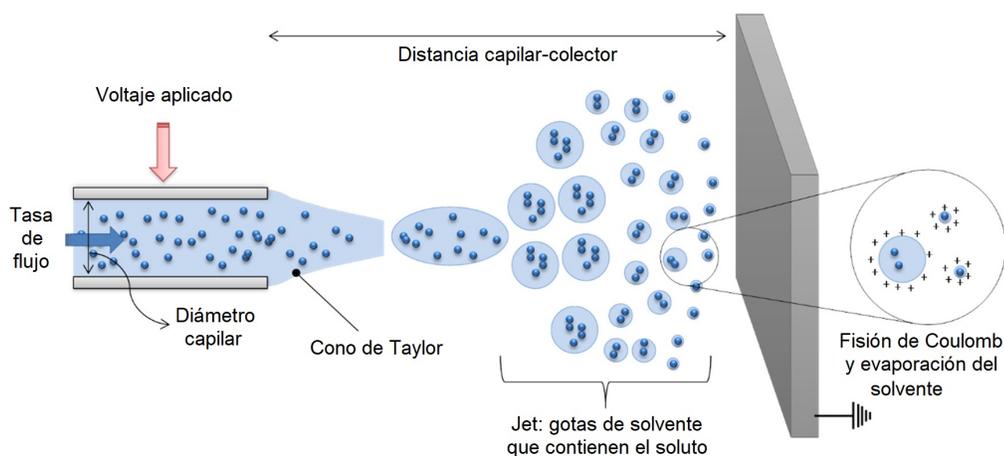


Figura 3.11: Diagrama del proceso de encapsulación por electrohilado (adaptación de Rodríguez-Tobías et al., 2019) [96].

Corresponde a una técnica simple, flexible y asequible, que da como resultado nanofibras con una alta eficiencia de encapsulación y una alta relación superficie/volumen; además, per-

mite liberar de manera controlada o sostenida el ingrediente activo [98]. Debido a que es un proceso que se realiza a temperatura ambiente, no requiere el uso de solventes orgánicos tóxicos, proporciona alta estabilidad térmica, a la luz y al almacenamiento, es un proceso adecuado para encapsular compuestos activos que sean termosensibles, como aceites esenciales, enzimas y moléculas bioactivas [95, 98, 99]. Debido a lo anterior, el electrohilado se ha utilizado en el desarrollo de envases activos multicapa, ingeniería de tejidos, vendajes para heridas, empaques activos, filtración de agua, electrodos de nanofibras para biosensores y supercondensadores, en administración de fármacos y envasado [95, 98, 99].

Debido a la versatilidad del electrohilado, este es un método ampliamente utilizado en la industria farmacéutica. Un ejemplo de esto es la encapsulación de *Escherichia coli* en fibras híbridas de acetato de celulosa (CA) y alcohol polivinílico (PVA), consiguiendo que CA mejore la estabilidad bacteriana en condiciones gástricas y PVA proteja a la bacteria en el proceso de electrohilado, mejorando considerablemente la viabilidad del organismo en condiciones gastrointestinales [100].

En función de las ventajas que provee el electrohilado, se ha podido encapsular esporas de hongos, en particular, esporas de *T. viride* en esteras de quitosano [97]. Por lo anterior, es importante considerar que la implementación de esta metodología requiere el uso de equipos especializados con alta demanda, el que es posible encontrar en la FCFM [87]. Además, existe la posibilidad de colaborar con laboratorios de otras universidades, teniendo como referencia la Universidad de la Frontera y la Universidad de Santiago [78, 86]. Lo anterior es de gran relevancia, ya que incorpora el electrohilado como una alternativa a evaluar para cumplir con el objetivo del presente trabajo.

Capítulo 4

Metodología de trabajo

En la primera parte de esta memoria, se desarrolló una recopilación de antecedentes preliminares, relativos a la encapsulación microscópica. Además, se compiló información atinente a *Trichoderma reesei*, poniendo especial énfasis en las características propias de este que puedan contribuir en el desarrollo de la estructura de encapsulamiento y de sus requerimientos de supervivencia. Asimismo, se recopiló información relativa a distintos polímeros que puedan ser utilizados para encapsular la espora, por medio de distintos métodos de encapsulación que existen en la actualidad, considerando trabajos previos encontrados en bibliografía.

Por otro lado, en conjunto con la búsqueda y el estudio bibliográfico, se gestionó y coordinaron diversas entrevistas con científicos expertos relacionados a la encapsulación, los que forman una parte primordial del trabajo de memoria de título, ya que en base a su experiencia y conocimientos en el rubro, aconsejan a la memorista a acotar la búsqueda, permitiendo conocer procesos que sean viables en el microorganismo de interés, según el tamaño de la espora y su disponibilidad de equipamiento en el país. En la Tabla 4.1 se presenta en detalle a cada uno de los profesionales entrevistados a lo largo de la realización de la presente memoria.

De forma simultánea al trabajo ya mencionado, se desarrolló un análisis y discusión de los antecedentes recopilados, teniendo en cuenta los consejos recibidos por los expertos consultados, determinando así la posibilidad de adaptar diferentes procedimientos, considerando las propiedades de la espora de *T. reesei*. En la Figura 4.1 se presenta un diagrama de flujo de la metodología antes descrita.

Finalmente, con el fin de evaluar paulatinamente el trabajo realizado y encaminar adecuadamente la investigación, se desarrollaron presentaciones de avance a la Profesora Guía del proyecto. A su vez, la autora de la memoria desarrolló el presente manuscrito, del que se entregaron versiones preliminares, para su respectiva corrección.

Nombre	Intitución	Especialidad
Cristian Tapia Villanueva	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química.	Biopolímeros, sus propiedades funcionales/tecnológicas, modificación de biopolímeros, polímeros sintéticos y su aplicación industrial. Proteínas de alimentos y películas comestibles.
Mariela Bustamante López	Universidad de La Frontera, Scientific and Technological Bio-resource Nucleus (BIOREN).	Ingeniería, biotecnología, microencapsulación, procesamiento y tecnología de alimentos
Franck Jean Christophe Quero	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales.	Preparación y caracterización de materiales basados en nanocelulosa para aplicaciones biomédicas, cosméticas y alimentarias.
Silvia Matiacevich	Universidad de Santiago de Chile, Facultad Tecnológica, Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Laboratorio de Investigación en Propiedades de los Alimentos (INPROAL).	Encapsulación de compuestos naturales para el desarrollo de aditivos antioxidantes, antimicrobianos y recubrimientos comestibles, con el fin de aumentar la vida útil de los alimentos.
Marcos Díaz Quezada	Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Departamento de Ingeniería Eléctrica, Laboratorio de Exploración Espacial y Planetaria (LEEP).	Instrumentación astronómica, física de dispositivos, instrumentación para física espacial y radioastronomía, física del plasma, electromagnetismo aplicado y tecnología de satélites pequeños.

Tabla 4.1: Científicos expertos entrevistados, institución donde desarrollan funciones y sus respectivas áreas de conocimiento.

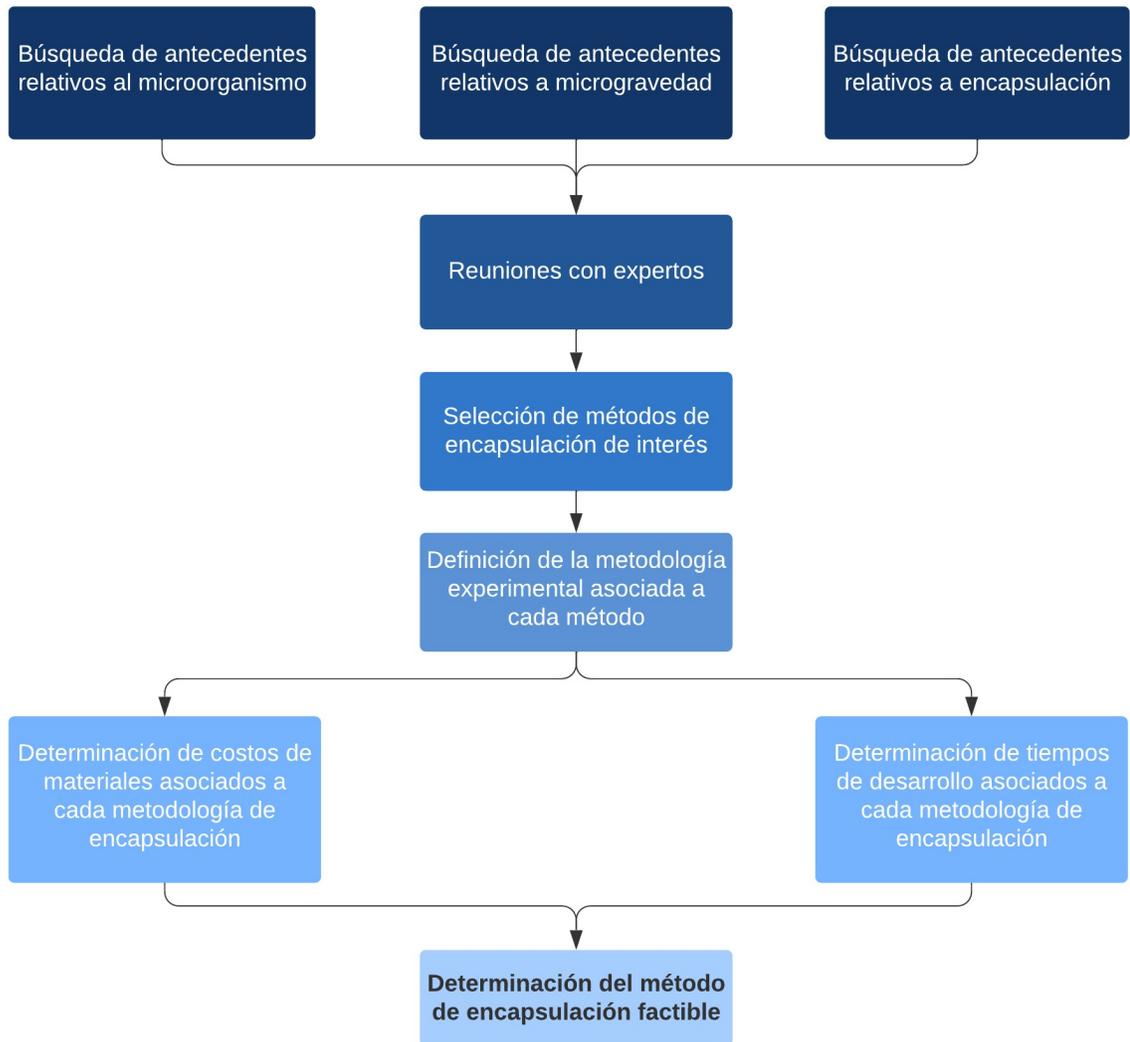


Figura 4.1: Diagrama de flujo de la metodología seguida en el presente trabajo.

Capítulo 5

Evaluación de factibilidad

A continuación, se analiza la factibilidad de las técnicas de encapsulación: gelificación iónica, secado por aspersión, montaje LbL y electrohilado, para ser aplicadas en esporas del microorganismo *T. reesei*, las que previamente se han identificado como alternativas a evaluar. La viabilidad de estas metodologías se determina en base a una revisión bibliográfica, por medio de un análisis de similitud entre la cepa encapsulada en bibliografía con *T. reesei* y la semejanza de la función que cumplen los componentes de la cápsula para cada especie. De esta manera, se evalúa la posibilidad de replicar dicha metodología de encapsulamiento, determinando los principales agentes para dicha encapsulación.

5.1. Gelificación iónica

5.1.1. *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma reesei*

En cuanto a la encapsulación vía gelificación iónica de esporas de hongo, la metodología de interés describe la encapsulación de *T. asperellum* en perlas de alginato de calcio. Con el fin de replicar la metodología de encapsulación vía gelificación iónica en *T. reesei*, es que se evalúan las semejanzas y diferencias principales entre *T. asperellum* y *T. reesei*. Por lo anterior, se considera como antecedente que ambas especies pertenecen al género *Trichoderma*, correspondiente a hongos filamentosos, por lo que comparten la misma clasificación taxonómica, diferenciándose únicamente en la especie [101].

En cuanto a *T. asperellum*, es un organismo que se puede aislar del suelo, raíces y tejidos de plantas, biomasa fúngica y madera; destaca por su capacidad de degradación de celulosa, característica que potencia su uso en el área de biocontrol, al igual que *T. reesei*, debido al control que ejerce sobre diversas especies patógenas [102]. Sin embargo, *T. asperellum* se distingue de *T. reesei* por mostrar un crecimiento más robusto de micelio y por tener una capacidad productiva de esporas superior, tal como se puede evidenciar en la Figura 5.1 [102].

Por otro lado, al realizar cultivos líquidos y rescatar el licor de fermentación, motivado por la coloración amarilla del cultivo de *T. reesei* que se puede apreciar en la Figura 5.1, se

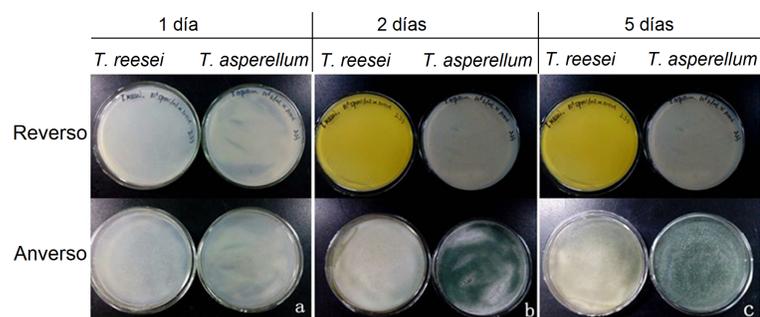
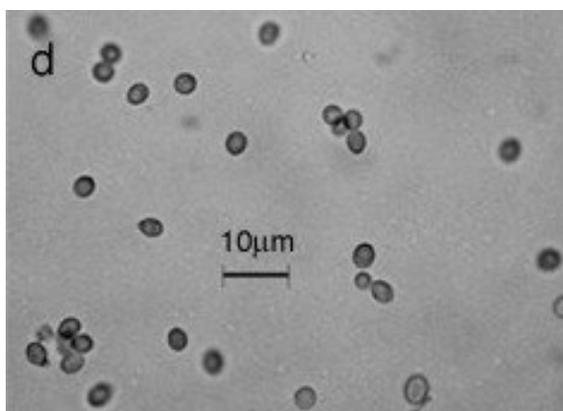


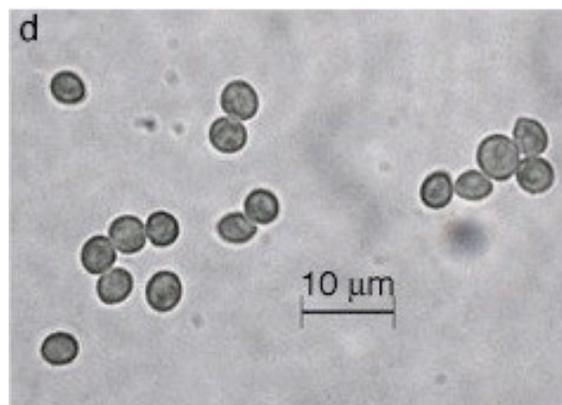
Figura 5.1: Fotografía de cultivos en placas de Petri de los organismos *T. reesei* y *T. asperellum* (adaptación de Wang et al., 2015) [102].

estudia el pH y se determina que en el proceso de crecimiento celular de *T. reesei* el pH es de aproximadamente 4,8 y que para *T. asperellum* es de 6,2 [102]. Sin embargo, se constata que *T. asperellum* proporciona una mejor tolerancia a las variaciones de pH [102]. Se tiene así, que los cambios de pH en *T. reesei* pueden afectar la producción de enzimas capaces de degradar la celulosa, por lo que corresponde a un parámetro importante a controlar, de tal manera que se adapte al metabolismo del microorganismo.

Por otro lado, se ha demostrado que la producción de enzimas celulolíticas de *T. asperellum* incrementa drásticamente al comienzo del cultivo, en comparación a *T. reesei* [103]. A pesar de que *T. asperellum* cuente con una mayor capacidad de degradación de celulosa en una fase inicial, al pasar el tiempo, *T. reesei* provee una mayor actividad enzimática de la celulasa [103]. Concluyendo, así, que *T. asperellum* produce una secreción más rápida de enzimas celulolíticas, pero estas tienen una persistencia menor, por lo que en periodos de tiempo más largos *T. reesei* provee una mejor degradación de celulosa, debido a su actividad enzimática mayor y una mejor persistencia de estas [102, 104].



(a) *T. reesei*, cuyo diámetro promedio de esporas es de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$.



(b) *T. asperellum*, cuyo diámetro promedio de esporas es de $3,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$.

Figura 5.2: Microscopía óptica de esporas, obtenidas al cultivar el microorganismo en medio agar papa dextrosa por 14 días a 25 °C [31].

Finalmente, utilizando *Plotdigitizer*, herramienta online de extracción de datos de imágenes [105], se determina el diámetro promedio de espora de las especies de interés, en base a ambas partes de la Figura 5.2, que muestra esporas de ambas especies obtenidas en un estudio

relacionado con la diversidad de *Trichoderma* [31]. Se determinó que el diámetro promedio de las esporas de *T. reesei* tiene un valor aproximado de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ y que en el caso de *T. asperellum* tiene un valor aproximado de $3,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$. En el Anexo C se presenta el detalle de la metodología empleada en el cálculo.

5.1.2. Componentes de la cápsula

Alginato de calcio

En cuanto al organismo *T. asperellum*, no hay información bibliográfica específica que permita respaldar si llega a interactuar de alguna manera la espora del hongo con el alginato de calcio. Sin embargo, es importante considerar, que para estudiar adecuadamente la viabilidad de las esporas del organismo posterior a la encapsulación, primero se deben liberar las esporas del recubrimiento de alginato de calcio, para conseguir esto se deben sumergir las perlas en una solución de citrato de sodio al 1 %p/v, el que se ha comprobado que es capaz de reaccionar con el alginato de calcio [76, 106, 107]. Por lo anterior, es de esperar que las esporas no sean capaces de degradar el alginato de calcio, por lo que se requiere un estímulo externo para destruir la cápsula.

Con respecto a *T. reesei*, se ha demostrado que la cepa QM9414 no es capaz de degradar el alginato de calcio [77]. Sin embargo, es de utilidad considerar la transparencia de la cápsula y el hecho de que al depositar la perla de alginato de calcio en un medio de cultivo líquido apropiado, se desencadena la germinación del microorganismo [77]. Por lo anterior, esta metodología provee la ventaja para realizar estudios de crecimiento del organismo dentro de las perlas y facilita la visualización de manera segura y acotada del crecimiento del organismo.

Considerando todo lo descrito, se puede mencionar que las esporas de ambos organismos son altamente semejantes y que el componente de la cápsula debería cumplir una función bastante semejante en presencia de ambos organismos.

Por lo anterior, la metodología para encapsulación de esporas de *T. asperellum* vía gelificación iónica podría ser compatible en la encapsulación de esporas de *T. reesei*.

5.2. Montaje capa por capa (LbL)

En cuanto a la encapsulación por montaje LbL de esporas de hongo, la metodología de interés describe la encapsulación de esporas de *T. reesei* en capas intercaladas de lignina y lignosulfonato. Debido a que la metodología se basa en el mismo organismo de interés, no se realiza una comparación entre organismos. Se espera, por lo anterior, que la replicación de la técnica presentada en bibliografía sea adecuada, la que se detalla más adelante.

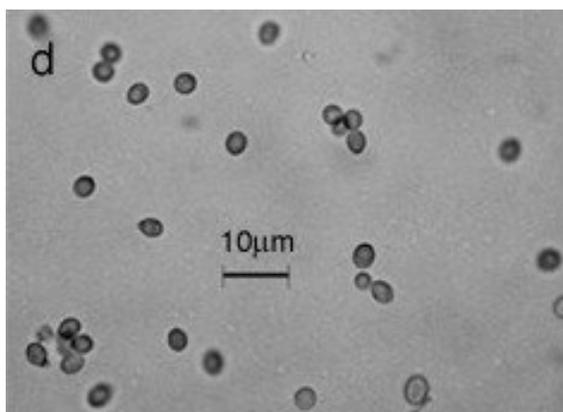
5.3. Secado por aspersión

5.3.1. *Beauveria bassiana* y *Trichoderma reesei*

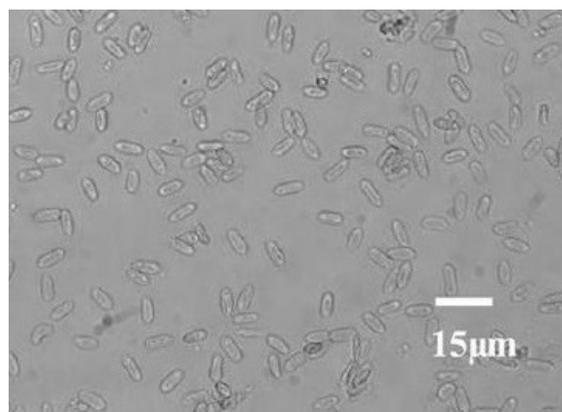
En cuanto a la encapsulación vía secado por aspersión de esporas de hongo, la metodología de interés describe la encapsulación de *B. bassiana* en cápsulas compuestas de dextrina, hidroxipropilmetilcelulosa, leche descremada y quitosano. Con el fin de replicar la metodología de encapsulación vía secado por aspersión en *T. reesei*, es que se evalúan las semejanzas y diferencias principales entre *B. bassiana* y *T. reesei*. Por lo anterior, se considera como antecedente que ambas especies comparten categorías taxonómicas hasta el nivel de orden, por lo que se asocia una relación considerable entre ambos organismos [101].

Beauveria bassiana es un hongo filamentoso entomopatógeno que se puede aislar del ambiente, suelo o agua, e incluso de cuerpos de insectos, ha sido capaz de infectar 200 especies de insectos y de causar la muerte de estos dentro de cinco a siete días [108, 109]. En cuanto a las fuentes de carbono y de nitrógeno más adecuadas para *B. bassiana*, estas corresponden a glucosa y el NaNO_3 , respectivamente [110]. En particular, se tiene evidencia que muestra la capacidad de este hongo de producir celulasa, lo que le proporciona la capacidad de degradar celulosa, lo que da paso, incluso, a utilizar este organismo para control biológico, de igual manera que *T. reesei* [111].

Por otro lado, se tiene que el tamaño de espора de *B. bassiana* depende de la cepa que se esté utilizando, pero es un valor que va desde los $1,95 \mu\text{m}$ a los $2,75 \mu\text{m}$ [112]. Además, considerando la aproximación de tamaño de espора de *T. reesei* desarrollada en el apartado comparativo anterior, se tiene un valor aproximado de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$, por lo que considerando el orden de magnitud, el tamaño de las esporas de ambos organismos son semejantes. La vista comparativa del tamaño de esporas se puede apreciar en la Figura 5.3.



(a) Microscopía óptica de esporas de *T. reesei*, obtenidas al cultivar el microorganismo en medio agar papa dextrosa por 14 días a 25°C , cuyo diámetro promedio de espора es de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ [31].



(b) Micrografía óptica de esporas de *B. bassiana*, cuyo diámetro puede ir desde los $1,95 \mu\text{m}$ a los $2,75 \mu\text{m}$ [85, 112].

Figura 5.3: Vista comparativa del tamaño de espора.

5.3.2. Componentes de la cápsula

Dextrina

El organismo *Beauveria bassiana* es generalmente capaz de asimilar como carbohidrato la dextrina, sin embargo, esto no ocurre en todos los casos, ya que depende del aislado que se utilice y el origen del mismo [113]. Por otro lado, es importante considerar, que para estudiar adecuadamente la viabilidad de las esporas del organismo posterior a la encapsulación, primero se deben liberar las esporas del recubrimiento compuesto, para conseguir esto se deben sumergir las cápsulas en agua y que dentro de un periodo de 5 a 10 minutos las esporas se liberaran al medio [85]. Lo anterior, da pie a pensar que la elección de los elementos que componen la cápsula vela por que el mismo organismo lleve a cabo la destrucción de la pared y la liberación de la espora.

La cepa nativa QM6a de *T. reesei*, es capaz de asimilar como fuente de carbono de manera relativamente eficiente la dextrina, de tal manera que se ha demostrado que permite un buen crecimiento del organismo [114]. Por lo anterior, y pensando exclusivamente en este componente de la cápsula, se esperaría que se obtenga una encapsulación semejante entre ambos organismos, posibilitando, además, una destrucción de la pared por parte de *T. reesei* al ser hidratada.

Leche descremada

Se elige añadir leche descremada a la composición de la cápsula debido a que otorga estabilidad a la pared [83]. La leche descremada se compone principalmente de lactosa, correspondiente a un disacárido compuesto de unidades de glucosa y galactosa [115]. En particular, se ha detectado que en ciertas oportunidades el organismo *Beauveria bassiana* es capaz de asimilar como carbohidrato la lactosa, pero esto no ocurre comúnmente, depende del aislado del organismo que se utilice y el origen del mismo [113]. Como ya fue mencionado en el apartado referente al uso de dextrina, para liberar las esporas del recubrimiento compuesto se deben sumergir las cápsulas en agua y que dentro de un periodo de 5 a 10 minutos las esporas se liberan al medio [85]. Lo anterior, refuerza la idea de que la elección de los elementos que componen la cápsula vela por que el mismo organismo lleve a cabo la destrucción de la pared y la liberación de la espora.

En cuanto a *T. reesei*, tal como se mencionó en el Capítulo 2, se tiene que la cepa original QM6a presenta una adecuada asimilación de lactosa como fuente de carbono, permitiéndole proveer una buena actividad de celulasa [35]. Por lo anterior, y pensando exclusivamente en este componente de la cápsula, se esperaría que se obtenga una encapsulación semejante entre ambos organismos, posibilitando, además, una destrucción de la pared por parte de *T. reesei* al ser hidratada.

Quitosano

La adición de quitosano a la composición de la cápsula se debe a que aumenta la eficiencia de atrapamiento de las esporas [83]. Se ha demostrado que *Beauveria bassiana* es capaz de degradar quitosano, tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas; sin embargo, no destaca por ser una fuente de nutrientes óptima para este organismo, debido a que no permite que *B. bassiana* se desarrolle a su máxima capacidad [116].

En cuanto a *T. reesei*, se ha identificado que existen cepas que secretan enzimas quitosanolíticas [17]. Sin embargo, no existe evidencias generales respecto al organismo, por lo que no se puede asociar esta característica a todas las cepas. Por lo anterior, se espera que la función que cumple este componente en la encapsulación de *B. bassiana* sea relativamente semejante al replicar la encapsulación en *T. reesei*, dando paso a creer que el organismo puede ser capaz de degradar por si mismo la cápsula.

Por todo lo anterior, se puede mencionar que las esporas de ambos organismos son semejantes y que los componentes de la cápsula cumplen una función similar en presencia de ambos organismos.

Con esto, la metodología para encapsulación de esporas de *Beauveria bassiana* vía secado por aspersión podría ser compatible en la encapsulación de esporas de *T. reesei*.

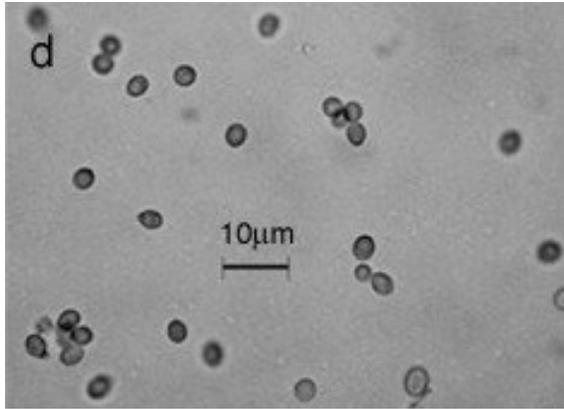
5.4. Electrohilado

5.4.1. *Trichoderma viride* y *Trichoderma reesei*

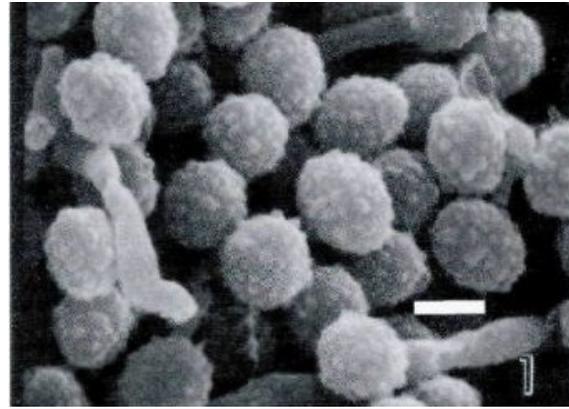
En cuanto a la encapsulación vía electrohilado de esporas de hongo, la metodología de interés describe la encapsulación de *T. viride* en fibras de quitosano y poliacrilamida. Con el fin de replicar la metodología de encapsulación vía electrohilado en *T. reesei*, es que se evalúan las semejanzas y diferencias principales entre *T. viride* y *T. reesei*. Por lo anterior, se considera como antecedente que ambas especies pertenecen al género *Trichoderma*, correspondiente a hongos filamentosos, por lo que comparten la misma clasificación taxonómica, diferenciándose únicamente en la especie [101].

Como ya se ha mencionado, *T. viride* y *T. reesei* son hongos filamentosos, ambos obtienen nutrientes desde materia orgánica en descomposición y son reconocidos por ser capaces de degradar la pared celular vegetal al producir enzimas que degradan los compuestos de la pared celular vegetal, como lo es la celulasa [117, 118, 119]. En relación a esto último, considerando que son organismos productores de celulasas, *T. reesei* y *T. viride* destacan como buenos organismos generadores de enzimas endoglucanasas y exoglucanasas [120]. Al considerar los ácidos húmicos, correspondientes a sustancias orgánicas que coagulan cuando se acidifica el extracto de base fuerte, se ha demostrado que *T. reesei* es capaz de generar 3 veces más ácidos húmicos que *T. viride* [121, 122].

Por otro lado, según bibliografía se tiene que la longitud de las espore de *T. viride* va



(a) Microscopía óptica de esporas de *T. reesei*, obtenidas al cultivar el microorganismo en medio agar papa dextrosa por 14 días a 25 °C, cuyo diámetro promedio de espora es de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$ [31].



(b) Imagen SEM de esporas del espécimen lectotipo de *T. viride*, barra de escala: $2,5 \mu\text{m}$, cuyo tamaño de espora está definido por una longitud que va desde los $3,0 \mu\text{m}$ a los $4,5 \mu\text{m}$ y el ancho va desde los $2,0 \mu\text{m}$ a los $4,0 \mu\text{m}$ [123, 124].

Figura 5.4: Esporas de las especies de interés.

desde los $3,0 \mu\text{m}$ a los $4,5 \mu\text{m}$ y que el ancho va de los $2,0 \mu\text{m}$ a los $4,0 \mu\text{m}$ [124]. Además, considerando la aproximación de tamaño de espora de *T. reesei* desarrollada en la Sección 5.1, se tiene un valor aproximado de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{m}$, también es posible apreciar el tamaño de las esporas haciendo uso de la Figura 5.4. Así, en cuanto a orden de magnitud, se tiene que el tamaño de las esporas de ambos organismos es bastante semejante.

5.4.2. Componentes de la cápsula

Quitosano

En cuanto a *T. reesei*, se ha identificado que la cepa PC3-7 secreta enzimas quitosanólíticas [17]. Sin embargo, no existe evidencias generales respecto al organismo, por lo que no se puede asociar esta característica a todas las cepas. A pesar de lo anterior, se han aislado y caracterizado celulasas quitosanólíticas eficaces de *T. viride* y *T. reesei* (donde no se especifican las cepas respectivas), las que han mostrado una buena capacidad para descomponer quitosano, destacando mayormente *T. reesei* [125]. Por lo anterior, se espera que la función que cumple este componente en la encapsulación de *T. viride* sea bastante semejante al replicar la encapsulación en *T. reesei*, dando paso a creer que el organismo puede ser capaz de degradar por si mismo la cápsula.

Considerando todo lo descrito, se puede mencionar que las esporas de ambos organismos son altamente semejantes y que el componente de las fibras cumple la misma función en presencia de ambos organismos.

Por lo anterior, la metodología para encapsulación de esporas de *T. viride* vía electrohilado podría ser compatible en la encapsulación de esporas de *T. reesei*.

Capítulo 6

Metodologías de encapsulación propuestas

A continuación, se presentan los materiales y la metodología para realizar cada una de las técnicas de encapsulación factibles. Sin embargo, es importante considerar que, para llevar a cabo cada una de estas técnicas, es imprescindible contar con esporas de *T. reesei*. Por lo anterior, primero se detalla el procedimiento a realizar para cultivar y recolectar las esporas del microorganismo de interés.

6.1. Crecimiento de *T. reesei* y recolección de esporas

Para el crecimiento de *T. reesei* se inoculan entre $1 \cdot 10^6$ a $1 \cdot 10^7$ esporas del hongo por placa, en formato de polvo seco, en un medio de cultivo apropiado, siendo recomendable agar papa dextrosa, a una temperatura de 30 °C; se debe procurar que la placa de Petri se cubra completamente con micelio productor de esporas, lo que se produce en un periodo de tiempo típico de 1 semana [38, 39, 40, 41, 42]. Se añaden 10 mL de agua estéril en la placa y, utilizando un esparcidor, se dispersan las esporas en la fase líquida [38, 39]. Luego, usando el filtro Miracloth, se procede a filtrar la dispersión de esporas, recogiendo el filtrado [38]. Utilizando una cámara de recuento de Neubauer se determina la concentración de esporas en la dispersión [38, 39]. Posteriormente, se centrifuga la dispersión a 5000 rpm, se elimina el sobrenadante y se almacenan las esporas a 4 °C [38].

6.2. Propuesta de encapsulación vía gelificación iónica

6.2.1. Materiales

- Alginato de sodio (M_w de 80 a 120 kDa) [126]
- Cloruro de calcio

- Agua destilada
- Esporas de *Trichoderma reesei*

6.2.2. Instrumentos

- Agitador magnético
- Barra magnética
- Bomba peristáltica o dispositivo microencapsulador similar a Cellena
- Tamiz
- Microscopio electrónico de barrido

6.2.3. Encapsulación de esporas por gelificación iónica

Primero se preparan 250 mL de una suspensión fúngica con una concentración de esporas de $1 \cdot 10^9$ esporas/mL. Por otro lado, en un volumen de 600 mL de agua destilada estéril, a una temperatura de 40 °C, se agitan 20 g de de una solución de alginato de sodio 2% p/v a 400 rpm. Cuando la solución de alginato alcanza la temperatura ambiente, se añade la suspensión fúngica, luego, se añade agua destilada hasta completar 1000 mL de solución que debe ser homogeneizada vía agitación magnética a 400 rpm [74, 76, 77].

En una bomba peristáltica se corre un caudal de 861,7 mL/min de una suspensión de esporas en solución de alginato, la que encuentra salida por cuatro agujas estériles sobre 1 L de solución de cloruro de calcio 0,2 M con agitación constante a temperatura ambiente [76]. Lo anterior, permite formar perlas de un diámetro aproximado de 2,5 mm, las que son relativamente blandas y que para ser recuperadas deben ser tamizadas, utilizando un tamiz de prueba fino con tamaño de poro 2,36 mm [76, 77]. Una alternativa a la bomba peristáltica es el uso de un dispositivo microencapsulador Cellena (Ingeniatrics), el que permite ser ajustado y obtener perlas de alginato de calcio de un tamaño de 400 μm , que para ser recuperadas deben ser tamizadas, utilizando un tamiz de prueba fino con tamaño de poro de 300 μm [77].

A continuación, para endurecer las perlas, estas se almacenan a 4 °C por 2 horas [76, 77]. Luego, con el fin de eliminar excesos de cloruro de calcio de las perlas, deben ser lavadas con agua destilada utilizando un tamiz, cuya luz de malla ya ha sido mencionada y depende del equipo utilizado para llevar a cabo la gelificación [76, 77].

Para verificar la morfología y la correcta encapsulación de las esporas de *T. reesei* en perlas de alginato de calcio, la muestra debe ser liofilizada, recubiertas con oro y, posteriormente, observada con un microscopio electrónico de barrido a un voltaje acelerado de 15 kV [76].

6.3. Propuesta de encapsulación vía montaje LbL

6.3.1. Materiales

- Cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTAC)
- Lignina Kraft
- Hidróxido de sodio
- Ácido sulfúrico
- Ligninsulfonato de sodio
- Agua destilada
- Esporas *Trichoderma reesei*

6.3.2. Instrumentos y técnicas de caracterización

- Micropipeta
- Tubos con cierre seguro
- Tubos de centrifuga
- Filtros Miracloth
- Microcentrífuga
- Agitador de vórtice a 2000 rpm
- Microscopio electrónico
- Analizador de potencial zeta dedicado
- Equipo de ultrasonicación

6.3.3. Síntesis de lignina catiónica Kraft

Para comenzar, se deben esterilizar en autoclave las soluciones y los elementos a utilizar por un periodo de 40 minutos a 121°C [38]. Primero, se determina el contenido de grupos OH en la lignina Kraft utilizada, por medio de una técnica de derivatización con derivados de 1,3,2-dioxafosfolanilo y ^{31}P RMN¹ [38]. Según la cantidad encontrada y por medio de un cálculo estequiométrico, considerando que la relación molar de 1:2 entre grupos OH y cloruro de glicidiltrimetilamonio (GTAC), considerando que se mezcla primeramente la lignina Kraft con NaOH 2M, se define la cantidad de GTAC a utilizar, la solución se calienta continuamente a 70 °C y se agita a 100 rpm durante 1 hora [38]. La solución se neutraliza con ácido sulfúrico al 10 % p/p, donde se forma un precipitado café [38]. La mezcla de reacción se dializa en

¹Correspondiente a una resonancia magnética nuclear de fósforo-31.

agua destilada durante 3 días, cambiando el agua dos veces al día [38]. La solución dializada contiene una parte soluble y otra insoluble en agua, donde la parte soluble en agua corresponde a la lignina catiónica. Para extraer la lignina catiónica, el producto se lava tres veces en 300 mL de agua destilada hasta que el sobrenadante de la centrifugación no sea marrón. A continuación, se evapora el agua de la solución que contenía lignina catiónica, secándola en un horno a 105°C durante 12 horas o hasta obtener 10 mL de solución concentrada de lignina catiónica [127]. Finalmente, se liofiliza para obtener el producto soluble en agua deseado [38].

6.3.4. Encapsulación LbL de esporas de *T. reesei*

Se preparan 50 mL de las soluciones polielectrolíticas, cada una con una concentración de 0,2% p/p [38]. La solución aniónica se prepara con ligninsulfonato de sodio y con agua como disolvente; por otro lado, la solución catiónica se prepara con lignina catiónica y con agua como disolvente [38]. Luego ambas soluciones de polielectrolitos son esterilizadas en autoclave por un periodo de 40 minutos a 121°C [38]. Se dispersan las esporas en agua estéril, considerando mantener una concentración aproximada de $45 \cdot 10^6$ esporas/mL [38]. Se centrifuga 1 mL de esta dispersión por 3 minutos a 5.000 rpm y a continuación se elimina el sobrenadante, teniendo la precaución de reducir la pérdida de esporas [38]. Después, se añade 0,5 mL de agua estéril, se agita por 30 segundos con vórtice y se aplica un baño ultrasónico de 3 minutos, con la finalidad de acelerar la disolución [38]. Posteriormente, se añade 0,5 mL de la solución policatómica y la solución se agita con vórtice por 5 segundos [38]. Luego, con el fin de que el polímero se adsorba a la superficie de las espore, se deja reposar la solución por 15 minutos sin agitación. Ya transcurrido este tiempo, se repite el ciclo de centrifugación y redispersión de esporas [38]. A continuación, se añade 0,5 mL de la solución polianiónica y se incuba por 15 minutos [38]. Según la cantidad de capas de polielectrolitos que se deseen obtener, se repite el procedimiento antes detallado. Se realiza una medición de potencial zeta al finalizar cada redispersión en agua estéril, con la finalidad de corroborar la correcta adsorción de los polielectrolitos por la determinación de diferencia de potencial, además, permite verificar la estabilidad de las dispersiones de esporas intermedias a lo largo del proceso [38].

6.4. Propuesta de encapsulación vía secado por aspersión

6.4.1. Materiales

- Agua destilada
- Dextrina
- Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)
- Leche descremada
- Quitosano de bajo peso molecular [128]

6.4.2. Instrumentos y técnicas de caracterización

- Secador por pulverización de baja temperatura
- Microscopio electrónico de barrido

6.4.3. Preparación de cápsulas mediante secado por aspersión

Para preparar la cápsula, en primera instancia, se preparan 90 mL de una solución compuesta de dextrina (10 % p/v), HPMC (0,03 % p/v), leche descremada (10 % p/v) y quitosano (0,5 % p/v) [85]. Posteriormente, a esta solución compuesta se añaden 10 mL de una suspensión de esporas de *T. reesei* de una concentración de $2,5 \cdot 10^6$ esporas/mL [85]. Luego, se configura el equipo de secado por aspersión para que opere a una temperatura de entrada de 60 °C, una temperatura de salida de 30 °C, un flujo de alimentación de solución de 0,21 L/h; y una presión de aire de 7,5 kg/cm². Es importante considerar que se debe mantener una agitación constante de la dispersión de esporas durante el proceso, lo que es proporcionado directamente por el equipo de secado por aspersión, debido a las revoluciones a las que gira el atomizador, comúnmente correspondiente a 40.000 rpm para un equipo con capacidad para 10 L [85].

Para verificar la morfología de las microcápsulas y la correcta encapsulación de las esporas de *T. reesei*, estas deben ser observadas con un microscopio electrónico de barrido [85]. Para llevar a cabo esta observación, se propone primero recoger muestras por centrifugación a $3000 \times g$ que sean fijadas con glutaraldehído al 2,5 % v/v en buffer de cacodilato de sodio 0,2 M (pH 7,2), luego, se fijan las muestras durante 2 horas con tetróxido de osmio al 1 % p/v en tampón de cacodilato de sodio 0,2 M (pH 7,2) [85]. Posteriormente, las muestras se deshidratan con una serie de lavados con acetona y se secan por medio de un secado en punto crítico (CPD) [85]. Después, las muestras son recubiertas con oro y se registran las imágenes fotográficas utilizando el microscopio electrónico de barrido a un voltaje acelerado de 15 kV [85].

6.5. Propuesta de encapsulación vía electrohilado

6.5.1. Materiales

- Agua destilada
- Quitosano de bajo peso molecular
- Acrilamida
- Persulfato de potasio
- Nitrógeno
- Ácido acético
- Esporas de *Trichoderma reesei*

6.5.2. Instrumentos y técnicas de caracterización

- Viscosímetro tipo Ubbelohde
- Agitador magnético
- Barra magnética
- Equipo de electrospinning
- Microscopio electrónico de barrido

6.5.3. Preparación de poliacrilamida

Se requiere preparar poliacrilamida (PAAm) para utilizarla en el proceso de elaboración de la solución a electrohilar [97]. El procedimiento se basa en la polimerización de una solución al 8% de acrilamida (AAM) utilizando persulfato de potasio, compuesto del que se debe añadir 2 g por litro de solución de acrilamida que se desee polimerizar [97].

Para verificar la correcta producción de PAAm se determina el peso molecular promedio de viscosidad, el que se espera alcance el valor de 670.000 g/mol [97]. La viscosidad intrínseca se determina usando un viscosímetro capilar Ubbelohde sumergido en agua destilada a 25 °C. Se correlaciona la viscosidad intrínseca de la solución $[\eta]$ con el peso molecular M_w empleando la ecuación de Mark-Howkink-Sakurada [97, 129, 130, 131]. Se consideran las constantes $\alpha=0,66$ y $K=6,8 \cdot 10^{-2}$; la expresión determinada por M-H-S se muestra en la Ecuación 6.1 [97].

$$[\eta] = K \cdot M_w^\alpha \quad (6.1)$$

6.6. Encapsulación de esporas

Primero se disuelve el quitosano en ácido acético 0,3 M, de manera paralela se disuelve el PAAm en agua destilada; luego, se mezclan ambas soluciones de tal manera que cada uno de los componentes alcance una concentración de 3% p/p [97]. A continuación, se toman 2 g de la solución compuesta y se añaden 0,2 g de esporas de hongo [97].

Se ajusta el equipo de electrohilado, de tal manera que la punta del inyector se ubique a 12 centímetros de distancia del colector recubierto con papel de aluminio; además, el voltaje que alcanza el equipo debe ser de 12 kV [97]. Se carga la solución compuesta en una jeringa metálica conectada a una bomba, por medio del uso de esta última se fija un caudal de solución de 0,7 mililitros por hora, a modo de referencia, ver la Figura 6.1 [97].

Para verificar la morfología de las esteras fibrosas electrohiladas y determinar la correcta incorporación de las esporas de *T. reesei* a estas, se deben observar mediante microscopía electrónica de barrido [97]. Considerando que el voltaje aplicado produce la evaporación del



(a) Vista del equipo Electroris de Fanavaran Nano-Meghyas [132].



(b) Vista del menú de inyección de flujo, del equipo Electroris de Fanavaran Nano-Meghyas [132].

Figura 6.1: Equipo de electrohilado, Electroris de Fanavaran Nano-Meghyas [132].

solvente, basta con que las esteras fibrosas sean recubiertas con oro y registrar las imágenes fotográficas utilizando el microscopio electrónico de barrido [97].

Capítulo 7

Comparación de costos

Con el fin de determinar cuál técnica es más adecuada de llevar a cabo, en la siguiente sección se presenta la estimación de los costos, en pesos chilenos o CLP, asociados al escalamiento de los materiales a utilizar para las cuatro metodologías viables, correspondientes a gelificación iónica, secado por aspersion, montaje LbL y electrohilado. Cabe recalcar, que el escalamiento se basa en una cantidad determinada de esporas, correspondiente a $2,39 \cdot 10^8$. Para estimar estos costos se hace uso de la página web de Easy, Jumbo y Sigma Aldrich [133].

7.1. Gelificación iónica

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de gelificación iónica se presenta en el Anexo D.1 y su respectivo escalamiento se encuentra en el Anexo E. En la Tabla E.1 se presenta el resumen de la masa determinada para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Proveedor	Código	Masa [g]	Valor [\$]
Esporas			0,03	
Agua destilada	Easy	1080812P	501,9	170
Alginato de sodio	Sigma-Aldrich	W201502	$3,8 \cdot 10^{-4}$	1
Cloruro de calcio	Sigma-Aldrich	C4901	0,02	14
Costo total				184

Tabla 7.1: Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología de gelificación iónica y los costos asociados.

7.2. Montaje LbL

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de montaje LbL se presenta en el Anexo D.2 y su respectivo escalamiento se

encuentra en el Anexo E. En la Tabla E.2 se presenta el resumen de la masa determinada para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Proveedor	Código	Masa [g]	Valor [\$]
Esporas			0,03	
Agua destilada	Easy	1080812P	10.554,1	3567
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich	258105	2,0	562
Lignosulfonato de sodio	Sigma-Aldrich	471038	0,5	386
Lignina alkali	Sigma-Aldrich	370959	1,0	1.460
Hidróxido de sodio	Sigma-Aldrich	655104	0,8	1.926
Cloruro de glicidiltrimetilamonio	Sigma-Aldrich	50053	2,6	5.069
Membrana de diálisis (14K MW-CO) 76 mm *	Sigma-Aldrich	D9402	20 [cm]	1.864
Costo total				14.833

Tabla 7.2: Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología LbL y los costos asociados.

7.3. Secado por aspersión

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de secado por aspersión se presenta en el Anexo D.3 y su respectivo escalamiento se encuentra en el Anexo E. En la Tabla E.3 se presenta el resumen de la masa determinada para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Proveedor	Código	Masa [g]	Valor [\$]
Esporas			0,03	
Agua destilada	Easy	1080812P	775,4	262
Dextrina	Sigma-Aldrich	D2006	86,1	7.748
Hidroxipropil metilcelulosa	Sigma-Aldrich	09963	0,3	727
Leche descremada	Colun	780292000 9865	86,1	527
Quitosano	Sigma-Aldrich	448869	4,3	8.574
Costo total				17.838

Tabla 7.3: Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología de secado por aspersión y los costos asociados.

7.4. Electrohilado

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de electrohilado se presenta en el Anexo D.4 y su respectivo escalamiento se encuentra en el Anexo E. En la Tabla E.4 se presenta el resumen de la masa determinada para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Proveedor	Código	Masa [g]	Valor [\$]
Esporas			0,03	
Acrilamida	Sigma-Aldrich	A3553	5,6	2.391
Persulfato de potasio	Sigma-Aldrich	216224	0,1	1.098
Agua destilada	Easy	1080812P	250,2	85
Quitosano	Sigma-Aldrich	448869	0,01	15
Ácido acético	Sigma-Aldrich	695092	$2,1 \cdot 10^{-3}$	1
Costo total				3.589

Tabla 7.4: Tabla resumen de la cantidad másica escalada necesaria de los materiales requeridos, para llevar a cabo la metodología de electrohilado y los costos asociados.

7.5. Comparación de las metodologías

En la Tabla 7.5 se detalla una comparación entre las cuatro técnicas estudiadas considerando: reactivos, materiales, equipos, tiempo estimado de implementación y el presupuesto necesario.

	Gelificación iónica	Montaje LbL	Secado por aspersión	Electrohilado
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> o Agua destilada o Alginato de sodio o Cloruro de calcio o Esporas de <i>Trichoderma reesei</i> 	<ul style="list-style-type: none"> o Agua destilada o Ligninsulfonato de sodio o Lignina Kraft o Hidróxido de sodio o Cloruro de glicidiltrimetilammonio o Ácido sulfúrico o Esporas de <i>Trichoderma reesei</i> 	<ul style="list-style-type: none"> o Agua destilada o Dextrina o Hidroxipropil metilcelulosa o Leche descremada o Quitosano de bajo peso molecular o Esporas de <i>Trichoderma reesei</i> 	<ul style="list-style-type: none"> o Agua destilada o Quitosano de bajo peso molecular o Acrilamida o Persulfato de potasio o Ácido acético o Esporas de <i>Trichoderma reesei</i>
Materiales		<ul style="list-style-type: none"> o Micropipeta o Tubos con cierre seguro o Tubos de centrifuga o Filtros Miracloth 		
Equipos	<ul style="list-style-type: none"> o Autoclave o Agitador o Bomba peristáltica o Liofilizador 	<ul style="list-style-type: none"> o Autoclave o Microcentrifuga o Agitador de vórtice o Analizador de potencial zeta o Ultrasonicator 	<ul style="list-style-type: none"> o Autoclave o Microscopio electrónico de barrido (SEM) o Secador por aspersión de baja temperatura 	<ul style="list-style-type: none"> o Autoclave o Agitador magnético o Electrospinning o Bomba de jeringa
Tiempo de desarrollo	8 días con 11 horas y 40 minutos.	14 días con 4 horas y 30 minutos.	8 días con 11 horas y 3 minutos.	8 días con 12 horas y 22 minutos.
Presupuesto	\$184	\$14.833	\$17.838	\$3.589

Tabla 7.5: Tabla comparativa de las metodologías propuestas.

Capítulo 8

Evaluación de viabilidad

8.1. Estudio de crecimiento

8.1.1. Liberación de esporas

Gelificación iónica

Para liberar las esporas, se prepara una solución de citrato de sodio al 1 % p/v, en la que se disuelve 1 g de perlas intactas sin liofilizar [76]. Luego, se realizan diluciones decimales en serie en solución salina de las muestras [76].

Montaje LbL

Para liberar las esporas, se debe tener en cuenta que el recubrimiento no se rompe fácilmente. Lo anterior, debido a que el estudio en el que se basa esta propuesta de encapsulación genera la rotura de la cápsula de lignina utilizando degradación enzimática a partir de filtrados de cultivos de patógenos de esca¹ [38]. En particular se recomienda el uso de los hongos *Phaeoconiella chlamydospora* y *Phaeoacremonium minimum*, los que segregan compuestos extracelulares, como la lacasa y peroxidasa, que permiten degradar la lignina [38, 136, 137], sin embargo, el uso de una u otra de estas especies depende de su disponibilidad.

Para obtener el filtrado de cultivo de la especie patógena que se tenga a disposición, primero se cultiva por 7 días el organismo en 1 litro de medio de cultivo líquido, con agua destilada como solvente y compuesto por extracto de levadura 0,004 %p/v, extracto de malta 0,01 %p/v y glucosa 0,01 %p/v; al transcurrir el tiempo, se filtra el caldo de cultivo y se almacena a 4°C [38].

Luego, por 48 horas y a una temperatura de 25°C se centrifuga (700 rpm) una mezcla de 25 mL del filtrado de cultivo patógeno con $5 \cdot 10^5$ esporas de *T. reesei* encapsuladas, donde

¹Correspondiente a una de las enfermedades más infecciosas del tronco de vid

el tubo de centrifuga se debe cubrir con un filtro Miracloth para permitir el intercambio de oxígeno y la minimización de la contaminación [38]. El proceso antes descrito permite romper la cápsula, además, produce que se inicie una leve germinación de *T. reesei* [38].

Secado por aspersión

La liberación de las esporas encapsuladas se consigue al depositar las cápsulas en agua destilada por un periodo de 5 a 10 minutos [83].

Electrohilado

Para conseguir la liberación de las esporas incorporadas en las fibras electrohiladas, basta con depositarlas en una placa de Petri que contenga un medio de cultivo sólido apropiado para el microorganismo [97].

8.1.2. Preparación del medio de cultivo

El medio de cultivo propuesto es agar papa dextrosa (PDA) a 28°C, el que se puede obtener de manera comercial o puede ser preparado [97, 138], sin embargo, es recomendable utilizar un producto que proporcione la certeza de que se contará con un adecuado funcionamiento. Se utiliza como referente el agar papa dextrosa en formato polvo (Sigma-Aldrich, 70139), donde se recomienda disolver 39 g del polvo en 1 L de agua destilada, luego, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos [133].

En los casos en que se obtiene una suspensión de esporas, con la finalidad de realizar la germinación, se dispersa 0,1 mL de la suspensión fúngica con una concentración de 10³ esporas/mL en la placa de Petri con PDA [38]. En el caso de las fibras electrohiladas, es importante verificar que se cuente con 100 esporas dentro de las esterillas, con la finalidad de realizar una comparación justa de los resultados obtenidos de la germinación de las muestras para todas las metodologías propuestas [97].

8.1.3. Porcentaje de germinación

Se considera que una espora ha germinado cuando la longitud de la hifa germinativa es mayor a la mitad del diámetro de cada espora [85]. Luego, se propone el uso de la Ecuación 8.1 para determinar cuantitativamente la germinación, expresada como porcentaje de la cantidad de esporas germinadas en relación a las esporas depositadas en el medio de cultivo [38].

$$G = \frac{N_G}{N_t} \cdot 100 \% \quad (8.1)$$

Donde:

- G: Germinación.
- N_G : Número de esporas germinadas.
- N_t : Número de esporas depositadas en el medio de cultivo.

Debido a que los métodos propuestos para determinar N_G y N_t conllevan ciertos errores de conteo, se propone determinar el error sobre el cálculo de la germinación ΔG , utilizando la propagación del error Gaussiano, tal como se muestra en la Ecuación 8.2 [38].

$$\Delta G = \pm \sqrt{\left(\frac{1}{N_t} \cdot \Delta N_G\right)^2 + \left(\frac{N_G}{N_t^2} \cdot \Delta N_t\right)^2} \cdot 100 \% \quad (8.2)$$

Donde:

- ΔG : Error de germinación.
- ΔN_G : Desviación estándar de la germinación.
- ΔN_t : Error de conteo asociado a la cámara de recuento de Neubauer, típicamente considerado 0,3.

8.1.4. Propuestas de estudio

Debido a que las esporas de *T. reesei* son capaces de germinar y crecer dentro de las perlas de alginato de calcio al estar en presencia de un medio de cultivo líquido [77], también se propone estudiar el comportamiento del microorganismo al estar inmersas en caldo papa dextrosa. Este medio de cultivo líquido se puede obtener de manera comercial o puede ser preparado [97, 138], sin embargo, y de igual manera que el medio de cultivo sólido PDA, es recomendable utilizar un producto que proporcione la certeza de que se contará con un adecuado funcionamiento. Por lo anterior, se toma como referencia el caldo papa dextrosa en formato polvo, (Sigma-Aldrich, P6685), donde se recomienda disolver 24 g del polvo en 1 L de agua destilada, luego, esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos [133].

8.2. Desarrollo bajo microgravedad

En este punto es primordial considerar que se debe simular las condiciones espaciales, realizando pruebas de temperatura y presión que puede alcanzar el experimento al llevarse a cabo. Lo anterior, debido a que los satélites al estar en órbita pueden encontrarse de cara al Sol, lo que implica en temperaturas de hasta 121°C, pero también se podría encontrar de espalda al Sol, lo que conlleva en temperaturas de hasta -157°C [139, 140]. Además, se debe considerar que en el espacio ya no se cuenta con la atmósfera terrestre, pero que al encontrarse dentro del satélite la presión que siente es extremadamente baja, siendo casi un vacío perfecto [141].

Por lo anterior, se propone realizar pruebas de condiciones espaciales con muestras de 10-20 microcápsulas, en un equipo que sea capaz de simular la temperatura y presión que se puede alcanzar [76]. Para hacer las pruebas se cuenta con una cámara de termovacío modelo NDT-4000, equipo de la marca Nano-Master, ver Figura 8.1 [142]. Esta cámara es un sistema de simulación espacial que puede alcanzar una presión de $1 \cdot 10^{-6}$ Torr en 20 minutos, contando con un control de presión automático, por lo que permite la prueba de dispositivos o muestras en vacío extremo y proporciona condiciones de temperatura controlables y dinámicas en el rango de -100°C a 150°C , lo que se puede programar según una receta y extender por más de 36 horas [143].

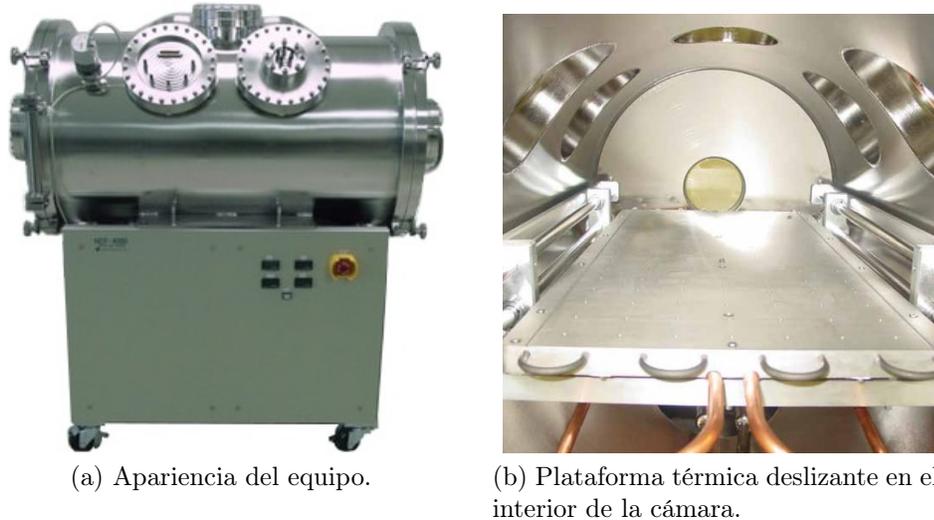


Figura 8.1: Cámara de termovacío modelo NDT-4000, marca Nano-Master [143].

Por lo anterior, el equipo en cuestión permite simular en conjunto las condiciones espaciales antes mencionadas. La cámara de termovacío cuenta con una plataforma térmica deslizante, la que tiene un rango de error de la temperatura configurada de $\pm 1^{\circ}\text{C}$ en toda su superficie, es posible extraer hasta en un 75 % en longitud de la plataforma, lo que permite cargar las muestras [143]. Gracias a que cuenta con un sistema de refrigeración cerrado, control automático de presión, automatización de la temperatura por recetas y, además, proporciona múltiples niveles de acceso con restricciones de contraseña, es posible configurar el experimento a desarrollar, ajustándolo según las condiciones a las que se verá expuestas en la realidad las esporas encapsuladas [143].

Sin embargo, es importante considerar la posibilidad de que las microcápsulas no sean capaces de resistir las condiciones espaciales mencionadas, por lo anterior, y si este fuese el caso, se propone añadir un protector térmico para resguardarlas.

Por otro lado, es de importancia considerar que, en el lanzamiento, el satélite y todo el sistema vibra, por lo que se deben hacer estudios para verificar el comportamiento de las cápsulas al experimentar vibraciones de baja y alta frecuencia [50]. Por lo anterior, se propone utilizar una máquina de prueba de vibración, el que permita obtener un amplio espectro de frecuencias. Así, se tiene como referencia, la máquina de prueba de vibración de fuerza grande para prueba de vibración de paletas Meet ISTA 3A y 6-Amazon, de la marca Labtone, que van desde una frecuencia de 5 Hz y, dependiendo del modelo, puede llegar desde los 2.500 Hz

a los 3.000 Hz [144].

8.3. Montaje experimental

Por otro lado, es importante plantear un mecanismo por el que se lleve a cabo la unión de las esporas y el medio de cultivo. Debido a esto, se tomará en consideración el punto crítico de temperatura que se alcanza a lo largo del viaje. Debido a la posición en donde van ubicados los microsatelites en el vehículo que los transporta, estos son capaces de alcanzar temperaturas de hasta 90 °C cuando están prontos a ser puestos en órbita [50]. Por lo anterior, es necesario determinar si esta temperatura puede resquebrajar de tal manera cápsula, que se produzca la liberación de las esporas.

Por lo anterior, se propone que se estudie el comportamiento de las cápsulas ya preparadas, al verse sometidas a una temperatura de 90 °C, analizando bajo el microscopio si se evidencian fracturas del recubrimiento.

Considerando que las fibras obtenidas por electrohilado son capaces de liberar las esporas al entrar en contacto con un medio de cultivo y que las cápsulas obtenidas vía secado por aspersión son capaces de liberar las esporas al entrar en contacto con un medio con alto contenido de agua. Además, considerando que se plantea estudiar la correcta difusión de nutrientes del caldo papa dextrosa hacia dentro de las perlas de alginato de calcio. Asumiendo que este último caso derive en resultados exitosos, se recomienda que al desarrollar estas técnicas se utilice una membrana, construida en base a un material que sea capaz de romperse a los 90 °C, que separe el medio de cultivo y las esporas encapsuladas.

En el caso de las cápsulas obtenidas por montaje LbL y considerando el caso de que las esporas de *T. reesei* no son capaces de desarrollarse adecuadamente dentro de las perlas de alginato de calcio al estar inmersas en caldo papa dextrosa. Se recomienda utilizar la misma membrana, construida en base a un material que sea capaz de romperse a los 90 °C, pero que en este caso separe el medio de cultivo, el que tenga en su superficie las cápsulas, de el medio líquido que contenga las enzimas capaces de romper el recubrimiento del montaje LbL o la solución de citrato de sodio ya descrita, en el caso de la gelificación iónica.

Capítulo 9

Conclusión

Se ha estudiado diferentes métodos de encapsulamiento, detectando que existen diversas metodologías que pueden resultar adecuadas para desarrollar un estudio a bordo de un microsatélite.

Considerando los costos de los reactivos requeridos para implementar cada una de las metodologías estudiadas, se tiene que la técnica de gelificación iónica es la más económica (\$184), luego, se tiene la técnica de electrohilado (\$3.589) y finalmente se tiene el montaje LbL (\$14.833) y el secado por aspersión (\$17.838), que son técnicas considerablemente más costosas que las primeras alternativas.

En cuanto a la disponibilidad de equipamiento, la gelificación iónica es la más sencilla de implementar, permitiendo, incluso, construir el sistema de manera artesanal. Luego, se tiene el montaje LbL, ya que no requiere de equipamientos especializados para llevar a cabo la encapsulación, por lo que es factible de implementar en las inmediaciones de la FCFM. Posteriormente, se tiene la técnica de electrohilado, que requiere el uso de equipamiento específico que tiene alta demanda, pero este se encuentra disponible en la FCFM y, además, existe la posibilidad de colaborar con la Universidad de la Frontera o la Universidad de Santiago, aunque esto sería más complejo y menos probable. Finalmente, se tiene la técnica de secado por aspersión, que requiere el uso de equipos especializados, pero existe la posibilidad de realizar colaboraciones con la Universidad de Santiago.

Considerando la complejidad de desarrollo de cada técnica, la gelificación iónica es la más sencilla de implementar, ya que solo considera mezclar y gotear soluciones. Luego, se tiene el secado por aspersión, debido a que se basa en la aspersión de una mezcla de una solución compleja y la suspensión de esporas. Luego, se tiene la técnica de electrohilado, que no tiene grandes complejidades en su procedimiento, más allá de la polimerización de la acrilamida. Finalmente, se tiene la técnica de montaje LbL, que tiene una mayor complejidad, en comparación a las otras metodologías, debido al proceso que se debe seguir para producir de lignina catiónica.

En cuanto a la compatibilidad de cada metodología planteada con *T. reesei*, primero se tiene la técnica de gelificación iónica y el montaje LbL, debido a que para ambos casos se utilizó evidencia bibliográfica específica para este microorganismo. Luego, se tiene la técnica

de electrohilado, ya que la metodología planteada se basa en la encapsulación de esporas de una especie perteneciente al género de *Trichoderma*, con alta semejanza con *T. reesei*. Finalmente, se tiene la técnica de secado por aspersión, debido a que la metodología planteada se basa en la encapsulación de esporas de un hongo filamentoso con cierta semejanza con *T. reesei*, sin pertenecer a la misma familia taxonómica.

En cuando a la sencillez para generar el crecimiento del microorganismo, primero se tiene la gelificación iónica, debido a que permite la germinación y el crecimiento de esporas sin la necesidad de ser liberadas. Luego, se tiene la técnica de secado por aspersión y el electrohilado, ya que permiten que se realice una liberación controlada de las esporas, supeditado al contacto con una fuente que contenga una alta concentración de agua. Finalmente, se tiene el montaje LbL, debido a que requiere la presencia de enzimas específicas para romper el envoltorio.

Así, se concluye que la gelificación iónica es la metodología más conveniente a llevar a cabo, debido a sus bajos costos y simpleza de implementación. Luego, considerando costos bajos pero que requiera el uso de equipos especializados con variadas alternativas de acceso, la tercera opción corresponde al electrohilado. Considerando la intención de desarrollar la técnica en las dependencias de la FCFM, sin desplazarse, y que implique costos relativamente bajos, por otro lado, teniendo en cuenta las dificultades asociadas al desarrollo de la encapsulación y a las proyecciones del montaje experimental, la tercera opción correspondería al montaje LbL. Debido a que implica mayores costos y que además requiere de colaboración con otras universidades, como última alternativa se tiene al secado por aspersión.

Por medio de la investigación, se han determinado compuestos que son ampliamente utilizados para encapsular esporas de organismos vivos. En particular, el biopolímero quitosano ha mostrado ser altamente compatible con la encapsulación de esporas de hongos, permitiendo la viabilidad de las esporas posterior a la encapsulación, a la vez que se retrasa la germinación de las mismas.

Por otro lado, se ha mostrado que el polímero lignina es compatible específicamente con las esporas de *T. reesei*, permitiendo la viabilidad de las esporas mientras retrasa la germinación hasta el punto en que se rompe la cápsula.

Además, el alginato de calcio, correspondiente a una forma insoluble de alginato, permite encapsular las esporas de distintas especies de *Trichoderma*, permitiendo la viabilidad de las esporas y que, además, estas se desarrollen dentro de las cápsulas al estar inmersas dentro de un medio de cultivo líquido compatible.

Se plantea que el principal parámetro de factibilidad técnica a evaluar sea la germinación de las esporas encapsuladas, debido a que el objetivo posterior a este estudio es proveer de un sistema de microcápsulas que contienen esporas de *T. reesei* viables en las condiciones espaciales específicas, que protejan al microsatélite de la contaminación por hongos, a la vez de proteger las esporas de las condiciones físicas propias del lanzamiento del microsatélite.

Con el objeto de evaluar la viabilidad de la esporas microencapsuladas, se planteó determinar el porcentaje de esporas germinadas después de efectuar cada una de las técnicas propuestas, tanto en condiciones normales de presión y temperatura.

Cabe señalar que este es un estudio teórico que sienta las bases para efectuar una efectiva

microencapsulación de esporas de *T. reesei*. Toda vez que las microcápsulas sean producidas empíricamente mediante las técnicas propuestas, será posible proyectar el estudio de viabilidad de las esporas en condiciones similares a las que ocurren durante el lanzamiento y trayectoria en el espacio del microsatélite.

Bibliografía

- [1] COMUNICACIONES FCFM - UCHILE, 2017c. SUCHAI I: hacia un programa espacial - Universidad de Chile. Universidad de Chile [en línea]. [Consulta: 28 junio 2021]. Disponible en: <<https://www.uchile.cl/noticias/133697/suchai-i-hacia-un-programa-espacial>>.
- [2] COMUNICACIONES FCFM - UCHILE, 2017b. Programa Espacial UChile: SUCHAI II, un avance en tecnología espacial - Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas - Universidad de Chile. Universidad de Chile [en línea]. [Consulta: 28 junio 2021]. Disponible en: <<http://ingenieria.uchile.cl/noticias/134148/programa-espacial-de-la-universidad-de-chile-suchai-2>>.
- [3] COMUNICACIONES FCFM - UCHILE, 2017a. Programa Espacial de la Universidad de Chile: SUCHAI III, ciencia espacial al más alto nivel - Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas - Universidad de Chile. Universidad de Chile [en línea]. [Consulta: 28 junio 2021]. Disponible en: <<http://ingenieria.uchile.cl/noticias/134149/programa-espacial-uchile-sucahi-3-ciencia-espacial-al-mas-alto-nivel>>.
- [4] BBC NEWS MUNDO, 2019. Por qué los astronautas pasan horas limpiando las paredes de la Estación Espacial Internacional - BBC News Mundo. BBC [en línea]. [Consulta: 28 junio 2021]. Disponible en: <<https://www.bbc.com/mundo/noticias-48801165>>.
- [5] EL-ENSHASY, H.A., 2007. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, pp. 225-261. DOI 10.1016/B978-044452114-9/50010-4.
- [6] EL ENSHASY, H.A., 2022. Fungal morphology: a challenge in bioprocess engineering industries for product development. *Current Opinion in Chemical Engineering*, vol. 35, pp. 100729. ISSN 2211-3398. DOI 10.1016/J.COCHE.2021.100729.
- [7] SCHMOLL, M., 2022. *Trichoderma reesei*. *Trends in Microbiology*, ISSN 0966-842X. DOI 10.1016/J.TIM.2021.12.008.
- [8] FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS - UNIVERSIDAD DE CHILE, 2022. Primera constelación/enjambre de satélites desarrollados en Chile. [en línea]. [Consulta: 2 marzo 2022]. Disponible en: <<https://ingenieria.uchile.cl/noticias/183259/primera-constelacionenjambre-de-satelites-desarrollados-en-chile>>.
- [9] FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS - UNIVERSIDAD DE CHILE, 2022. PLANTSAT. [en línea]. [Consulta: 2 marzo 2022]. Disponible en: <<https://ingenieria.uchile.cl/noticias/183605/plantsat>>.

- [10] EL MERCURIO, 2022. Bacterias de la Antártica y del desierto viajarán al espacio a bordo de satélites creados en Chile. Ciencia y Tecnología [en línea]. [Consulta: 2 marzo 2022]. Disponible en: <https://www.litoralpress.cl/sitio/Prensa_Texto?LPKey=JRPZGR34YCWQP7UPLNYNW6BFR04357KKQSDN4WAQETO56DTDNDMQ>.
- [11] COLLEGE OF AGRICULTURE AND LIFE SCIENCES, [sin fecha]. Trichoderma. Cornell University [en línea]. [Consulta: 29 junio 2021]. Disponible en: <<https://biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/trichoderma.php>>.
- [12] SALOHEIMO, M., PAKULA, T., ARO, N. y JOENSUU, J.J., 2014. Protein Production—Quality Control and Secretion Stress Responses in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*, pp. 81-88. DOI 10.1016/B978-0-444-59576-8.00006-0.
- [13] ANTONOV, E., WIRTH, S., GERLACH, T., SCHLEMBACH, I., ROSENBAUM, M.A., REGESTEIN, L. y BÜCHS, J., 2016. Efficient evaluation of cellulose digestibility by *Trichoderma reesei* Rut-C30 cultures in online monitored shake flasks. *Microbial Cell Factories*, vol. 15, no. 1, pp. 1-17. ISSN 14752859. DOI 10.1186/S12934-016-0567-7/FIGURES/9.
- [14] ATANASOVA, L., KNOX, B.P., KUBICEK, C.P., DRUZHININA, I.S. y BAKER, S.E., 2013. The Polyketide Synthase Gene *pks4* of *Trichoderma reesei* Provides Pigmentation and Stress Resistance. *Eukaryotic Cell*, vol. 12, no. 11, pp. 1499. ISSN 15359778. DOI 10.1128/EC.00103-13.
- [15] Producción de celulasas y biomasa del hongo *Trichoderma reesei* utilizando lodo papelerero como fuente de carbono. [en línea], [sin fecha]. [Consulta: 30 junio 2021]. Disponible en: <http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562015000100008>.
- [16] GUPTA, V.K., STEINDORFF, A.S., DE PAULA, R.G., SILVA-ROCHA, R., MACHAIGNER, A.R., MACH, R.L. y SILVA, R.N., 2016. The Post-genomic Era of *Trichoderma reesei*: What's Next? *Trends in Biotechnology*, vol. 34, no. 12, pp. 970-982. ISSN 0167-7799. DOI 10.1016/J.TIBTECH.2016.06.003.
- [17] NOGAWA, M., TAKAHASHI, H., KASHIWAGI, A., OHSHIMA, K., OKADA, H. y MORIKAWA, Y., 1998. Purification and Characterization of Exo- β -d-Glucosaminidase from a Cellulolytic Fungus, *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Applied and Environmental Microbiology* [en línea], vol. 64, no. 3, pp. 890. [Consulta: 28 febrero 2022]. ISSN 00992240. DOI 10.1128/aem.64.3.890-895.1998.
- [18] BAYRAM AKCAPINAR, G., GUL, O. y SEZERMAN, U.O., 2012. From in silico to in vitro: modelling and production of *Trichoderma reesei* endoglucanase 1 and its mutant in *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*, vol. 159, no. 1-2, pp. 61-68. ISSN 1873-4863. DOI 10.1016/J.JBIOTECH.2012.01.001.
- [19] NOVY, V., SCHMID, M., EIBINGER, M., PETRASEK, Z. y NIDETZKY, B., 2016. The micromorphology of *Trichoderma reesei* analyzed in cultivations on lactose and solid lignocellulosic substrate, and its relationship with cellulase production. *Biotechnology for Biofuels*, vol. 9, no. 1, pp. 169. ISSN 17546834. DOI 10.1186/S13068-016-0584-0.

- [20] KUBICEK, C. y HARMAN, G., 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Enzymes, biological control, and commercial applications. Volume 2. S.l.: s.n. ISBN 0203484452.
- [21] HOCKING, A.D., 2006. *Aspergillus* and related teleomorphs. Food spoilage microorganisms, pp. 451-487. DOI 10.1533/9781845691417.4.451.
- [22] WALSH, T.J., GROLL, A., HIEMENZ, J., FLEMING, R., ROILIDES, E. y ANAIS-SIE, E., 2004. Infections due to emerging and uncommon medically important fungal pathogens. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 10, no. SUPPL. 1, pp. 48-66. ISSN 1198-743X. DOI 10.1111/J.1470-9465.2004.00839.X.
- [23] SAUTOUR, M., CHRÉTIEN, M.L., VALOT, S., LAFON, I., BASMACIYAN, L., LE-GOUGE, C., VERRIER, T., GONSSAUD, B., ABOU-HANNA, H., DALLE, F. y CAI-LLOT, D., 2018. First case of proven invasive pulmonary infection due to *Trichoderma longibrachiatum* in a neutropenic patient with acute leukemia. *Journal de Mycologie Médicale*, vol. 28, no. 4, pp. 659-662. ISSN 1156-5233. DOI 10.1016/J.MYCMED.2018.10.001.
- [24] THRONSET, W., KIM, S., BOWER, B., LANTZ, S., KELEMEN, B., PEP-SIN, M., CHOW, N., MITCHINSON, C. y WARD, M., 2010. Flow cytometric sorting of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* for improved strains. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 47, no. 7, pp. 335-341. ISSN 0141-0229. DOI 10.1016/J.ENZMICTEC.2010.09.003.
- [25] MUKHERJEE, P.K., HORWITZ, B.A., HERRERA-ESTRELLA, A., SCHMOLL, M. y KENERLEY, C.M., 2013. *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annual Review of Phytopathology* [en línea], vol. 51, pp. 105-129. [Consulta: 9 febrero 2022]. ISSN 00664286. DOI 10.1146/ANNUREV-PHYTO-082712-102353.
- [26] CARLILE, M.J., 1995. The Success of the Hypha and Mycelium. *The Growing Fungus* [en línea], pp. 3-19. [Consulta: 12 febrero 2022]. DOI 10.1007/978-0-585-27576-5_1.
- [27] METZ, B., SEIDL-SEIBOTH, V., HAARMANN, T., KOPCHINSKIY, A., LORENZ, P., SEIBOTH, B. y KUBICEK, C.P., 2011. Expression of biomass-degrading enzymes is a major event during conidium development in *trichoderma reesei*. *Eukaryotic Cell* [en línea], vol. 10, no. 11, pp. 1527-1535. [Consulta: 13 febrero 2022]. ISSN 15359778. DOI 10.1128/EC.05014-11/SUPPL_FILE/TABLES3.PDF.
- [28] VIDAL-DIEZ DE ULZURRUN, G., HUANG, T.Y., CHANG, C.W., LIN, H.C. y HSUEH, Y.P., 2019. Fungal feature tracker (FFT): A tool for quantitatively characterizing the morphology and growth of filamentous fungi. *PLoS Computational Biology* [en línea], vol. 15, no. 10, pp. e1007428. [Consulta: 13 febrero 2022]. ISSN 15537358. DOI 10.1371/JOURNAL.PCBI.1007428.
- [29] SHARMA, A., GAUTAM, S. y MISHRA, B.B., 2014. *Trichothecium*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, pp. 647-652. DOI 10.1016/B978-0-12-384730-0.00338-4.
- [30] MEDICAL LABORATORIES, 2014. Molds (filamentous fungi). [en línea]. [Consulta: 13 febrero 2022]. Disponible en: <<http://www.medical-labs.net/molds-filamentous-fungi-398/>>.

- [31] CRUZ, M.T.-D. la, ORTIZ-GARCÍA, C.F., BAUTISTA-MUÑOZ, C., RAMÍREZ-POOL, J.A., ÁVALOS-CONTRERAS, N., CAPPELLO-GARCÍA, S. y CRUZ-PÉREZ, A.D. la, 2015. Diversidad de *Trichoderma* en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* [en línea], vol. 86, no. 4, pp. 947-961. [Consulta: 28 octubre 2021]. ISSN 2007-8706. DOI 10.1016/J.RMB.2015.07.012.
- [32] NCBI DNA & RNA, [sin fecha]. *Hypocrea jecorina* strain GXNN4056 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence [en línea]. [Consulta: 9 febrero 2022]. Disponible en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/383792333/>>.
- [33] SCHÜTZ, G., HALTRICH, D. y ATANASOVA, L., 2020. Influence of spore morphology on spectrophotometric quantification of *trichoderma* inocula. *BioTechniques* [en línea], vol. 68, no. 5, pp. 279-282. [Consulta: 15 noviembre 2021]. ISSN 19409818. DOI 10.2144/btn-2019-0152
- [34] LI, W.C., HUANG, C.H., CHEN, C.L., CHUANG, Y.C., TUNG, S.Y. y WANG, T.F., 2017. *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters. *Biotechnology for Biofuels* [en línea], vol. 10, no. 1. [Consulta: 8 febrero 2022]. ISSN 17546834. DOI 10.1186/S13068-017-0825-X.
- [35] DASHTBAN, M., BUCHKOWSKI, R. y QIN, W., 2011. Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology* [en línea], vol. 2, no. 3, pp. 274. [Consulta: 26 enero 2022]. ISSN 21524114. Disponible en: /pmc/articles/PMC3193291/.
- [36] BENKHO, Z., DRAHOS, E., SZENGYEL, Z., PURANEN, T., VEHEMAANPERÄ, J. y RÉCZEY, K., 2007. *Thermoascus aurantiacus* CBHI/Cel7A production in *Trichoderma reesei* on alternative carbon sources. *Applied biochemistry and biotechnology* [en línea], vol. 137-140, no. 1-12, pp. 195-204. [Consulta: 8 febrero 2022]. ISSN 1559-0291. DOI 10.1007/S12010-007-9051-5.
- [37] STEYAERT, J.M., WELD, R.J., MENDOZA-MENDOZA, A. y STEWART, A., 2010a. Reproduction without sex: conidiation in the filamentous fungus *Trichoderma*. *Microbiology* [en línea], vol. 156, no. 10, pp. 2887-2900. ISSN 1350-0872. DOI 10.1099/MIC.0.041715-0.
- [38] PEIL, S., BECKERS, S.J., FISCHER, J. y WURM, F.R., 2020. Biodegradable, lignin-based encapsulation enables delivery of *Trichoderma reesei* with programmed enzymatic release against grapevine trunk diseases. *Materials Today Bio*, vol. 7. ISSN 25900064. DOI 10.1016/j.mtbio.2020.100061.
- [39] AHAMED, A. y VERMETTE, P., 2009. Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 23, pp. 5979-5987. ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/J.BIORTECH.2009.02.070.
- [40] GORDILLO-FUENZALIDA, F., ECHEVERRÍA-VEGA, A., CUADROS-ORELLANA, S., FAUNDEZ, C., KÄHNE, T. y MORALES-VERA, R., 2019. Cellulases Production by

- a *Trichoderma* sp. Using Food Manufacturing Wastes. *Applied Sciences* 2019, Vol. 9, vol. 9, no. 20, pp. 4419. ISSN 2076-3417. DOI 10.3390/APP9204419.
- [41] WANG, B. y XIA, L., 2011. High efficient expression of cellobiase gene from *Aspergillus niger* in the cells of *Trichoderma reesei*. *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 6, pp. 4568-4572. ISSN 0960-8524. DOI 10.1016/J.BIORTECH.2010.12.099.
- [42] WANG, Mingyu, YANG, H., ZHANG, M., LIU, K., WANG, H., LUO, Y. y FANG, X., 2015. Functional analysis of *Trichoderma reesei* CKII2, a catalytic subunit of casein kinase II. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 99, no. 14, pp. 5929-5938. ISSN 14320614. DOI 10.1007/S00253-015-6544-Y/FIGURES/7.
- [43] GRIFFITH, G. y GOKA, T., 2009. The Space Environment: Natural and Induced. *Safety Design for Space Systems*, pp. 7-104. DOI 10.1016/B978-0-7506-8580-1.00002-6.
- [44] NASA SPACE PLACE, 2020. How Do We Weigh Planets? NASA Science for Kids [en línea]. [Consulta: 27 enero 2022]. Disponible en: <<https://spaceplace.nasa.gov/planets-weight/sp/>>.
- [45] FARIAS, C., 2017. Un verdadero hito: satélite chileno Suchai I fue lanzado desde India. *Diario Concepción* [en línea]. [Consulta: 27 enero 2022]. Disponible en: . <<https://www.diarioconcepcion.cl/pais/2017/06/23/satelite-chileno-suchai-i-fue-lanzado-desde-india.html>>.
- [46] LIDE, D., 2003. *Handbook of Chemistry and Physics*. Edición 84. S.l.: s.n. ISBN 9780849304842.
- [47] NASA, [sin fecha]. Weight Equation. [en línea]. [Consulta: 14 marzo 2022]. Disponible en: <<https://www.grc.nasa.gov/www/k-12/airplane/wteq.html>>.
- [48] WIRED, 2009. Centripetal vs. Centrifugal (word origins). [en línea]. [Consulta: 27 enero 2022]. Disponible en: <<https://www.wired.com/2009/04/centripetal-vs-centrifugal-word-origins/>>.
- [49] LUCAS, J., 2021. What Are Centrifugal & Centripetal Forces? *Live Science* [en línea]. [Consulta: 27 enero 2022]. Disponible en: <<https://www.livescience.com/52488-centrifugal-centripetal-forces.html>>.
- [50] Marcos Andrés Díaz Quezada, comunicación personal.
- [51] COSMOS, [sin fecha]. Centripetal Force. [en línea]. [Consulta: 27 enero 2022]. Disponible en: <https://astronomy.swin.edu.au/cosmos/C/Centripetal+Force>.
- [52] WALL, J., 2015. What Is Microgravity? [en línea], [Consulta: 29 enero 2022]. Disponible en: <<http://www.nasa.gov/audience/forstudents/5-8/features/nasa-knows/what-is-microgravity-58.html>>.
- [53] JENNINGS, T., 1990. Space adaptation syndrome is caused by elevated intracranial pressure. *Medical Hypotheses*, vol. 32, no. 4, pp. 289-291. ISSN 0306-9877. DOI 10.1016/0306-9877(90)90108-Q.

- [54] PLANETARIO CHILE, 2021. Estación Espacial Internacional cumple quince años desde su puesta en órbita. [en línea]. [Consulta: 30 enero 2022]. Disponible en: <<https://planetariochile.cl/estacion-espacial-internacional-cumple-quince-anos-desde-su-puesta-en-orbita/>>.
- [55] CHECINSKA, A., PROBST, A.J., VAISHAMPAYAN, P., WHITE, J.R., KUMAR, D., STEPANOV, V.G., FOX, G.E., NILSSON, H.R., PIERSON, D.L., PERRY, J. y VENKATESWARAN, K., 2015. Microbiomes of the dust particles collected from the International Space Station and Spacecraft Assembly Facilities. *Microbiome* [en línea], vol. 3, no. 1, pp. 50. [Consulta: 30 enero 2022]. ISSN 2049-2618. DOI 10.1186/S40168-015-0116-3/TABLES/4.
- [56] BLACHOWICZ, A., CHIANG, A.J., ELSAESSER, A., KALKUM, M., EHRENFREUND, P., STAJICH, J.E., TOROK, T., WANG, C.C.C. y VENKATESWARAN, K., 2019. Proteomic and metabolomic characteristics of extremophilic fungi under simulated Mars conditions. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, no. MAY, pp. 1013. ISSN 1664302X. DOI 10.3389/FMICB.2019.01013/BIBTEX.
- [57] NICHOLSON, W.L., MOELLER, R. y HORNECK, G., 2012. Transcriptomic responses of germinating bacillus subtilis spores exposed to 1.5 years of space and simulated martian conditions on the EXPOSE-E experiment PROTECT. *Astrobiology* [en línea], vol. 12, no. 5, pp. 469-486. [Consulta: 1 febrero 2022]. ISSN 15311074. DOI 10.1089/AST.2011.0748/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE4.JPEG.
- [58] CORTESÃO, M., SCHÜTZE, T., MARX, R., MOELLER, R. y MEYER, V., 2020. Fungal Biotechnology in Space: Why and How? *Grand Challenges in Biology and Biotechnology* [en línea], pp. 501-535. [Consulta: 2 febrero 2022]. ISSN 23671025. DOI 10.1007/978-3-030-29541-7_18.
- [59] SATHISHKUMAR, Y., VELMURUGAN, N., LEE, H.M., RAJAGOPAL, K., IM, C.K. y LEE, Y.S., 2014. Effect of low shear modeled microgravity on phenotypic and central chitin metabolism in the filamentous fungi *Aspergillus niger* and *Penicillium chrysogenum*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* [en línea], vol. 106, no. 2, pp. 197-209. [Consulta: 4 febrero 2022]. ISSN 15729699. DOI 10.1007/S10482-014-0181-9/FIGURES/7.
- [60] RAPOSO, G. y MARKS, M.S., 2007. Melanosomes — dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 10, pp. 786-797. ISSN 1471-0080. DOI 10.1038/nrm2258.
- [61] GOMOIU, I., CHATZITHEODORIDIS, E., VADRUCCI, S., WALTHER, I. y COJOC, R., 2016. Fungal Spores Viability on the International Space Station. *Origins of Life and Evolution of Biospheres* [en línea], vol. 46, no. 4, pp. 403-418. [Consulta: 4 febrero 2022]. ISSN 15730875. DOI 10.1007/S11084-016-9502-5/FIGURES/5.
- [62] GOMOIU, I., CHATZITHEODORIDIS, E., VADRUCCI, S. y WALTHER, I., 2013. The Effect of Spaceflight on Growth of *Ulocladium chartarum* Colonies on the International Space Station. *PLoS ONE* [en línea], vol. 8, no. 4. [Consulta: 4 febrero 2022]. ISSN 19326203. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0062130.

- [63] MADENE, A., JACQUOT, M., SCHER, J. y DESOBRY, S., 2006. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology* [en línea], vol. 41, no. 1, pp. 1-21. [Consulta: 28 octubre 2021]. ISSN 1365-2621. DOI 10.1111/J.1365-2621.2005.00980.X.
- [64] PARRA, R., 2010. REVISIÓN: MICROENCAPSULACIÓN DE ALIMENTOS. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, vol. 63, no. 2, pp. 5669-5684. [Consulta: 8 julio 2021]. ISSN 0304-2847. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472010000200020&lng=en&nrm=iso&tlng=es>.
- [65] Drug delivery systems. Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems [en línea], 2015. pp. 87-194. [Consulta: 25 febrero 2022]. DOI 10.1016/B978-0-08-100092-2.00006-0.
- [66] FU, F. y HU, L., 2017. Temperature sensitive colour-changed composites. *Advanced High Strength Natural Fibre Composites in Construction*, pp. 405-423. DOI 10.1016/B978-0-08-100411-1.00015-7.
- [67] MICROTEK LABORATORIES, 2017. Microencapsulation Technical Information. [en línea]. [Consulta: 29 octubre 2021]. Disponible en: <<https://microteklabs.com/technical-overview.html>>.
- [68] TIMILSENA, Y.P., AKANBI, T.O., KHALID, N., ADHIKARI, B. y BARROW, C.J., 2019. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 121, pp. 1276-1286. ISSN 0141-8130. DOI 10.1016/J.IJBIOMAC.2018.10.144.
- [69] SCIENTIA, [sin fecha]. La reina de la encapsulación molecular. [en línea]. [Consulta: 30 octubre 2021]. Disponible en: <<https://scientiablog.com/2011/05/12/la-reina-de-la-encapsulacion-molecular/>>.
- [70] JAMEKHORSHID, A., SADRAMELI, S.M. y FARID, M., 2014. A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, vol. 31, pp. 531-542. ISSN 1364-0321. DOI 10.1016/J.RSER.2013.12.033.
- [71] SCHOEBITZ, M., LÓPEZ, M.D. y ROLDÁN, A., 2013. Bioencapsulation of microbial inoculants for better soil–plant fertilization. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 2013 33:4 [en línea], vol. 33, no. 4, pp. 751-765. [Consulta: 30 octubre 2021]. ISSN 1773-0155. DOI 10.1007/S13593-013-0142-0.
- [72] OLMOS, S.S., [sin fecha]. EMULSIONES (I). [en línea], [Consulta: 30 octubre 2021]. Disponible en: <<https://docplayer.es/79179610-Emulsiones-i-resumen-introduccion-sonia-sanz-olmos-1.html>>.
- [73] SILVA, C.M., RIBEIRO, A.J., FIGUEIREDO, I.V., GONÇALVES, A.R. y VEIGA, F., 2006. Alginate microspheres prepared by internal gelation: Development and effect on insulin stability. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 311, pp. 1-10. DOI 10.1016/j.ijpharm.2005.10.050.

- [74] NORAMBUENA-CONTRERAS, J., YALCIN, E., HUDSON-GRIFFITHS, R. y GARCÍA, A., 2019. Mechanical and Self-Healing Properties of Stone Mastic Asphalt Containing Encapsulated Rejuvenators. *Journal of Materials in Civil Engineering* [en línea], vol. 31, no. 5, pp. 04019052. [Consulta: 26 febrero 2022]. ISSN 0899-1561. DOI 10.1061/(ASCE)MT.1943-5533.0002687.
- [75] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, M. L., HOLGADO, M.A., SÁNCHEZ-LAFUENTE, C., RABASCO, A.M. y FINI, A., 2002. Alginate/chitosan particulate systems for sodium diclofenac release. *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 232, no. 1-2, pp. 225-234. ISSN 0378-5173. DOI 10.1016/S0378-5173(01)00915-2.
- [76] LOPES, A.R. de O., LOCATELLI, G.O., BARBOSA, R. de M., LOBO JUNIOR, M., MOURA MASCARIN, G. y LAMENHA LUNA FINKLER, C., 2020. Preparation, characterisation and cell viability of encapsulated *Trichoderma asperellum* in alginate beads. <https://doi.org/10.1080/02652048.2020.1729884> [en línea], vol. 37, no. 3, pp. 270-282. [Consulta: 18 febrero 2022]. ISSN 14645246. DOI 10.1080/02652048.2020.1729884.
- [77] DELGADO-RAMOS, L., MARCOS, A.T., RAMOS-GUELFO, M.S., SÁNCHEZ-BARRIONUEVO, L., SMET, F., CHÁVEZ, S. y CÁNOVAS, D., 2014. Flow Cytometry of Microencapsulated Colonies for Genetics Analysis of Filamentous Fungi. *G3 Genes|Genomes|Genetics* [en línea], vol. 4, no. 11, pp. 2271-2278. [Consulta: 17 febrero 2022]. ISSN 21601836. DOI 10.1534/G3.114.014357.
- [78] Mariela Yanet Bustamante López, comunicación personal.
- [79] CHEZANOGLU, E. y GOULA, A.M., 2021. Co-crystallization in sucrose: A promising method for encapsulation of food bioactive components. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 114, pp. 262-274. ISSN 0924-2244. DOI 10.1016/J.TIFS.2021.05.036.
- [80] HASHIMOTO, T., YE, Y., MATSUNO, A., OHNISHI, Y., KITAMURA, A., KINJO, M., ABE, S., UENO, T., YAO, M., OGAWA, T., MATSUI, T. y TANAKA, Y., 2019. Encapsulation of biomacromolecules by soaking and co-crystallization into porous protein crystals of hemocyanin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 509, no. 2, pp. 577-584. ISSN 0006-291X. DOI 10.1016/J.BBRC.2018.12.096.
- [81] ENCYCLOPEDIA BRITANNICA, 2019. Macromolecule. [en línea]. [Consulta: 24 febrero 2022]. Disponible en: <<https://www.britannica.com/science/macromolecule>>.
- [82] KAUR, P., ELSAYED, A., SUBRAMANIAN, J. y SINGH, A., 2021. Encapsulation of carotenoids with sucrose by co-crystallization: Physicochemical properties, characterization and thermal stability of pigments. *LWT*, vol. 140, pp. 110810. ISSN 0023-6438. DOI 10.1016/J.LWT.2020.110810.
- [83] MOHAMMED, N.K., TAN, C.P., MANAP, Y.A., MUHIALDIN, B.J. y HUSSIN, A.S.M., 2020. Spray Drying for the Encapsulation of Oils—A Review. *Molecules* 2020, Vol. 25, Page 3873 [en línea], vol. 25, no. 17, pp. 3873. [Consulta: 1 noviembre 2021]. DOI 10.3390/MOLECULES25173873.
- [84] SICCAMI, J.W., PEGIOU, E., EIJKELBOOM, N.M., ZHANG, L., MUMM, R., HALL, R.D. y SCHUTYSER, M.A.I., 2021. The effect of partial replacement of maltodextrin with vegetable fibres in spray-dried white asparagus powder on its physical

and aroma properties. *Food Chemistry*, vol. 356, pp. 129567. ISSN 0308-8146. DOI 10.1016/J.FOODCHEM.2021.129567.

- [85] LIU, C.-P. y LIU, S.-D., 2009. Low-Temperature Spray Drying for the Microencapsulation of the Fungus *Beauveria bassiana*. <http://dx.doi.org/10.1080/07373930902828005> [en línea], vol. 27, no. 6, pp. 747-753. [Consulta: 28 octubre 2021]. DOI 10.1080/07373930902828005.
- [86] Silvia Beatriz Matiacevich, comunicación personal.
- [87] Franck Jean Christophe Quero, comunicación personal.
- [88] GAVORY, C., ABDERRAHMEN, R., BORDES, C., CHAUSSY, D., BELGACEM, M.N., FESSI, H. y BRIANÇON, S., 2014. Encapsulation of a pressure sensitive adhesive by spray-cooling: Optimum formulation and processing conditions. *Advanced Powder Technology*, vol. 25, no. 1, pp. 292-300. ISSN 0921-8831. DOI 10.1016/J.APT.2013.05.004.
- [89] FAVARO-TRINDADE, C.S., DE MATOS JUNIOR, F.E., OKURO, P.K., DIAS-FERREIRA, J., CANO, A., SEVERINO, P., ZIELÍ NSKA, A., SOUTO, E.B., JUNIOR, M., OKURO, F.E., DIAS-FERREIRA, P.K., CANO, J., SEVERINO, A., ZIELÍ, P., SOUTO, A.; y GARCÍA, A.B., 2021. Encapsulation of Active Pharmaceutical Ingredients in Lipid Micro/Nanoparticles for Oral Administration by Spray-Cooling. *Pharmaceutics* 2021, Vol. 13, Page 1186 [en línea], vol. 13, no. 8, pp. 1186. [Consulta: 27 febrero 2022]. ISSN 1999-4923. DOI 10.3390/PHARMACEUTICS13081186.
- [90] VAN DER MEEREN, L., VERDUIJN, J., LI, J., VERWEE, E., KRYSKO, D. V., PARAKHONSKIY, B. V. y SKIRTACH, A.G., 2021. Encapsulation of cells in gold nanoparticle functionalized hybrid Layer-by-Layer (LbL) hybrid shells – Remote effect of laser light. *Applied Surface Science Advances*, vol. 5, pp. 100111. ISSN 2666-5239. DOI 10.1016/J.APSADV.2021.100111.
- [91] KHARLAMPIEVA, E. y SUKHISHVILI, S.A., 2003. Ionization and pH Stability of Multilayers Formed by Self-Assembly of Weak Polyelectrolytes. *Langmuir* [en línea], vol. 19, no. 4, pp. 1235-1243. [Consulta: 26 febrero 2022]. ISSN 07437463. DOI 10.1021/LA026546B.
- [92] PAWLAK, A. y BELBEKHOUCHE, S., 2021. Controlling the growth of *Escherichia coli* by layer-by-layer encapsulation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 206, pp. 111950. ISSN 0927-7765. DOI 10.1016/J.COLSURFB.2021.111950.
- [93] Etchepare, M. A., Menezes, M. F. da S. C. de, Barreto, A. R., Cavalheiro, C. P. y Menezes, C. R., 2015. Microencapsulation of probiotics by extrusion method associated with electrostatic interactions. *Ciência E Natura*, 37, 75–86. DOI 10.5902/2179460X19718
- [94] MARTINS, E., PONCELET, D., RODRIGUES, R.C. y RENARD, D., 2017. Oil encapsulation techniques using alginate as encapsulating agent: applications and drawbacks, vol. 34, no. 8, pp. 754-771. ISSN 14645246. DOI 10.1080/02652048.2017.1403495.

- [95] TAMPAU, A., GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, C. y CHIRALT, A., 2020. Polyvinyl alcohol-based materials encapsulating carvacrol obtained by solvent casting and electrospinning. *Reactive and Functional Polymers*, vol. 153, pp. 104603. ISSN 1381-5148. DOI 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2020.104603.
- [96] RODRÍGUEZ-TOBÍAS, H., MORALES, G. y GRANDE, D., 2019. Comprehensive review on electrospinning techniques as versatile approaches toward antimicrobial biopolymeric composite fibers. *Materials Science and Engineering: C*, vol. 101, pp. 306-322. ISSN 0928-4931. DOI 10.1016/J.MSEC.2019.03.099.
- [97] SPASOVA, M., MANOLOVA, N., NAYDENOV, M., KUZMANOVA, J. y RASHKOV, I., 2010. Electrospun biohybrid materials for plant biocontrol containing chitosan and *Trichoderma viride* spores: <http://dx.doi.org/10.1177/0883911510391446> [en línea], vol. 26, no. 1, pp. 48-55. [Consulta: 26 octubre 2021]. DOI 10.1177/0883911510391446.
- [98] BEIKZADEH, S., AKBARINEJAD, A., SWIFT, S., PERERA, J., KILMARTIN, P.A. y TRAVAS-SEJDIC, J., 2020. Cellulose acetate electrospun nanofibers encapsulating Lemon Myrtle essential oil as active agent with potent and sustainable antimicrobial activity. *Reactive and Functional Polymers*, vol. 157, pp. 104769. ISSN 1381-5148. DOI 10.1016/J.REACTFUNCTPOLYM.2020.104769.
- [99] XU, C., MA, J., WANG, W., LIU, Z., GU, L., QIAN, S., HOU, J. y JIANG, Z., 2022. Preparation of pectin-based nanofibers encapsulating *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320 by electrospinning. *Food Hydrocolloids*, vol. 124, pp. 107216. ISSN 0268-005X. DOI 10.1016/J.FOODHYD.2021.107216.
- [100] ÇANGA, E.M. y DUDAK, F.C., 2021. Improved digestive stability of probiotics encapsulated within poly(vinyl alcohol)/cellulose acetate hybrid fibers. *Carbohydrate Polymers*, vol. 264, pp. 117990. ISSN 0144-8617. DOI 10.1016/J.CARBPOL.2021.117990.
- [101] SCHOCH CL, et al. NCBI TAXONOMY: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database (Oxford)*. 2020: baaa062. PubMed: 32761142 PMC: PMC7408187.
- [102] WANG, Q., LIN, H., SHEN, Q., FAN, X., BAI, N. y ZHAO, Y., 2015. Characterization of Cellulase Secretion and Cre1-Mediated Carbon Source Repression in the Potential Lignocellulose-Degrading Strain *Trichoderma asperellum* T-1. *PLOS ONE* [en línea], vol. 10, no. 3, pp. e0119237. [Consulta: 28 octubre 2021]. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/JOURNAL.PONE.0119237.
- [103] HERNÁNDEZ-ORONA, V., GARZA-GARCÍA, Y., GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, B. y RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J., [sin fecha]. Determinación de la actividad celolítica de extractos obtenidos de cepas de *Bacillus sp.* aislados de las pozas de cuatro ciénagas Coahuila. [en línea]. [Consulta: 4 noviembre 2021]. Disponible en: <<https://www.ivami.com/es/microbiologia-vegetal/2173-verticillium-dahliae-y-otras-especies-de-verticillium-marchitez-por-%20verticillosis-diagnostico-molecular-cuantitativo-y-cuantitativo-pcr-y-qrtPCR-identificacion-molecular-secuenciacion>>.
- [104] RAGHUWANSHI, S., DESWAL, D., KARP, M. y KUHAD, R.C., 2014. Bioprocessing of enhanced cellulase production from a mutant of *Trichoderma asperellum* RCK2011

and its application in hydrolysis of cellulose. *Fuel*, vol. 124, pp. 183-189. ISSN 0016-2361. DOI 10.1016/J.FUEL.2014.01.107.

- [105] <<https://plotdigitizer.com/app>>
- [106] LEPAGE, E.B., LANE, R., MCKAY, D., ROZGA, J. y DEMETRIOU, A.A., 1995. Plasma separation for artificial liver support. *Journal of Clinical Apheresis*, vol. 10, no. 2, pp. 70-75. ISSN 1098-1101. DOI 10.1002/JCA.2920100203.
- [107] Allen Institute for Artificial Intelligence (AI2). Possible Interaction: Calcium Chloride and Sodium Citrate. [en línea], [Consulta: 16 marzo 2022]. Disponible en: <https://supp.ai/i/calcium-chloride-sodium-citrate/C0006686-C0142825>.
- [108] WANG, J.J., PENG, Y.J., FENG, M.G. y YING, S.H., 2019. Functional analysis of the mitochondrial gene mitoflin in the filamentous entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Fungal Genetics and Biology*, vol. 132, pp. 103250. ISSN 1087-1845. DOI 10.1016/J.FGB.2019.103250.
- [109] CHIRIBOGA H., GÓMEZ G. y GARCÉS K., 2015. Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: *Beauveria bassiana*, hongo entomopatígeno para el control biológico de hormigas cortadoras (Ysaú). [en línea]. [Consulta: 25 enero 2022]. Disponible en: <https://repositorio.iica.int/bitstream/handle/11324/2646/BVE17038724_e.pdf;jsessionid=B16E4F55F48C0B85E5D9A3F4B4067269>.
- [110] MISHRA, S. y MALIK, A., 2013. Nutritional optimization of a native *Beauveria bassiana* isolate (HQ917687) pathogenic to housefly, *Musca domestica* L. *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology* [en línea], vol. 37, no. 2, pp. 199. [Consulta: 8 enero 2022]. ISSN 09717196. DOI 10.1007/S12639-012-0165-5.
- [111] PETLAMUL, W., BUAKAEW, S., SRIPORNNGAM, T., MAHAMAD, K. y BUAKWAN, N., 2017. The Capability of *Beauveria Bassiana* for Cellulase Enzyme Production. *Proceedings of the 7th International Conference on Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics - ICBBB '17* [en línea], [Consulta: 8 enero 2022]. DOI 10.1145/3051166.
- [112] VALERO-JIMÉNEZ, C.A., DEBETS, A.J.M., VAN KAN, J.A.L., SCHOUSTRA, S.E., TAKKEN, W., ZWAAN, B.J. y KOENRAADT, C.J.M., 2014. Natural variation in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against malaria mosquitoes. *Malaria Journal* [en línea], vol. 13, no. 1, pp. 1-8. [Consulta: 8 enero 2022]. ISSN 14752875. DOI 10.1186/1475-2875-13-479/FIGURES/2.
- [113] DRAGANOVA, S., PILARSKA, D., TAKOV, D. y DOYCHEV, D., 2011. Utilization of carbohydrates by *Beauveria bassiana* isolates obtained from forest pests. *Journal of Plant Protection Research*, vol. 51, no. 4, pp. 349-354. ISSN 14274345. DOI 10.2478/V10045-011-0057-1.
- [114] LOGAN, M.R., NGUYEN, T., SZAPIEL, N., KNOCKLEBY, J., POR, H., ZADWORNÝ, M., NESZT, M., HARRISON, P., BUSSEY, H., MANDATO, C.A., VOGEL, J. y LESAGE, G., 2008. The *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) hypercellulolytic mutant RUT C30 lacks a 85 kb (29 gene-encoding) region of the wild-type genome. *BMC Genomics* [en línea], vol. 9, pp. 327. [Consulta: 14 febrero 2022]. ISSN 14712164. DOI 10.1186/1471-2164-9-327.

- [115] FEDNA, [sin fecha]. Leche descremada. [en línea]. [Consulta: 26 enero 2022]. Disponible en: <http://fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/leche-descremada>.
- [116] ARANDA-MARTINEZ, A., NARANJO ORTIZ, M.Á., ABIHSSIRA GARCÍA, I.S., ZAVALA-GONZALEZ, E.A. y LOPEZ-LLORCA, L.V., 2017. Ethanol production from chitosan by the nematophagous fungus *Pochonia chlamydosporia* and the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Microbiological Research*, vol. 204, pp. 30-39. ISSN 0944-5013. DOI 10.1016/J.MICRES.2017.07.009.
- [117] WAGNER, A.O., SCHWARZENAUER, T. y ILLMER, P., 2013. Improvement of methane generation capacity by aerobic pre-treatment of organic waste with a cellulolytic *Trichoderma viride* culture. *Journal of Environmental Management*, vol. 129, pp. 357-360. ISSN 0301-4797. DOI 10.1016/J.JENVMAN.2013.07.030.
- [118] ŠIMKOVIČ, M., POKORNÝ, R., HUDECOVÁ, D. y VAREČKA, L., 2004. Chloride transport in the vegetative mycelia of filamentous fungus *Trichoderma viride*. *Journal of Basic Microbiology* [en línea], vol. 44, no. 2, pp. 122-128. [Consulta: 28 febrero 2022]. ISSN 1521-4028. DOI 10.1002/JOBM.200310261.
- [119] JURYS, A. y FEIZIENĖ, D., 2021. The Effect of Specific Soil Microorganisms on Soil Quality Parameters and Organic Matter Content for Cereal Production. *Plants* [en línea], vol. 10, no. 10. [Consulta: 28 febrero 2022]. ISSN 22237747. DOI 10.3390/PLANTS10102000.
- [120] RAY, R.C. y BEHERA, S.S., 2017. Solid State Fermentation for Production of Microbial Cellulases. *Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications*, pp. 43-79. DOI 10.1016/B978-0-12-803725-6.00003-0.
- [121] BLEAM, W., 2017. Natural Organic Matter. *Soil and Environmental Chemistry*, pp. 333-384. DOI 10.1016/B978-0-12-804178-9.00007-0.
- [122] LOPES MOTTA, F., HELENA, M. y SANTANA, A., 2014. Comparison of humic acids production by *Trichoderma viride* and *Trichoderma reesei* using the submerged fermentation of oil palm empty fruit bunch. *African Journal of Biotechnology* [en línea], vol. 13, no. 9, pp. 1067-1074. [Consulta: 28 febrero 2022]. ISSN 1684-5315. DOI 10.5897/AJB2013.13414.
- [123] SAMUELS, Gary J, LIECKFELDT, Elke, NIRENBERG, Helgard I, SAMUELS, G J, LIECKFELDT, E y NIRENBERG, H I, 1999. *Trichoderma asperellum*, a new species with warted conidia, and redescription of *T. viride*. *Sydowia* [en línea], vol. 51, pp. 71-88.
- [124] LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., NIRENBERG, H.I. y PETRINI, O., 1999. A Morphological and Molecular Perspective of *Trichoderma viride*: Is It One or Two Species? *Applied and Environmental Microbiology* [en línea], vol. 65, no. 6, pp. 2418. [Consulta: 21 enero 2022]. ISSN 00992240. DOI 10.1128/aem.65.6.2418-2428.1999.
- [125] HONG, S.-P. y KIM, D.-S., 1998. Chitosanolytic Characteristics of Cellulases from *Trichoderma viride* and *Trichoderma reesei*. *Korean Journal of Food Science and Technology* [en línea], vol. 30, no. 2, pp. 245-252. [Consulta: 28 febrero 2022]. ISSN 0367-6293.

- [126] GURIKOV, P. y SMIRNOVA, I., 2018. Non-Conventional Methods for Gelation of Alginate. Gels [en línea], vol. 4, no. 1. [Consulta: 18 febrero 2022]. ISSN 23102861. DOI 10.3390/GELS4010014.
- [127] KONG, F., PARHIALA, K., WANG, S. y FATEHI, P., 2015. Preparation of cationic softwood kraft lignin and its application in dye removal. European Polymer Journal, vol. 67, pp. 335-345. ISSN 0014-3057. DOI 10.1016/J.EURPOLYMJ.2015.04.004.
- [128] KONG, M., CHEN, X.G., XING, K. y PARK, H.J., 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. International Journal of Food Microbiology, vol. 144, no. 1, pp. 51-63. ISSN 0168-1605. DOI 10.1016/J.IJFOODMICRO.2010.09.012.
- [129] RAMSACKAL, K., WARD, K. y SMITH, J. V., 2019. Determination of intrinsic viscosities and Mark-Houwink-Sakurada constants for sodium alginates. HAL Université des Antilles [en línea], [Consulta: 19 enero 2022]. Disponible en: <<https://hal.univ-antilles.fr/hal-02899128>>.
- [130] ROBERT AO y CHONG YS. 1999. Polymer data handbook. New York: Oxford University Press, p.247.
- [131] BREINDEL H. y HAMMOND P. 2005. Polymer Science Laboratory. Massachusetts Institute of Technology: MIT OpenCourseWare [en línea], [Consulta: 19 enero 2022]. Disponible en: <<https://ocw.mit.edu/courses/chemical-engineering/10-467-polymer-science-laboratory-fall-2005/labs/2.pdf>>.
- [132] NANO-MEGHYAS, F., 2018. Lab-scale Electrospinning Unit (Electroris ®) user manual Fnm Co.
- [133] <<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es>>.
- [134] COVE, D.J., 1966. The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology and Biological Oxidation, vol. 113, no. 1, pp. 51-56. ISSN 0926-6593. DOI 10.1016/S0926-6593(66)80120-0.
- [135] NARREA-CANGO, M. y MALPARTIDA-ZEVALLOS, J., 2006. Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno *Beauveria brongniartii* (Saccardo) Petch . Revista Perú Entomol [en línea], vol. 45, pp. 145-147. [Consulta: 27 marzo 2022]. Disponible en: <<https://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/entomologia/v45/pdf/a25v45.pdf>>.
- [136] BLANCO-ULATE, B., ROLSHAUSEN, P. y CANTU, D., 2013. Draft genome sequence of the ascomycete *Phaeoacremonium aleophilum* strain UCR-PA7, a causal agent of the esca disease complex in grapevines. Genome Announcements, vol. 1, no. 3. ISSN 21698287. DOI 10.1128/GENOMEA.00390-13/FORMAT/EPUB.
- [137] VALTAUD, C., LARIGNON, P. y FLEURAT-LESSARD, P., 2009. DEVELOPMENTAL AND ULTRASTRUCTURAL FEATURES OF PHAEOMONIELLA CHLAMYDOSPORA AND PHAEOACREMONIUM ALEOPHILUM IN RELATION TO XYLEM DEGRADATION IN ESCA DISEASE OF THE GRAPEVINE. Journal of Plant

- Pathology [en línea], vol. 91, no. 1, pp. 37-57. [Consulta: 21 marzo 2022]. Disponible en: <<https://www.jstor.org/stable/41998572>>.
- [138] MYCROBE, 2018. Potato Dextrose Agar (PDA). [en línea]. [Consulta: 23 febrero 2022]. Disponible en: <<https://www.mycrobe.org/blog/2018/7/6/potato-dextrose-agar-pda>>.
- [139] NASA, 2019. Spacewalk Spacesuit Basics. [en línea]. [Consulta: 20 marzo 2022]. Disponible en: <<https://www.nasa.gov/feature/spacewalk-spacesuit-basics>>.
- [140] LET'S TALK SCIENCE, 2019. Temperature on Earth and on the ISS. [en línea]. [Consulta: 20 marzo 2022]. Disponible en: <<https://letstalkscience.ca/educational-resources/backgrounders/temperature-on-earth-and-on-iss>>.
- [141] DESTINATION SPACE, [sin fecha]. Learn about the pressure of space. [en línea]. [Consulta: 20 marzo 2022]. Disponible en: <<http://www.destinationspace.uk/mission-modules/learn-about-pressure-space/>>.
- [142] INVESTIGACIÓN UC, 2021. EQUIPOS FINANCIADOS POR FONDEQUIP 2012-2020. [en línea], [Consulta: 20 marzo 2022]. Disponible en: <<https://investigacion.uc.cl/wp-content/uploads/2021/03/Equipos-Financiados-Fondequip-2012-2020.pdf>>.
- [143] NANO-MASTER, [sin fecha]. Space Simulation Systems. [en línea]. [Consulta: 20 marzo 2022]. Disponible en: <<http://www.nanomaster.com/spacesimulation.html>>.
- [144] Labtone, [sin fecha]. Vibration test equipment, Vibration Test Machine. [en línea]. [Consulta: 9 mayo 2022]. Disponible en: <<https://www.labvibrationtest.com/product/-vibration-test-machine.html>>.
- [145] GUIDECHEM. 9005-38-3 Sodium alginate Formula, NMR, Boiling Point, Density, Flash Point. [en línea], [sin fecha]. [Consulta: 16 noviembre 2021]. Disponible en: <<https://www.guidechem.com/dictionary/en/9005-38-3.html>>.
- [146] ÇENGEL, Y. A. y BOLES, M. A. 2011. Termodinámica. Apéndice 1. Tablas de propiedades, figuras y diagramas (unidades SI). 7ª ed. México, McGraw-Hill. 907p.
- [147] Calcium dichloride | CaCl₂ - PubChem. [en línea], [sin fecha]. [Consulta: 23 noviembre 2021]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Calcium-dichloride>.
- [148] STEFFEN'S CHEMISTRY PAGES, [sin fecha]. Density of sulfuric acid and sulfur trioxide. [en línea]. [Consulta: 8 diciembre 2021]. Disponible en: <<https://wissen.science-and-fun.de/chemistry/chemistry/density-tables/density-of-sulfuric-acid-and-sulfur-trioxide/>>.
- [149] LEWIS K.A., TZILIVAKIS J., WARNER D. & GREEN A. (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 22(4), 1050-1064. DOI: 10.1080/10807039.2015.1133242
- [150] CHEMBK, [sin fecha]. Dextrin. [en línea]. [Consulta: 6 diciembre 2021]. Disponible en: <<https://www.chembk.com/en/chem/Dextrin>>.

- [151] SIDLEY CHEMICAL, [sin fecha]. Physical property of HydroxyPropyl MethylCellulose(HPMC). [en línea]. [Consulta: 6 diciembre 2021]. Disponible en: <<https://celluloseether.com/hydroxy-propyl-methyl-cellulose-hpmc/>>.
- [152] GADGETS CUINA, [sin fecha]. Tazas, cucharadas y cucharitas. Técnicas - Trucos de cocina [en línea]. [Consulta: 14 enero 2022]. Disponible en: <https://www.gadgetsuina.com/blog/es/blogs/tasses-cullerades-i-culleretes-12/>.
- [153] COMISIÓN DE 30 DE MAYO DE 2008, 2008. REGLAMENTO (CE) N° 440/2008. [en línea]. [Consulta: 20 enero 2022]. Disponible en: <<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R0440-20160304&from=FR>>.
- [154] INSTRUMENTS, M., 2007. Zetasizer Nano User Manual MAN0485 Issue 1.1 April 2013 English.

Anexos

Anexo A

Cálculos para la demostración de la microgravedad

A.1. Fuerza de gravedad

$$g_s = 6,67 \cdot 10^{-11} \left[\frac{N \cdot m^2}{kg^2} \right] \cdot \frac{5,97 \cdot 10^{24} [kg]}{(6876 [km])^2} \quad (A.1)$$

$$g_s = 6,67 \cdot 10^{-11} \left[\frac{\frac{kg \cdot m}{s^2} \cdot m^2}{kg^2} \right] \cdot \frac{5,97 \cdot 10^{24} [kg]}{(6876000 [m])^2}$$

$$g_s = 6,67 \cdot 10^{-11} \left[\frac{\cancel{kg} \cdot m^3}{\cancel{kg^2} \cdot s^2} \right] \cdot \frac{5,97 \cdot 10^{24} [\cancel{kg}]}{4,73 \cdot 10^{13} [m^2]}$$

$$g_s = 8,4 \left[\frac{m}{s^2} \right]$$

A.2. Velocidad tangencial

$$F_c = F_g \implies \frac{m \cdot v^2}{r} = G \cdot \frac{m_1 \cdot m}{r^2} \implies v^2 = \frac{G \cdot m_1}{r}$$

$$v^2 = \frac{6,7 \cdot 10^{-11} \left[\frac{N \cdot m^2}{kg^2} \right] \cdot 5,97 \cdot 10^{24} [kg]}{6876000 [m]} \quad (\text{A.2})$$

$$v^2 = \frac{6,7 \cdot 10^{-11} \left[\frac{kg \cdot m}{s^2} \cdot m^2 \right] \cdot 5,97 \cdot 10^{24} [kg]}{6876000 [m]}$$

$$v^2 = \frac{6,7 \cdot 10^{-11} \left[\frac{kg \cdot m}{s^2} \cdot m^2 \right] \cdot 5,97 \cdot 10^{24} [kg]}{6876000 [m]}$$

$$v^2 = 58171902,3 \left[\frac{m^2}{s^2} \right]$$

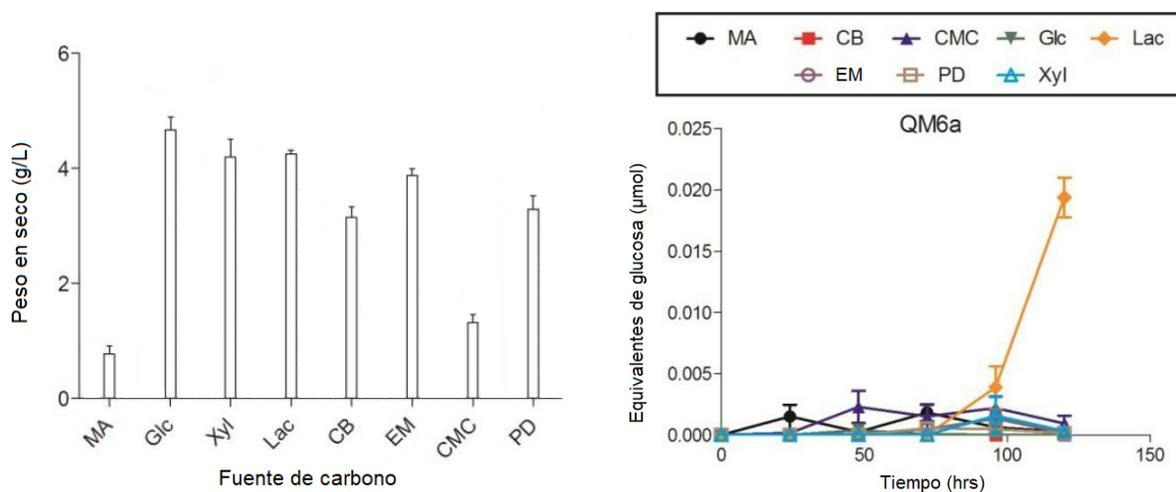
$$v = 7627,1 \left[\frac{m}{s} \right] \cdot \frac{1 [km]}{1000 [m]}$$

$$\boxed{v = 7,6 \left[\frac{km}{s} \right]}$$

Anexo B

Fuentes de carbono

B.1. Fuentes de carbono solubles



(a) Peso seco al cultivar el hongo en matraces de agitación durante 5 días a 30 °C (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].

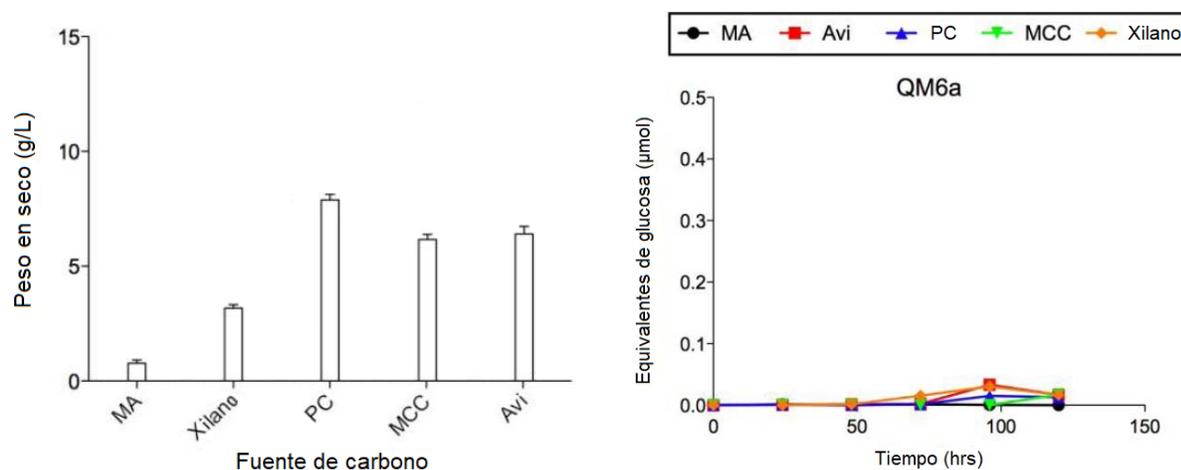
(b) Actividad de celulasa total al cultivar el hongo en MA-medio suplementado con 1% de las diferentes fuentes de carbono soluble por un periodo de tiempo de 24 a 120 horas; las barras de error indican el error estándar de la media [35].

Figura B.1: Efecto de las diferentes fuentes de carbono soluble sobre la tasa de crecimiento y la actividad de celulasa total de la cepa QM6a de *T. reesei* [35].



Figura B.2: Comparación del crecimiento de la cepa QM6a de *T. reesei* en las diferentes fuentes de carbono soluble después de 4 días (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].

B.2. Fuentes de carbono polisacáridos puros e insolubles



(a) Peso seco al cultivar el hongo en matraces de agitación durante 5 días a 30 °C (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].

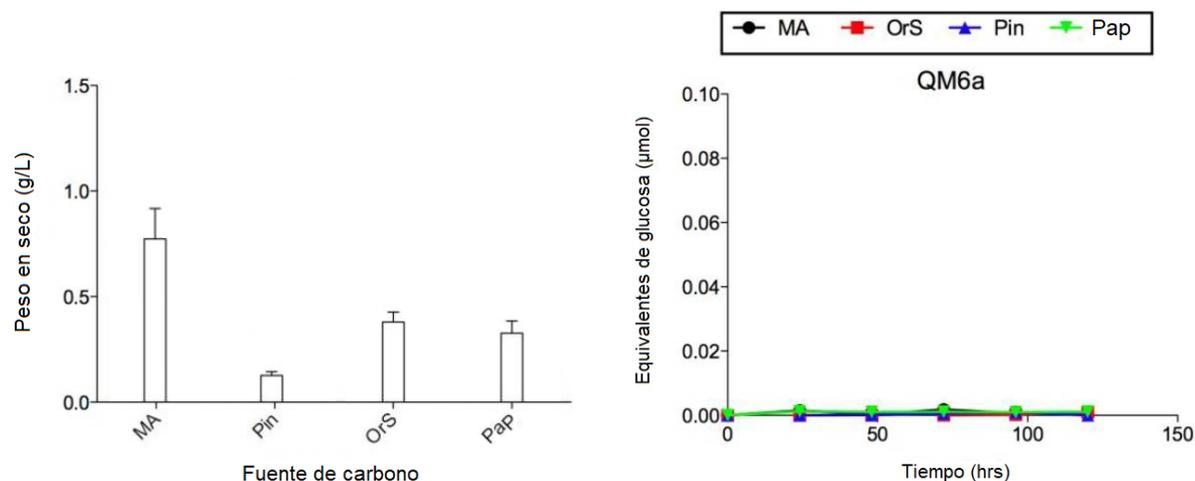
(b) Actividad de celulasa total al cultivar el hongo en MA-medio suplementado con 1% de las diferentes fuentes de carbono de polisacáridos puros insolubles por un periodo de tiempo de 24 a 120 horas; las barras de error indican el error estándar de la media [35].

Figura B.3: Efecto de las diferentes fuentes de carbono de polisacáridos puros insolubles sobre la tasa de crecimiento y la actividad de celulasa total de la cepa QM6a de *T. reesei* [35].



Figura B.4: Comparación del crecimiento de la cepa QM6a de *T. reesei* en las diferentes fuentes de carbono de polisacáridos puros insolubles después de 4 días (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].

B.3. Fuentes de carbono lignocelulosas e insolubles



(a) Peso seco al cultivar el hongo en matraces de agitación durante 5 días a 30 °C (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].

(b) Actividad de celulasa total al cultivar el hongo en MA-medio suplementado con 1% de las diferentes fuentes de carbono lignocelulósico insoluble por un periodo de tiempo de 24 a 120 horas; las barras de error indican el error estándar de la media [35].

Figura B.5: Efecto de las diferentes fuentes de carbono lignocelulósico insoluble sobre la tasa de crecimiento y la actividad de celulasa total de la cepa QM6a de *T. reesei* [35].



Figura B.6: Comparación del crecimiento de la cepa QM6a de *T. reesei* en las diferentes fuentes de carbono lignocelulósico insoluble después de 4 días (adaptación de Dashtban et al., 2011) [35].

Anexo C

Diámetro promedio de esporas

C.1. *Trichoderma reesei*

Primero se carga la figura base en la plataforma de *Plotdigitizer*, situación que se ve tal como se presenta en la Figura C.1. Y se define los puntos de referencia del eje X para medir los diámetros, utilizando la escala incluida en la imagen.

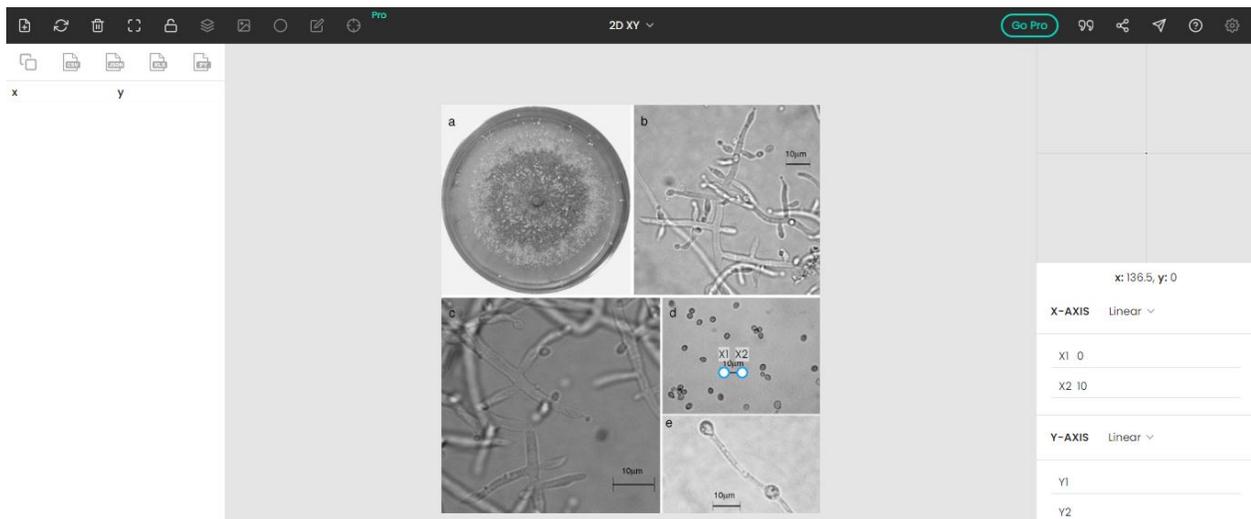


Figura C.1: Imagen de *T. reesei* cargada en la plataforma.

Debido al pequeño tamaño de las esporas del organismo estudiado, se opta por cargar únicamente el fragmento de interés de la Figura 2.2, correspondiente a la sección (d). Luego, manualmente, se marcan los bordes de cada spora presente en la imagen, tal como se muestra en la Figura C.2. Al realizar el proceso antes descrito, el programa se encarga de proyectar en el eje X, previamente demarcado, los puntos seleccionados, obteniendo, así, una serie de valores que permitirán determinar posteriormente el diámetro aproximado de cada una de las esporas visibles en la imagen.

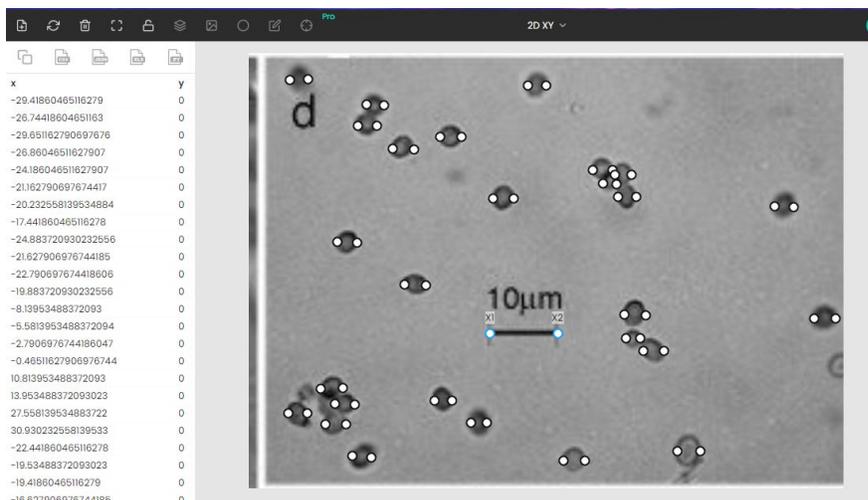


Figura C.2: Imagen de *T. reesei* cargada en la plataforma y con los diámetros marcados.

Posteriormente, se extrae, en un archivo .csv, los datos obtenidos en la plataforma y se organizan para trabajar con ellos. Luego, considerando que los datos se encuentran en pares y que cada pareja define el diámetro de cada espora, se determina el valor aproximado de este parámetro.

Tabla C.1: Datos obtenidos relativos a *T. reesei*.

Proyección en eje X	Diámetro aproximado [μm]
-29,4	2,7
-26,7	
-29,7	2,8
-26,9	
-24,2	3,0
-21,2	
-20,2	2,8
-17,4	
-24,9	3,3
-21,6	
-22,8	2,9
-19,9	
-8,1	2,6
-5,6	
-2,8	2,3
-0,5	
10,8	3,1
14,0	
27,6	3,4
30,9	
-22,4	2,9
-19,5	

Continúa en la página siguiente

Tabla C.1 – *Continuación de la página anterior*

Proyección en eje X	Diámetro aproximado [μm]
-19,4	2,8
-16,6	
-18,1	2,6
-15,6	
-14,3	3,1
-11,1	
-7,3	3,1
-4,2	
-12,6	3,1
-9,4	
0,5	3,0
3,5	
5,6	2,7
8,3	
15,1	2,9
18,0	
18,4	2,4
20,8	
16,6	2,0
18,6	
18,8	2,7
21,5	
19,8	3,1
22,9	
20,0	2,1
22,1	
22,6	3,0
25,6	
47,7	3,1
50,8	
41,9	2,8
44,7	

Finalmente, se calcula el promedio de estos valores, obteniendo que el diámetro promedio aproximado de las esporas de *T. reesei* es de $2,8 \pm 0,3$ [μm].

C.2. *Trichoderma asperellum*

Primero se carga la figura base en la plataforma de *Plottdigitizer*, situación que se ve tal como se presenta en la Figura C.3. Y se define los puntos de referencia del eje X para medir los diámetros, utilizando la escala incluida en la imagen.

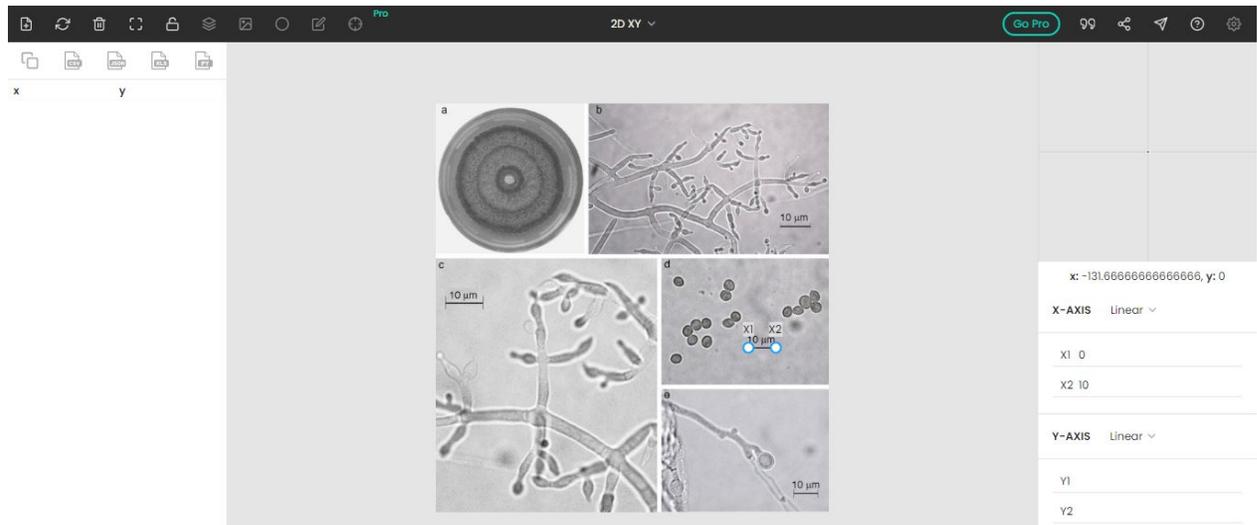


Figura C.3: Imagen de *T. asperellum* cargada en la plataforma.

Luego, manualmente, se marcan los bordes de cada espora presente en la imagen, tal como se muestra en la Figura C.4. Al realizar el proceso antes descrito, el programa se encarga de proyectar en el eje X, previamente demarcado, los puntos seleccionados, obteniendo, así, una serie de valores que permitirán determinar posteriormente el diámetro aproximado de cada una de las esporas visibles en la imagen.

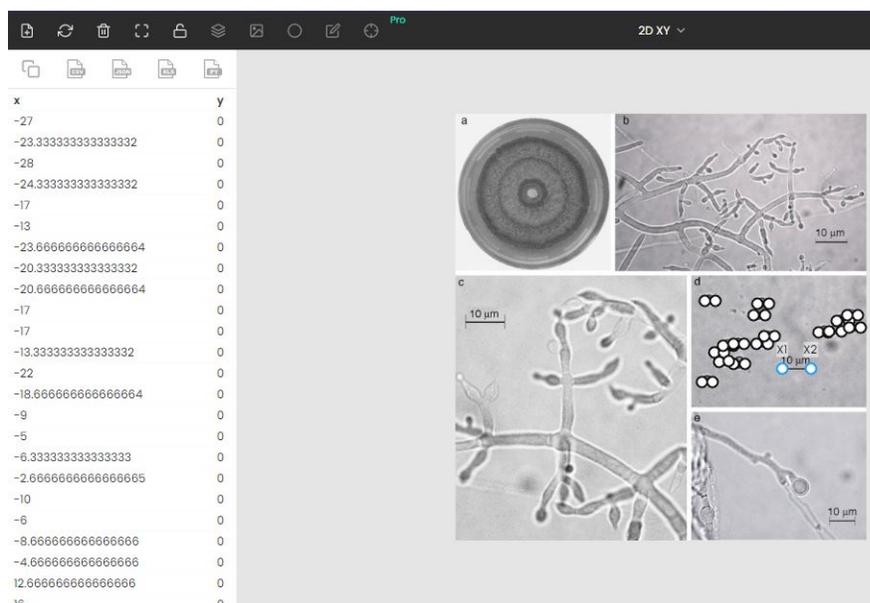


Figura C.4: Imagen de *T. asperellum* cargada en la plataforma y con los diámetros marcados.

Posteriormente, se extrae, en un archivo .csv, los datos obtenidos en la plataforma y se organizan para trabajar con ellos. Luego, considerando que los datos se encuentran en pares y que cada pareja define el diámetro de cada espora se determina el valor aproximado de este parámetro.

Tabla C.2: Datos obtenidos relativos a *T. asperellum*.

Proyección en eje X	Diámetro aproximado [μm]
-27,0	3,7
-23,3	
-28,0	3,7
-24,3	
-17,0	4,0
-13,0	
-23,7	3,3
-20,3	
-20,7	3,7
-17,0	
-17,0	3,7
-13,3	
-22,0	3,3
-18,7	
-9,0	4,0
-5,0	
-6,3	3,7
-2,7	
-10,0	4,0
-6,0	
-8,7	4,0
-4,7	
12,7	3,3
16,0	
16,3	4,3
20,7	
19,0	4,3
23,3	
22,7	3,7
26,3	
23,3	4,0
27,3	

Finalmente, se calcula el promedio de estos valores, obteniendo que el diámetro promedio aproximado de las esporas de *T. asperellum* es de $3,8 \pm 0,3$ [μm].

Anexo D

Determinación de costos

En los siguientes apartados se presenta la determinación de costos de todos los materiales utilizados en cada una de las metodologías presentadas como viables.

D.1. Gelificación iónica

En el Capítulo 6 se detallaron los materiales e instrumentos necesarios para desarrollar el encapsulamiento vía gelificación iónica. Así, el primer material corresponde a esporas, con el fin de preparar una suspensión que tenga una concentración de $2 \cdot 10^4$ MS/mL y una concentración de esporas de $1 \cdot 10^9$ esporas/mL, de la cual se utilizarán 250 mL. Así, primero se determina la cantidad de esporas necesaria para realizar el procedimiento, como se muestra en la Ecuación D.1.

$$N_{\text{esporas}} = 1 \cdot 10^9 \left[\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} \right] \cdot 250 [\text{mL}] = 2,5 \cdot 10^{11} [\text{esporas}] \quad (\text{D.1})$$

Para poder determinar el volumen necesario de esporas se utiliza información relativa a modelamiento de las esporas, la que se puede encontrar en el Capítulo 2, en la Sección 2.1. Se asume que las esporas tienen la mayor longitud de los ejes posible, es decir, se sobreestima el volumen de esporas presentado en la Subsección 2.1.1, con el fin de asegurar la obtención de estos. Así, se puede determinar el volumen de esporas que se requiere para llevar a cabo la metodología de gelificación iónica, tal como se muestra en la Ecuación D.2.

$$V_{\text{esporas}} = 2,5 \cdot 10^{11} [\text{esporas}] \cdot 36,6 \left[\frac{\mu\text{m}^3}{\text{espora}} \right] = 9,15 \cdot 10^{12} [\mu\text{m}^3] \quad (\text{D.2})$$

$$9,15 \cdot 10^{12} [\mu\text{m}^3] \cdot \frac{1 \cdot 10^{-12} [\text{mL}]}{1 [\mu\text{m}^3]} = 9,15 [\text{mL}] \quad (\text{D.3})$$

Se sabe que por cada placa de Petri que se cultive con el organismo *T. reesei* se pueden

obtener de 20 a 50 μL de esporas. Así, se asume el número promedio entre estos valores, es decir 35 μL . Con esto se puede determinar la cantidad aproximada de placas que es necesario cultivar para obtener el volumen de esporas requerido por la metodología, tal tal como se muestra en la Ecuación D.4.

$$N_{\text{placas}}^{\circ} = \frac{9,15 [\text{mL}]}{35 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{placa}} \right]} \cdot \frac{1000 [\mu\text{L}]}{1 [\text{mL}]} = 261,4 [\text{placa}] \quad (\text{D.4})$$

Además, se determina el volumen de agua utilizado para generar esta suspensión, como se muestra en la Ecuación D.5.

$$V_{\text{agua}} = V_{\text{suspensión}} - V_{\text{esporas}} = 250 [\text{mL}] - 9,15 [\text{mL}] = 240,9 [\text{mL}] \quad (\text{D.5})$$

Así, considerando que el costo de 5 L del agua destilada Datrak en Easy tiene un valor de \$1.690, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.6.

$$C_{\text{agua}} = \frac{240,9 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$81,41} \quad (\text{D.6})$$

Por otro lado, se requiere un volumen de 600 mL de agua destilada estéril, cuyo costo ya fue mencionado, por lo que se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.7.

$$C_{\text{agua}} = \frac{600 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$202,8} \quad (\text{D.7})$$

También, se necesitan 20 gramos de una solución de alginato de sodio 2% p/v, por lo anterior se determina la masa de cada componente de esta solución. Primero se debe considerar que la fracción p/v se refiere a lo siguiente:

$$\% \frac{p}{v} = 100 \% \cdot \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{volumen de solución (mL)}}$$

Tomando una base de cálculo de 1000 mL de solución, la que se denota como BC, y considerando como solvente agua destilada, se puede determinar la masa de alginato de sodio necesaria, como se muestra en la Ecuación D.8.

$$m_{\text{alginato}}^{BC} = \frac{2 \% \frac{p}{v} \cdot 1000 [\text{mL}]}{100 \%} = 20 [\text{g}] \cdot \frac{1 [\text{kg}]}{1000 [\text{g}]} = 2 \cdot 10^{-2} [\text{kg}] \quad (\text{D.8})$$

A continuación, se determina el volumen de esta masa de alginato de sodio, considerando que su densidad es 1,0 g/cm³ [145], tal como se muestra en la Ecuación D.9.

$$V_{alginato}^{BC} = \frac{20 [g]}{1,0 \left[\frac{g}{cm^3} \right]} = 20 [cm^3] \cdot \frac{1 [mL]}{1 [cm^3]} = 20 [mL] \quad (D.9)$$

Luego, se determina el volumen de agua utilizado para esta solución de base de cálculo, como se muestra en la Ecuación D.10.

$$V_{agua}^{BC} = V_{solución} - V_{alginato} = 1000 [mL] - 20 [mL] = 980 [mL] \quad (D.10)$$

Sabiendo que la densidad del agua es de 1000 kg/m³ [146], se puede determinar la masa de agua utilizada, como se muestra en la Ecuación D.11.

$$m_{agua}^{BC} = 980 [mL] \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] \cdot \frac{1 [m^3]}{1000000 [mL]} = 0,98 [kg] \quad (D.11)$$

Debido a que más del 99 % de la solución corresponde a agua, se asume que la densidad de la solución se puede aproximar a la densidad del agua. Así, se tiene que la densidad es la mencionada anteriormente, entonces:

$$m_{solución}^{BC} = 1000 [mL] \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] \cdot \frac{1 [m^3]}{1000000 [L]} = 1 [kg]$$

Con todo lo anterior, se puede hacer un relación de proporcionalidad entre la masa de solución y la masa de soluto. Por otro lado, también se puede plantear una relación de proporcionalidad entre la masa de solución y la masa de solvente.

$$\frac{m_{solución}}{m_{soluto}} = \frac{1 [kg]}{2 \cdot 10^{-2} [kg]} = \frac{1}{2 \cdot 10^{-2}}$$

$$\frac{m_{solución}}{m_{solvente}} = \frac{1 [kg]}{0,98 [kg]} = \frac{1}{0,98}$$

Así, utilizando las razones encontradas y considerando que para el método de encapsulación se requieren 20 gramos de esta solución, se determina la cantidad de alginato de sodio y de agua destilada adicional que se requiere, como se muestra en la Ecuación D.12 y D.13.

$$\frac{m_{solución}}{m_{soluto}} = \frac{1}{2 \cdot 10^{-2}} = \frac{20 [g]}{x} \implies m_{alginato} = 0,4 [g] \quad (D.12)$$

$$V_{alginato} = \frac{0,4 [g]}{1 \left[\frac{g}{cm^3} \right]} \cdot \frac{1 [mL]}{1 [cm^3]} = 0,4 [mL]$$

$$\frac{m_{\text{solución}}}{m_{\text{solvente}}} = \frac{1}{0,98} = \frac{20 [g]}{x} \implies m_{\text{agua}} = 19,6 [g] \quad (\text{D.13})$$

$$V_{\text{agua}} = \frac{19,6 [g]}{1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right]} \cdot \frac{1 [kg]}{1000 [g]} \cdot \frac{1000000 [mL]}{1 [m^3]} = 19,6 [mL]$$

Considerando la información ya mencionada sobre costos de agua, se puede determinar el costo de formar esta solución, como se presenta en la Ecuación D.14.

$$C_{\text{agua}} = \frac{19,6 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$6,62} \quad (\text{D.14})$$

Luego, se determina el costo del alginato de sodio requerido, considerando que 1 kg de alginato de sodio Sigma-Aldrich tiene un valor de \$171.000, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.15

$$C_{\text{alginato}} = \frac{0,4 [g] \cdot \$171000}{1000 [g]} = \boxed{\$68,4} \quad (\text{D.15})$$

A continuación, se completa el volumen con agua destilada hasta alcanzar 1000 mL. Para determinar el agua que se debe añadir se realiza un balance de masa, el que se muestra en la Ecuación D.16, considerando los 600 mL de agua destilada inicial, los 250 mL de la suspensión con contenido fúngico y los volúmenes determinados de agua y alginato de sodio para la solución de alginato de sodio.

$$1000 [mL] = 600 [mL] + 250 [mL] + 0,4 [mL] + 19,6 [mL] + V_{\text{agua final}} \quad (\text{D.16})$$

$$V_{\text{agua final}} = 130 [mL]$$

Así, con la información ya mencionada, se calcula el costo de añadir este último volumen de agua destilada, como se muestra en la Ecuación D.17.

$$C_{\text{agua}} = \frac{130 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$43,94} \quad (\text{D.17})$$

Finalmente, para llevar a cabo la encapsulación, se extruye la solución de alginato de sodio y contenido fúngico sobre 1 litro de solución de cloruro de calcio 0,2 M. Por lo que primero se requiere determinar la cantidad de masa del soluto, correspondiente a cloruro de calcio, y la masa del solvente de la solución, la que se asumirá como agua destilada.

$$0,2 [M] = \frac{0,2 [\text{mol de soluto}]}{1 [\text{L de solución}]}$$

Considerando que el peso molecular del cloruro de calcio que se declara en Sigma Aldrich corresponde a 110,98 gramos por mol, se puede determinar los gramos que se requieren de este compuesto puro, como se muestra en la Ecuación D.18.

$$m_{\text{cloruro de calcio}} = 0,2[\text{mol}] \cdot 110,98 \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right] = 22,196 [\text{g}] \quad (\text{D.18})$$

Así, considerando que 100 gramos de cloruro de calcio deshidratado en polvo con una pureza $\geq 97\%$ en Sigma Aldrich tiene un valor de \$66.800, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.19.

$$C_{\text{cloruro de calcio}} = \frac{22,196 [\text{g}] \cdot \$66800}{100 [\text{g}]} = \boxed{\$14827} \quad (\text{D.19})$$

Por otro lado, se requiere determinar la cantidad de disolvente necesario, que como ya se mencionó, se asume que corresponde a agua destilada. Para esto, primero se determina el volumen del soluto, utilizando la masa determinada anteriormente y una densidad de 2,15 gramos por centímetro cúbico [147], como se muestra en la Ecuación D.20.

$$V_{\text{cloruro de calcio}} = \frac{22,196 [\text{g}]}{2,15 \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]} = 10,32 [\text{cm}^3] \cdot \frac{1 [\text{mL}]}{1 [\text{cm}^3]} = 10,32 [\text{mL}] \quad (\text{D.20})$$

A continuación, en la Ecuación D.21, se determina el volumen de solvente que se debe añadir, considerando que el volumen de la solución corresponde a 1 L y que esto es igual a 1000 mL.

$$V_{\text{agua}} = 1000 [\text{mL}] - 10,32 [\text{mL}] = 989,68 [\text{mL}] \quad (\text{D.21})$$

Con esto, se determina el costo de este volumen de agua destilada a utilizar, como se muestra en la Ecuación D.22.

$$C_{\text{agua}} = \frac{989,68 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$334,5} \quad (\text{D.22})$$

Luego de obtener las perlas, estas son lavadas con agua destilada, con el fin de eliminar los excesos de cloruro de calcio. Se asume que se utilizan 500 mL de agua destilada para este propósito, considerando la información mencionada previamente, se determina el costo de esta etapa, como se muestra en la Ecuación D.23.

$$C_{\text{agua}} = \frac{500 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$169} \quad (\text{D.23})$$

D.2. Montaje LbL

Antes de presentar la determinación de costos de la metodología «*layer by layer*», se hace la salvedad de que los cálculos que aquí se presentan consideran que la lignina kraft utilizada presenta la misma cantidad molar de grupos OH por gramo de material. De tal manera, para replicar esta metodología se requiere incuestionablemente determinar la cantidad de moles de grupos OH contenidos por gramo de lignina kraft, siguiendo las relaciones molares que se presentan en el documento científico de donde se extrajo esta información.

En el Capítulo 6 se detallaron los materiales e instrumentos necesarios para desarrollar el encapsulamiento por la metodología capa por capa. Para preparar la lignina catiónica primero se requiere 1 gramo de lignina Kraft y considerando que en Sigma-Aldrich 100 gramos de lignina alkali tiene un valor de \$146.000, se determina en la Ecuación D.24 el costo de este material.

$$C_{\text{lignina alkali}} = \frac{1 [\text{g}] \cdot \$146000}{100 [\text{g}]} = \boxed{\$1460} \quad (\text{D.24})$$

Además, en la misma página de Sigma-Aldrich se declara que el producto lignina alkali que comercializa la marca tiene una densidad de 1,3 gramos por mL, por lo que se puede determinar el volumen de este material, como se muestra en la Ecuación D.25.

$$V_{\text{lignina alkali}} = \frac{1 [\text{g}]}{1,3 \left[\frac{\text{g}}{\text{mL}} \right]} = 0,77 [\text{mL}] \quad (\text{D.25})$$

Luego, esta masa de lignina alkali se debe disolver en 99 gramos de una solución de hidróxido de sodio 0,2 M, la que se asumirá que tiene como disolvente agua destilada. Por otro lado, considerando que la concentración de NaOH es baja, se asume que la solución tiene una densidad idéntica a la del agua destilada, es decir 1000 kg/m³ [146], por lo que se puede determinar así el volumen de la solución utilizada, tal como se muestra en la Ecuación D.26.

$$V_{\text{solución de NaOH}} = \frac{99 [\text{g}]}{1000 \left[\frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right]} \cdot \frac{1 [\text{kg}]}{1000 [\text{g}]} = 9,9 \cdot 10^{-5} [\text{m}^3] \quad (\text{D.26})$$

$$9,9 \cdot 10^{-5} [\text{m}^3] \cdot \frac{1 \cdot 10^6 [\text{mL}]}{1 [\text{m}^3]} = 99 [\text{mL}]$$

$$99 [\text{mL}] \cdot \frac{1 [\text{L}]}{1000 [\text{mL}]} = 0,1 [\text{L}]$$

Así, conociendo el volumen de la solución y su concentración molar se puede determinar la cantidad molar de soluto o hidróxido de sodio requerida, tal como se muestra en la Ecuación D.27.

$$n_{NaOH} = \frac{0,1 [L] \cdot 0,2 [mol]}{1 [L]} = 0,02 [mol] \quad (D.27)$$

Por otro lado, se tiene que en Sigma-Aldrich 25 gramos de hidróxido de sodio en polvo con 97% de pureza tiene un valor de \$60.800; además, declara que tiene un peso molecular de 40 gramos por mol. Considerando lo anterior, se puede determinar la masa requerida de hidróxido de sodio para formar esta solución, tal como se muestra en la Ecuación D.28.

$$m_{NaOH} = 0,02 [mol] \cdot 40 \left[\frac{g}{mol} \right] = 0,8 [g] \quad (D.28)$$

Por otro lado, habiendo ya mencionado el precio de este producto, se procede a calcular el costo de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.29 el costo de este material.

$$C_{NaOH} = \frac{0,8 [g] \cdot \$60800}{25 [g]} = \boxed{\$1926} \quad (D.29)$$

También, se rescata desde la página de Sigma-Aldrich que la densidad del hidróxido de sodio mencionado corresponde a 2,13 gramos por centímetro cúbico, así, se puede determinar el volumen de este material, como se muestra en la Ecuación D.30.

$$V_{NaOH} = \frac{0,8 [g]}{2,13 \left[\frac{g}{cm^3} \right]} = 0,4 [cm^3] \cdot \frac{1 [mL]}{1 [cm^3]} = 0,4 [mL] \quad (D.30)$$

Luego, se determina el volumen de agua destilada utilizada para generar esta solución, tal como se muestra en la Ecuación D.31.

$$V_{agua} = V_{solución} - V_{NaOH} = 99 [mL] - 0,4 [mL] = 98,6 [mL] \quad (D.31)$$

Con esto, y sabiendo que el costo de 5 L del agua destilada Datrak en Easy tiene un valor de \$1.690, se determina el costo de este volumen de agua destilada a utilizar, como se muestra en la Ecuación D.32.

$$C_{agua} = \frac{98,6 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$33,34} \quad (D.32)$$

A continuación, a la solución de lignina y NaOH se añaden 2,58 gramos de GTAC, considerando que 50 mililitros de este producto en Sigma-Aldrich tiene un valor de \$111.000, se requiere en primera instancia determinar el volumen de este material. Considerando, que en la misma página de Sigma-Aldrich se declara que el producto GTAC que comercializa la marca tiene una densidad de 1,13 gramos por mililitro, por lo que se puede determinar el volumen de este material, como se muestra en la Ecuación D.33.

$$V_{GTAC} = \frac{2,58 [g]}{1,13 \left[\frac{g}{mL} \right]} = 2,3 [mL] \quad (D.33)$$

Considerando lo anterior, es posible determinar el costo de de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.34.

$$C_{GTAC} = \frac{2,3 [mL] \cdot \$111000}{50 [mL]} = \boxed{\$5069} \quad (D.34)$$

Posteriormente, de debe neutralizar la solución utilizando ácido sulfúrico al 10 % p/p. Por lo que primero, se debe tener presente que la composición de la solución corresponde a la expresión que se muestra en la Ecuación D.35.

$$\% \frac{p}{p} = \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{masa de solución (g)}} \cdot 100 \% \quad (D.35)$$

Así, primero se determina la concentración molar de ácido sulfúrico que efectivamente hay en tal solución, considerando que la densidad de una solución de ácido sulfúrico (H_2SO_4) a la composición ya mencionada y a $20^\circ C$ es de 1,0661 gramos por centímetro cúbico [148], además, se tiene que en Sigma-Aldrich se declara que este producto tiene un peso molecular de 98,08 gramos por mol, así es posible determinar lo buscado, tal como se muestra en la Ecuación D.36.

$$M_{H_2SO_4} = \frac{0,1 [g^*]}{1 [g^*]} \cdot 1,0661 \left[\frac{g^*}{cm^3^*} \right] \cdot \frac{1000 [cm^3^*]}{1 [L^*]} \cdot \frac{1}{98,08 \left[\frac{g^*}{mol^*} \right]} \quad (D.36)$$

Donde:

- * corresponde al soluto.
- ⊗ corresponde a la solución.

$$M_{H_2SO_4} = 1,09 \left[\frac{mol H_2SO_4}{L \text{ solución}} \right]$$

Por otro lado, al mezclar la solución de hidróxido de sodio con la lignina kraft, se altera la concentración molar, por lo que la concentración molar de NaOH ya no corresponde a 0,2 M. Por lo anterior, para determinar la cantidad necesaria de ácido sulfúrico requerida para la neutralización, es necesario determinar la nueva concentración de este soluto, tal como se presenta en la Ecuación D.37.

$$0,2 [M] \cdot 99 [\cancel{mL \text{ solución}}] = M_{NaOH}^2 \cdot 102,1 [\cancel{mL \text{ solución}}] \quad (D.37)$$

$$M_{NaOH}^2 = 0,19 [M]$$

Así, para cumplir con la neutralización se debe tener igualdad entre los moles de hidróxido de sodio y los moles de ácido sulfúrico.

$$0,19 \left[\frac{mol \ NaOH}{L} \right] \cdot 102,1 [mL] = 1,09 \left[\frac{mol \ H_2SO_4}{L} \right] \cdot V_{H_2SO_4} [mL] \quad (D.38)$$

$$V_{H_2SO_4 \ 10\%p/p} = 18,22 [mL]$$

Teniendo la cantidad de solución de ácido sulfúrico necesaria, se procede a determinar la cantidad de materiales necesarios para generarla. Es importante mencionar, además, que se asume que el disolvente de esta solución corresponde a agua destilada. Considerando que el ácido sulfúrico en Sigma-Aldrich con una pureza del 95 % tiene una densidad declarada por la empresa de 1,84 gramos por mililitro y que la cantidad másica del ácido debe mantenerse para cumplir con la neutralización, se procesa a determinar el volumen necesario de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.39.

$$0,1 \left[\frac{g \ H_2SO_4}{g \ sol.} \right] \cdot 1,0661 \left[\frac{g \ sol.}{mL \ sol.} \right] \cdot 18,22 [mL] = 0,95 \left[\frac{g \ H_2SO_4}{g \ sol.} \right] \cdot 1,84 \left[\frac{g \ sol.}{mL \ sol.} \right] \cdot V_{H_2SO_4} \quad (D.39)$$

$$V_{H_2SO_4} = 1,1 [mL]$$

Considerando que 100 mililitros del ácido sulfúrico con 95 % de pureza considerado tiene un valor de \$50.600 en Sigma-Aldrich, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.40.

$$C_{H_2SO_4}^{95\%} = \frac{1,1 [mL] \cdot \$50600}{100 [mL]} = \boxed{\$562} \quad (D.40)$$

También, se determina el volumen de agua destilada restante para completar la solución buscada, tal como se muestra en la Ecuación D.41.

$$V_{agua} = V_{solución} - V_{H_2SO_4} = 18,22 [mL] - 1,1 [mL] = 17,1 [mL] \quad (D.41)$$

Así, considerando que ya ha sido mencionado el valor de este material, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este, tal como se presenta en la Ecuación D.42.

$$C_{\text{agua}} = \frac{17,1 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$5,78} \quad (\text{D.42})$$

Los 120,3 mL solución ya neutralizada se dializa manualmente en un vaso de precipitado de 2 litros, con 1,5 litros de agua destilada por un periodo de 3 días, donde el agua destilada debe ser cambiada dos veces por día. Para evitar que queden pliegues en la membrana de diálisis se puede realizar este proceso en distintos vasos de precipitado, por lo que el agua aumentaría. Debido a lo anterior, se debe considerar el costo de la membrana de diálisis de 20 centímetros a utilizar y el agua destilada para desarrollar este procedimiento.

Así, considerando que 100 pies de membrana de diálisis de celulosa (14K MWCO) de 76 mm de diámetro en Sigma Aldrich tiene un valor de \$284.000, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.43.

$$C_{\text{membrana de diálisis}} = \frac{20 [\text{cm}] \cdot \$284000}{100 [\text{ft}]} \cdot \frac{1 [\text{ft}]}{30,48 [\text{cm}]} = \boxed{\$1864} \quad (\text{D.43})$$

En cuanto al agua destilada para desarrollar el proceso de diálisis, se debe contar con 1,5 litros cada doce horas, durante tres días, lo que corresponde a ese volumen multiplicado por seis. Es por lo anterior, que se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.44.

$$C_{\text{agua}} = \frac{9000 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$3042} \quad (\text{D.44})$$

Luego de dializar la solución, esta es lavada tres veces, donde cada una implica la adición de 300 mL de agua destilada, con el fin de eliminar residuos y la parte insoluble, habiendo ya mencionado el costo del agua destilada, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.45.

$$C_{\text{agua}} = \frac{900 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$304,2} \quad (\text{D.45})$$

El procedimiento antes descrito, permite obtener aproximadamente 0,5 gramos de lignina catiónica soluble en agua.

Luego de obtener la lignina catiónica, se preparan 50 mL de las soluciones de polielectrolitos, con una concentración de 0,2% en peso cada una. Primero se determina la cantidad de ligninsulfonato de sodio que se requiere para producir la solución polielectrolítica aniónica. Por lo anterior, se define la cantidad de masa que se requiere, utilizando la concentración que se desea obtener, como se muestra en la Ecuación D.46.

$$\frac{\%p}{p} = \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{masa de solución (g)}} \cdot 100\% \quad (\text{D.46})$$

Así, como se quiere obtener una solución de 50 mL se asume que la solución se prepara utilizando agua destilada como solvente y dado que la proporción de solvente es mayor que el soluto, se puede asumir que la densidad de la solución corresponde a la densidad del agua destilada, cuya densidad fue mencionada en la determinación de costos de la gelificación iónica, por lo que se puede determinar así la masa de lignosulfonato de sodio necesaria, tal como se muestra en la Ecuación D.47.

$$m_{\text{lignosulfonato}} = \frac{0,2\% \frac{p}{p} \cdot 50 [mL] \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right]}{100\%} \cdot \frac{1 [m^3]}{1 \cdot 10^6 [mL]} \cdot \frac{1000 [g]}{1 [kg]} = 0,1 [g] \quad (D.47)$$

Luego, se determina el costo del lignosulfonato de sodio requerido, considerando que 100 gramos de lignosulfonato de sodio Sigma-Aldrich tiene un valor de \$72.200, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.48

$$C_{\text{lignosulfonato}} = \frac{0,1 [g] \cdot \$72200}{100 [g]} = \boxed{\$72} \quad (D.48)$$

Una vez lo anterior, considerando que la densidad del lignosulfonato de sodio es de 0,5 g/mL [149], se determina el volumen de esta masa de lignosulfonato de sodio, tal como se muestra en la Ecuación D.49.

$$V_{\text{lignosulfonato}} = \frac{0,1 [g]}{0,5 \left[\frac{g}{mL} \right]} = 0,2 [mL] \quad (D.49)$$

Luego, se determina el volumen de agua utilizado para generar esta suspensión, como se muestra en la Ecuación D.50.

$$V_{\text{agua}} = V_{\text{solución}} - V_{\text{lignosulfonato}} = 50 [mL] - 0,2 [mL] = 49,8 [mL] \quad (D.50)$$

Así, sabiendo ya el valor del agua destilada, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.55.

$$C_{\text{agua}} = \frac{49,8 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$16,83} \quad (D.51)$$

De la misma forma, se deben preparar 50 mL de la solución polielectrolítica catiónica, con una concentración de 0,2% en peso de lignina catiónica. Para determinar la cantidad de lignina catiónica que se requiere se sigue un procedimiento análogo al caso de la solución aniónica, por lo que se hace uso de la Ecuación D.46. De igual forma, considerando los 50 mL de solución que se desean obtener, se asume que la solución se prepara utilizando agua destilada como solvente y dado que la proporción de solvente es mayor que el soluto, se

puede asumir que la densidad de la solución corresponde a la densidad del agua destilada, cuya densidad ya fue mencionada, por lo que se puede determinar así la masa de lignina cationica necesaria, tal como se muestra en la Ecuación D.52.

$$m_{\text{lignina cationica}} = \frac{0,2 \% \frac{p}{p} \cdot 50 [mL] \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right]}{100 \%} \cdot \frac{1 [m^3]}{1 \cdot 10^6 [mL]} \cdot \frac{1000 [g]}{1 [kg]} = 0,1 [g] \quad (D.52)$$

Los costos relacionados a este material se asocian netamente a su preparación, por lo que no se determina un costo adicional en este apartado, solo se determina el volumen de este, a modo de definir adecuadamente los requerimientos del procedimiento.

Así, se asume que la densidad de la lignina no sufre cambio significativos en el proceso de transformarla en un polielectrolito catiónico, por lo que se considera que tiene la densidad de 1,3 gramos por mL ya mencionada, con esto se puede determinar el volumen de este material, como se muestra en la Ecuación D.53.

$$V_{\text{lignina cationica}} = \frac{0,1 [g]}{1,3 \left[\frac{g}{mL} \right]} = 0,08 [mL] \quad (D.53)$$

Luego, se determina el volumen de agua utilizado para generar esta suspensión, como se muestra en la Ecuación D.54.

$$V_{\text{agua}} = V_{\text{solución}} - V_{\text{lignina cationica}} = 50 [mL] - 0,08 [mL] = 49,92 [mL] \quad (D.54)$$

Así, sabiendo ya el valor promedio del agua destilada, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.55.

$$C_{\text{agua}} = \frac{49,92 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$16,87} \quad (D.55)$$

El siguiente material corresponde a las esporas, debido a que se debe preparar una suspensión con agua destilada como solvente y esporas como soluto. La suspensión debe tener una concentración de $4,5 \cdot 10^7$ esporas/mL, de la cual se utilizarán 1 mL. Así, primero se determina la cantidad de esporas necesaria para realizar el procedimiento, como se muestra en la Ecuación D.56.

$$N_{\text{esporas}} = 4,5 \cdot 10^7 \left[\frac{\text{esporas}}{mL} \right] \cdot 1 [mL] = 4,5 \cdot 10^7 [\text{esporas}] \quad (D.56)$$

Para poder determinar el volumen necesario de esporas se utiliza información relativa a modelamiento de las esporas, tal como se mostró en la determinación de costos de gelificación iónica. Se asume que las esporas tienen la mayor longitud de los ejes posible, es decir, se

sobreestima el volumen de esporas, con el fin de asegurar la obtención de estos. Además de lo anterior, se asume el mismo volumen unitario de espora que se determinó en la subsección anterior, correspondiente a $36,6 \mu\text{m}^3$ por espora.

Con todo lo anterior, se puede determinar el volumen de esporas que se requiere para llevar a cabo la metodología de capa por capa, tal como se muestra en la Ecuación D.57.

$$V_{\text{esporas}} = 4,5 \cdot 10^7 [\text{esporas}] \cdot 36,6 \left[\frac{\mu\text{m}^3}{\text{espora}} \right] = 1,65 \cdot 10^9 [\mu\text{m}^3] \quad (\text{D.57})$$

$$1,65 \cdot 10^9 [\mu\text{m}^3] \cdot \frac{1 \cdot 10^{-12} [\text{mL}]}{1 [\mu\text{m}^3]} = 1,65 \cdot 10^{-3} [\text{mL}]$$

Se sabe que por cada placa de Petri que se cultive con el organismo *T. reesei* se pueden obtener de 20 a 50 μL de esporas. Así, se asume el número promedio entre estos valores, es decir 35 μL , con esto se puede determinar la cantidad aproximada de placas que es necesario cultivar para obtener el volumen de esporas requerido por la metodología, tal tal como se muestra en la Ecuación D.65.

$$N_{\text{placas}} = \frac{1,57 \cdot 10^{-3} [\text{mL}]}{35 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{placa}} \right]} \cdot \frac{1000 [\mu\text{L}]}{1 [\text{mL}]} = 0,05 [\text{placa}] \quad (\text{D.58})$$

Además, se determina el volumen de agua utilizado para generar esta suspensión, como se muestra en la Ecuación D.59.

$$V_{\text{agua}} = V_{\text{suspensión}} - V_{\text{esporas}} = 1 [\text{mL}] - 1,65 \cdot 10^{-3} [\text{mL}] \approx 1 [\text{mL}] \quad (\text{D.59})$$

Así, debido a que ya fue mencionado el valor del agua destilada, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.60.

$$C_{\text{agua}} = \frac{1 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$0,34} \quad (\text{D.60})$$

Finalmente, a la suspensión de esporas se le debe añadir un nuevo volumen de 0,5 mL de agua estéril, por lo que se calcula el costo de esta agua destilada en la Ecuación D.61.

$$C_{\text{agua}} = \frac{0,5 [\text{mL}] \cdot \$1690}{5000 [\text{mL}]} = \boxed{\$0,17} \quad (\text{D.61})$$

D.3. Secado por aspersión

En el Capítulo 6 se detallaron los materiales e instrumentos necesarios para desarrollar el encapsulamiento vía secado por aspersión. Primero, se preparan 10 mL de de una suspensión fúngica con una concentración de esporas de $2,5 \cdot 10^6$ esporas por mL, por lo que se parte por determinar la cantidad de esporas necesaria, tal como se muestra en la Ecuación D.62.

$$N_{\text{esporas}} = 2,5 \cdot 10^6 \left[\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} \right] \cdot 10 [\text{mL}] = 2,5 \cdot 10^7 [\text{esporas}] \quad (\text{D.62})$$

Para poder determinar el volumen necesario de esporas, se utiliza información relativa a modelamiento de las esporas, tal como se mostró en la determinación de costos de gelificación iónica. Se asume que las esporas tienen la mayor longitud de los ejes posible, es decir, se sobreestima el volumen de esporas, con el fin de asegurar la obtención de estos. Además de lo anterior, se asume el mismo volumen unitario de espora que se determinó en la subsección de costos de gelificación iónica, correspondiente a $36,6 \mu\text{m}^3$ por espora.

Con todo lo anterior, se puede determinar el volumen de esporas que se requiere para llevar a cabo la metodología de secado por aspersión, tal como se muestra en la Ecuación D.63.

$$V_{\text{esporas}} = 2,5 \cdot 10^7 [\text{esporas}] \cdot 36,6 \left[\frac{\mu\text{m}^3}{\text{espora}} \right] = 9,15 \cdot 10^8 [\mu\text{m}^3] \quad (\text{D.63})$$

$$9,15 \cdot 10^8 [\mu\text{m}^3] \cdot \frac{1 \cdot 10^{-12} [\text{mL}]}{1 [\mu\text{m}^3]} = 9,15 \cdot 10^{-4} [\text{mL}] \quad (\text{D.64})$$

Se sabe que por cada placa de Petri que se cultive con el organismo *T. reesei*, se pueden obtener de 20 a 50 μL de esporas. Así, se asume el número promedio entre estos valores, es decir 35 μL , con esto se puede determinar la cantidad aproximada de placas que es necesario cultivar para obtener el volumen de esporas requerido por la metodología, tal tal como se muestra en la Ecuación D.65.

$$N_{\text{placas}}^{\circ} = \frac{8,73 \cdot 10^{-4} [\text{mL}]}{35 \left[\frac{\mu\text{L}}{\text{placa}} \right]} \cdot \frac{1000 [\mu\text{L}]}{1 [\text{mL}]} = 0,03 [\text{placa}] \quad (\text{D.65})$$

Además, se determina el volumen de agua utilizado para generar esta suspensión, como se muestra en la Ecuación D.66.

$$V_{\text{agua}} = V_{\text{suspensión}} - V_{\text{esporas}} = 10 [\text{mL}] - 9,15 \cdot 10^{-4} [\text{mL}] \approx 10 [\text{mL}] \quad (\text{D.66})$$

Así, debido a que el costo de 5 L del agua destilada Datrak en Easy tiene un valor de \$1.690, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.67.

$$C_{\text{agua}} = \frac{10 \text{ [mL]} \cdot \$1690}{5000 \text{ [mL]}} = \boxed{\$3,38} \quad (\text{D.67})$$

Luego, se preparan 90 mL de una solución compuesta de dextrina al 10 % p/v, HPMC al 0,03 % p/v, leche descremada al 10 % p/v y quitosano al 0,5 % p/v. Por lo anterior, se determina la masa de cada componente de esta solución, considerando que la fracción p/v se refiere a lo siguiente:

$$\% \frac{p}{v} = 100 \% \cdot \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{volumen de solución (mL)}}$$

Considerando lo anterior y asumiendo el solvente como agua destilada, se puede determinar la masa necesaria de cada uno de los componentes de la solución. Primero, en la Ecuación D.68, se determina la masa de dextrina necesaria.

$$m_{\text{dextrina}} = \frac{10 \% \frac{p}{v} \cdot 90 \text{ [mL]}}{100 \%} = 9 \text{ [g]} \quad (\text{D.68})$$

Además, se determina el volumen de esta masa de dextrina, considerando que la dextrina tiene una densidad de 1,8 g/cm³ [150], tal como se muestra en la Ecuación D.69.

$$V_{\text{dextrina}} = \frac{9 \text{ [g]}}{1,8 \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]} = 5 \text{ [cm}^3\text{]} \cdot \frac{1 \text{ [mL]}}{1 \text{ [cm}^3\text{]}} = 5 \text{ [mL]} \quad (\text{D.69})$$

Considerando que en Sigma-Aldrich 2,5 kilogramos de dextrina de maíz tipo II tiene un valor de \$225.000, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.70.

$$C_{\text{dextrina}} = \frac{9 \text{ [g]} \cdot \$225000}{2500 \text{ [g]}} = \boxed{\$810} \quad (\text{D.70})$$

De manera análoga, en la Ecuación D.71, se determina la masa de HPMC necesaria.

$$m_{\text{HPMC}} = \frac{0,03 \% \frac{p}{v} \cdot 90 \text{ [mL]}}{100 \%} = 2,7 \cdot 10^{-2} \text{ [g]} \quad (\text{D.71})$$

Además, se determina el volumen de esta masa de HPMC, considerando que la HPMC tiene una densidad de 0,5 g/cm³ [151], tal como se muestra en la Ecuación D.72.

$$V_{\text{HPMC}} = \frac{2,7 \cdot 10^{-2} \text{ [g]}}{0,5 \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]} = 5,4 \cdot 10^{-2} \text{ [cm}^3\text{]} \cdot \frac{1 \text{ [mL]}}{1 \text{ [cm}^3\text{]}} = 5,4 \cdot 10^{-2} \text{ [mL]} \quad (\text{D.72})$$

Considerando que en Sigma-Aldrich 25 gramos de HPMC tiene un valor de \$70.400, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.73.

$$C_{HPMC} = \frac{2,7 \cdot 10^{-2} [g] \cdot \$70400}{25 [g]} = \boxed{\$76} \quad (D.73)$$

De igual forma, en la Ecuación D.74, se determina la cantidad de leche descremada en polvo necesaria.

$$m_{\text{leche descremada}} = \frac{10 \% \frac{g}{v} \cdot 90 [mL]}{100 \%} = 9 [g] \quad (D.74)$$

Además, para determinar el volumen de esta masa de leche descremada en polvo se considerando que en el comercio local ¹ se declara que en 2 cucharadas soperas de leche en polvo descremada de la marca Colun se cuenta con 20 gramos de producto y, además, sabiendo que una cucharada sobera proporciona la capacidad para un volumen de 15 mL [152] es posible determinar la densidad del producto, tal como se muestra en la Ecuación D.75.

$$\rho_{\text{leche descremada}} = \frac{20 [g]}{2 \cdot 15 [mL]} = 0,67 \left[\frac{g}{mL} \right] \quad (D.75)$$

Así, teniendo calculada la densidad del producto, es posible determinar el volumen necesario rquerido, tal como se muestra en la Ecuación D.76.

$$V_{\text{leche descremada}} = \frac{9 [g]}{0,67 \left[\frac{g}{mL} \right]} = 13,4 [mL] \quad (D.76)$$

Para determinar el costo de este producto, se considera el valor declarado en en el comercio local ya mencionado, donde 800 gramos de leche en polvo descremada de la marca Colun tiene un valor de \$4.899, así, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.77.

$$C_{\text{leche descremada}} = \frac{9 [g] \cdot \$4899}{800 [g]} = \boxed{\$55} \quad (D.77)$$

De manera análoga, en la Ecuación D.78, se determina la cantidad de quitosano necesaria.

$$m_{\text{quitosano}} = \frac{0,5 \% \frac{g}{v} \cdot 90 [mL]}{100 \%} = 0,45 [g] \quad (D.78)$$

¹www.jumbo.cl

Se tiene que en Sigma-Aldrich 50 gramos de quitosano de peso molecular bajo, tiene un valor de \$99.600, por lo que se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.79.

$$C_{\text{quitosano}} = \frac{0,45 [g] \cdot \$99600}{50 [g]} = \boxed{\$896} \quad (\text{D.79})$$

Además, Sigma-Aldrich declara que el producto tiene una densidad relativa de 1. Considerando que la definición de densidad relativa dicta lo siguiente: «es la relación entre la masa de un volumen de sustancia problema, determinada a 20 °C, y la masa del mismo volumen de agua, determinada a 4 °C. La densidad relativa es un número adimensional.» [153]. Lo anterior es posible resumirlo en la siguiente expresión:

$$\rho_r = \frac{\rho}{\rho_0}$$

Con todo lo anterior, tal como se muestra en la Ecuación D.80, es posible determinar el valor de la densidad del material, considerando que la densidad del agua a 4 °C corresponde a 1000 kg/m³.

$$\rho_{K_2S_2O_8} = 1 \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] = 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] \cdot \frac{\frac{1000 [g]}{1 [kg]}}{\frac{1000000 [cm^3]}{1 [m^3]}} = 1 \left[\frac{g}{cm^3} \right] \quad (\text{D.80})$$

Así, se determina el volumen de esta masa de quitosano, tal como se muestra en la Ecuación D.81.

$$V_{\text{quitosano}} = \frac{0,45 [g]}{1 \left[\frac{g}{mL} \right]} = 0,45 [mL] \quad (\text{D.81})$$

Teniendo todos los volúmenes de los solutos de la solución compuesta se puede determinar el volumen de agua destilada utilizado para esta solución, tal como se muestra en la Ecuación D.82.

$$V_{\text{agua}} = V_{\text{solución}} - V_{\text{destrina}} - V_{\text{HPMC}} - V_{\text{leche descremada}} - V_{\text{quitosano}} \quad (\text{D.82})$$

$$\begin{aligned} V_{\text{agua}} &= 90 [mL] - 5 [mL] - 5,4 \cdot 10^{-2} [mL] - 13,4 [mL] - 0,45 [mL] \\ &= 71,1 [mL] \end{aligned}$$

Como ya fue mencionado el valor del agua destilada, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.83.

$$C_{\text{agua}} = \frac{71,1 \text{ [mL]} \cdot \$1690}{5000 \text{ [mL]}} = \boxed{\$24,02} \quad (\text{D.83})$$

D.4. Electrohilado

En el Capítulo 6 se detallaron los materiales e instrumentos necesarios para desarrollar el encapsulamiento a través de la metodología de electrohilado. Así, primero es necesario preparar la poliacrilamida (PAAm) a partir de la polimerización de una solución al 8 % de acrilamida (AAm). Para generar esta solución inicial, se considera que el solvente es agua destilada y que la concentración corresponde a un 8 % p/v, así, recordando que la fracción p/v se refiere a lo siguiente:

$$\% \frac{p}{v} = 100 \% \cdot \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{volumen de solución (mL)}}$$

Considerando que la poliacrilamida producida se debe evaluar, para corroborar que cumple con los requerimientos técnicos, se asume que se llevará a cabo una alta producción de esta solución y por ende se considera que se requiere una gran cantidad de solución de acrilamida inicial, por lo anterior, se considera que se requieren 500 mL de solución al 8 % de AAm. Con todo lo anterior, es posible determinar la masa necesaria de acrilamida pura para generar la solución, tal como se muestra en la Ecuación D.84.

$$m_{\text{AAm pura}} = \frac{8 \% \frac{p}{v} \cdot 500 \text{ [mL]}}{100 \%} = 40 \text{ [g]} \quad (\text{D.84})$$

Considerando que en Sigma-Aldrich 100 gramos de acrilamina con una pureza mayor al 99 % tiene un valor de \$42.700, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.85.

$$C_{\text{AAm pura}} = \frac{40 \text{ [g]} \cdot \$42700}{100 \text{ [g]}} = \boxed{\$17080} \quad (\text{D.85})$$

Además, Sigma-Aldrich declara que este producto tiene una densidad de 1,12 g/cm³, por lo que se determina el volumen de esta masa de acrilamina, tal como se muestra en la Ecuación D.86.

$$V_{\text{AAm pura}} = \frac{40 \text{ [g]}}{1,12 \left[\frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]} = 35,7 \text{ [cm}^3\text{]} \cdot \frac{1 \text{ [mL]}}{1 \text{ [cm}^3\text{]}} = 35,7 \text{ [mL]} \quad (\text{D.86})$$

Para conseguir la polimerización de la solución de acrilamida, se añade 2 gramos de persulfato de potasio por litro de solución de acrilamida. Con lo anterior, es posible determinar la masa necesaria de este material para generar la polimerización de la solución, tal como se muestra en la Ecuación D.87.

$$m_{K_2S_2O_8} = \frac{2 [g]}{1 [L]} \cdot 0,5 [L] = 1 [g] \quad (D.87)$$

Considerando que en Sigma-Aldrich 5 gramos de persulfato de potasio con una pureza mayor al 99 % tiene un valor de \$39.200, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.88.

$$C_{K_2S_2O_8} = \frac{1 [g] \cdot \$39200}{5 [g]} = \boxed{\$7840} \quad (D.88)$$

Además, Sigma-Aldrich declara que el producto tiene una densidad relativa de 1,39 a 20 °C. Como ya se mencionó en subsecciones anteriores, la definición de densidad relativa dicta lo siguiente: «es la relación entre la masa de un volumen de sustancia problema, determinada a 20 °C, y la masa del mismo volumen de agua, determinada a 4 °C. La densidad relativa es un número adimensional.» [153]. Lo anterior es posible resumirlo en la siguiente expresión:

$$\rho_r = \frac{\rho}{\rho_0}$$

Con todo lo anterior, tal como se muestra en la Ecuación D.89, es posible determinar el valor de la densidad del material, considerando que la densidad del agua a 4 °C corresponde a 1000 kg/m³.

$$\rho_{K_2S_2O_8} = 1,39 \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] = 1390 \left[\frac{kg}{m^3} \right] \cdot \frac{\frac{1000 [g]}{1 [kg]}}{\frac{1000000 [cm^3]}{1 [m^3]}} = 1,39 \left[\frac{g}{cm^3} \right] \quad (D.89)$$

Así, se determina el volumen de esta masa de persulfato de potasio, tal como se muestra en la Ecuación D.90.

$$V_{K_2S_2O_8} = \frac{1 [g]}{1,39 \left[\frac{g}{cm^3} \right]} = 0,72 [cm^3] \cdot \frac{1 [mL]}{1 [cm^3]} = 0,72 [mL] \quad (D.90)$$

En el proceso de verificación de producción de PAAm se debe sumergir el viscosímetro tipo Ubbelohde en agua destilada, la que se encuentra llenando un vaso precipitado de dos

litros. Asumiendo que repite una vez este proceso de verificación, se procede a se determina el volumen de agua utilizado en este proceso, tal como se muestra en la Ecuación D.91.

$$V_{\text{agua}} = 2 [\mathcal{L}] \cdot 1 \cdot \frac{1000 [mL]}{1 [\mathcal{L}]} = 2000 [mL] \quad (\text{D.91})$$

Así, debido a que en subsecciones anteriores ya fue mencionado el valor promedio del agua destilada, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.92.

$$C_{\text{agua}} = \frac{2000 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$676} \quad (\text{D.92})$$

Luego, se deben generar dos soluciones, la primera de quitosano en ácido acético y la segunda de PAAm en agua destilada, posteriormente, se unen ambas soluciones y se genera una dilución que tenga una concentración igual a 3% p/p para el quitosano y la PAAm, de la dilución generada se utilizan 2 gramos. Sabiendo que la fracción p/p se define tal como se presenta en la Ecuación D.93.

$$\% \frac{p}{p} = \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{masa de solución (g)}} \cdot 100 \% \quad (\text{D.93})$$

Así, sabiendo la cantidad de masa de dilución que se requiere y la concentración de ambos componentes de interés, es posible determinar la masa de quitosano, tal como se muestra en la Ecuación D.94, y de PAAm necesaria, tal como se muestra en la Ecuación D.95.

$$m_{\text{quitosano}} = \frac{3 \% \frac{p}{p} \cdot 2 [g]}{100 \%} = 6 \cdot 10^{-2} [g] \quad (\text{D.94})$$

$$m_{\text{PAAm}}^* = \frac{3 \% \frac{p}{p} \cdot 2 [g]}{100 \%} = 6 \cdot 10^{-2} [g] \quad (\text{D.95})$$

En este punto, es importante mencionar que se considera que la solución de PAAm al provenir de la polimerización de una solución al 8% p/v de AAm, por lo que mantiene esta concentración al encontrarse polimerizada. Por lo anterior, la masa que se requiere no se encuentra en proporción 1:1 con la masa de solución con la que se cuenta, por lo que primero se determina el volumen de solución de PAAm que proporciona la cantidad másica de este material que se requiere, así, recordando que la fracción p/v se refiere a lo siguiente:

$$\% \frac{p}{v} = 100 \% \cdot \frac{\text{masa de soluto (g)}}{\text{volumen de solución (mL)}}$$

Considerando todo lo anterior, es posible determinar el volumen necesario de solución de poliacrilamida para proporcionar a la solución compuesta la concentración de PAAm necesaria, tal como se muestra en la Ecuación D.96.

$$V_{\text{solución PAAm}} = \frac{100 \% \frac{p}{v} \cdot 6 \cdot 10^{-2} [g]}{8 \%} = 0,75 [mL] \quad (\text{D.96})$$

Asumiendo que, la densidad de la solución compuesta es idéntica a la del agua, siendo este un valor ya mencionado, es decir, 1000 kg/m^3 , además, recordando que se utilizan 2 gramos de esta solución, es posible determinar la masa de solución compuesta a utilizar, tal como se muestra en la Ecuación D.97.

$$V_{\text{solución compuesta}} = \frac{2 [g]}{1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right]} \cdot \frac{1000000 [cm^3]}{1 \left[m^3 \right]} = 2 [cm^3] \cdot \frac{1 [mL]}{1 [cm^3]} = 2 [mL] \quad (\text{D.97})$$

Por simplicidad, se supone que la solución compuesta se forma con igual proporción volumétrica de cada una de las soluciones. A partir de esto, se puede determinar el volumen de la solución formada por quitosano y ácido acético y el volumen de la solución formada por PAAm y agua, tal como se muestra en la Ecuación D.98.

$$V_{\text{quitosano/CH}_3\text{COOH}} = V_{\text{PAAm/H}_2\text{O}} = \frac{2 [mL]}{2} = 1 [mL] \quad (\text{D.98})$$

Se tiene que en Sigma-Aldrich 50 gramos de quitosano de peso molecular bajo tiene un valor de \$99.600, por lo que se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.99.

$$C_{\text{quitosano}} = \frac{6 \cdot 10^{-2} [g] \cdot \$99600}{50 [g]} = \boxed{\$120} \quad (\text{D.99})$$

Además, Sigma-Aldrich declara que el producto tiene una densidad relativa de 1. Así, considerando la definición de densidad relativa mencionada anteriormente, se tiene la siguiente expresión:

$$\rho_r = \frac{\rho}{\rho_0}$$

Así, tal como se muestra en la Ecuación D.100, es posible determinar el valor de la densidad del material, considerando que la densidad del agua a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ corresponde a 1000 kg/m^3 .

$$\rho_{\text{quitosano}} = 1 \cdot 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] = 1000 \left[\frac{kg}{m^3} \right] \cdot \frac{\frac{1000 [g]}{1 [kg]}}{\frac{1000000 [cm^3]}{1 [m^3]}} = 1 \left[\frac{g}{cm^3} \right] \quad (\text{D.100})$$

Con esto, es posible determinar el volumen de esta masa de quitosano, tal como se muestra en la Ecuación D.101.

$$V_{\text{quitosano}} = \frac{6 \cdot 10^{-2} [g]}{1 \left[\frac{g}{mL} \right]} = 6 \cdot 10^{-2} [mL] \quad (\text{D.101})$$

Así, conociendo el volumen de quitosano y el volumen de la solución de quitosano/ácido acético, es posible determinar el volumen del solvente requerido, tal como se muestra en la Ecuación D.102.

$$V_{\text{solución de } CH_3COOH} = 1 [mL] - 6 \cdot 10^{-2} [mL] = 0,94 [mL] \quad (\text{D.102})$$

Debido a que la solución de ácido acético que se debe utilizar como solvente debe tener una concentración de 0,3 M, es posible determinar los moles de ácido acético puro a utilizar, tal como se muestra en la Ecuación D.103.

$$mol_{CH_3COOH \text{ puro}} = 0,3 \left[\frac{mol}{L} \right] \cdot 0,94 [mL] \cdot \frac{1 [L]}{1000 [mL]} = 2,82 \cdot 10^{-4} [mol] \quad (\text{D.103})$$

Se tiene que Sigma-Aldrich declara que el ácido acético glacial, con más de un 99,7 % de pureza, tiene un peso molecular de 60,05 gramos por mol, así es posible determinar la masa requerida de este producto, tal como se muestra en la Ecuación D.104.

$$m_{CH_3COOH \text{ puro}} = 2,82 \cdot 10^{-4} [mol] \cdot 60,05 \left[\frac{g}{mol} \right] = 0,017 [g] \quad (\text{D.104})$$

Además, Sigma-Aldrich declara que el ácido acético glacial, con más de un 99,7 % de pureza, tiene una densidad de 1,049 gramos por mililitro, así, es posible determinar el volumen requerido de este producto, tal como se muestra en la Ecuación D.105.

$$V_{CH_3COOH \text{ puro}} = \frac{0,017 [g]}{1,049 \left[\frac{g}{mL} \right]} = 0,016 [mL] \quad (\text{D.105})$$

Se tiene que en Sigma-Aldrich 100 mililitros de ácido acético glacial, con más de un 99,7 % de pureza, tiene un valor de \$46.700, por lo que se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional de este material, tal como se muestra en la Ecuación D.106.

$$C_{CH_3COOH} = \frac{0,016 [mL] \cdot \$46700}{100 [mL]} = \boxed{\$7,5} \quad (\text{D.106})$$

Además, se requiere considerar el agua destilada necesaria para generar la solución de ácido acético 0,3 M, lo que se determina por diferencia de volúmenes, tal como se muestra en la Ecuación D.107.

$$V_{\text{agua solución } CH_3COOH} = 0,94 [mL] - 0,016 [mL] = 0,924 [mL] \quad (D.107)$$

Así, sabiendo que el costo de 5 L del agua destilada Datrak en Easy tiene un valor de \$1.690, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.108.

$$C_{\text{agua solución } CH_3COOH} = \frac{0,924 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$0,31} \quad (D.108)$$

Por otro lado, los costos relacionados a PAAm se asocian netamente a su preparación, por lo que no se determina un costo adicional en este apartado. Sabiendo que se requieren utilizar 0,75 mL de solución de PAAm y conociendo el volumen de solución PAAm/agua destilada que se debe alcanzar, es posible determinar el volumen de agua destilada para completar el volumen de tal dilución, tal como se muestra en la Ecuación D.109.

$$V_{\text{agua}} = 1 [mL] - 0,75 [mL] = 0,25 [mL] \quad (D.109)$$

Así, ya conociendo el valor del agua destilada, se realiza un cálculo para determinar el valor proporcional, como se muestra en la Ecuación D.110.

$$C_{\text{agua}} = \frac{0,25 [mL] \cdot \$1690}{5000 [mL]} = \boxed{\$0,09} \quad (D.110)$$

Luego, a los 2 gramos de solución compuesta se deben añadir 0,2 gramos de esporas, sabiendo que por placa se pueden obtener aproximadamente una cantidad másica de 100 mg de esporas. Considerando lo anterior, es posible determinar la cantidad aproximada de placas que es necesario cultivar para obtener la masa de esporas requerida por la metodología, tal tal como se muestra en la Ecuación D.111.

$$N_{\text{placas}}^{\circ} = \frac{0,2 [g]}{100 \left[\frac{mg}{placa} \right]} \cdot \frac{1 \cdot 10^3 [mg]}{1 [g]} = 2 [placa] \quad (D.111)$$

A su vez, como ya se mencionó anteriormente, se conoce la cantidad volumétrica aproximada de esporas que se puede obtener por placa, correspondiente a 35 μL , esto permite determinar el volumen de esporas equivalente, como se puede apreciar en la Ecuación D.112.

$$V_{\text{esporas}} = 2 [placa] \cdot 35 \left[\frac{\mu L}{placa} \right] = 70 [\mu L] \cdot \frac{1 [mL]}{1000 [\mu L]} = 0,07 [mL] \quad (D.112)$$

Luego, para determinar el número necesario de esporas se utiliza información relativa a modelamiento de las esporas, tal como se mostró en la determinación de costos de gelificación iónica. Se asume que los esporas tienen la mayor longitud de los ejes posible, es decir, se

sobreestima el volumen de esporas, con el fin de asegurar la obtención de estos. Además de lo anterior, se asume el mismo volumen unitario de espora que se determinó en la subsección de costos de gelificación iónica, correspondiente a $36,6 \mu\text{m}^3$ por espora.

Con todo lo anterior, se puede determinar el número de esporas que se requiere para llevar a cabo la metodología de electrohilado, tal como se muestra en la Ecuación D.113.

$$N_{\text{esporas}} = \frac{0,07 [\text{mL}]}{36,6 \left[\frac{\mu\text{m}^3}{\text{espora}} \right]} \cdot \frac{1 [\mu\text{m}^3]}{1 \cdot 10^{-12} [\text{mL}]} = 1,91 \cdot 10^9 [\text{esporas}] \quad (\text{D.113})$$

Anexo E

Escalamiento y costos proyectados

E.1. Estimación de materiales

En la siguiente sección, se presenta una recopilación de la estimación de costos de materiales que se deben utilizar para replicar de manera exacta cada una de las metodologías viables. Para estimar estos costos se hace uso de la página web de Easy, Jumbo y Sigma Aldrich [133] en Chile, según los cálculos que han sido detallados en el Anexo D.

E.1.1. Gelificación iónica

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de gelificación iónica se presenta en el Anexo D.1. En la Tabla E.1 se presenta el resumen del volumen determinado para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Volumen [mL]	Valor [\$]
Esporas	9,15	
Agua destilada	2480,1	838
Alginato de sodio	0,4	68
Cloruro de calcio	10,3	14.827
Costo total		15.734

Tabla E.1: Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología de gelificación iónica y los costos asociados.

E.1.2. Montaje LbL

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de montaje LbL se presenta en el Anexo D.2. En la Tabla E.2 se presenta

el resumen del volumen determinado para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Volumen [mL]	Valor [\$]
Esporas	$1,6 \cdot 10^{-3}$	
Agua destilada	10.117	3.420
Ácido sulfúrico	1,1	562
Lignosulfonato de sodio	0,2	72
Lignina alkali	0,8	1.460
Hidróxido de sodio	0,4	1.926
Cloruro de glicidiltrimetilamonio	2,3	5.069
Membrana de diálisis (14K MWCO) 76 mm *	20 [cm]	1.864
Costo total		14.372

Tabla E.2: Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología LbL y los costos asociados.

E.1.3. Secado por aspersión

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de secado por aspersión se presenta en el Anexo D.3. En la Tabla E.3 se presenta el resumen del volumen determinado para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Volumen [mL]	Valor [\$]
Esporas	$9,2 \cdot 10^{-4}$	
Agua destilada	81,1	27
Dextrina	5,0	810
Hidroxipropil metilcelulosa	$5,4 \cdot 10^{-2}$	76
Leche descremada	13,4	55
Quitosano	0,5	896
Costo total		1.865

Tabla E.3: Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología de secado por aspersión y los costos asociados.

E.1.4. Electrohilado

El cálculo detallado del costo de los materiales a utilizar en la implementación de la metodología de electrohilado se presenta en el Anexo D.4. En la Tabla E.4 se presenta el resumen del volumen determinado para cada uno de los materiales a utilizar y el costo asociado a cada uno de estos.

Material	Volumen [mL]	Valor [\$]
Esporas	$7 \cdot 10^{-2}$	
Acrilamida	35,7	17.080
Persulfato de potasio	0,7	7.840
Agua destilada	2000,3	676
Qitosano	$6 \cdot 10^{-2}$	120
Ácido acético	0,02	7,54
Costo total		25.723

Tabla E.4: Tabla resumen de la cantidad volumétrica necesaria de los materiales necesarios, para llevar a cabo la metodología de electrohilado y los costos asociados.

E.2. Escalamiento

Con la finalidad de comparar adecuadamente las metodologías de encapsulación, se escalan los procedimientos llevando todos los cálculos al uso de la misma cantidad de esporas, con el objetivo de que todos los métodos conduzcan a la misma cantidad de esporas encapsuladas. Así, se hace uso de los cálculos desarrollados en el Anexo D y la recopilación de costos presentada en la sección E.1 del presente Anexo.

La metodología seguida corresponde, en primera instancia, a traspasar todos los cálculos desarrollados en el Anexo D a una planilla Excel y la creación de una tabla recopilatoria de costos con la finalidad de verificar los valores presentados en la sección E.1 del Anexo E. Luego, para escalar todas las metodologías al uso de la misma cantidad de esporas se optó por amplificar o reducir, según corresponda, los volúmenes utilizados y no alterar las concentraciones. Así, se alteró el volumen de cada suspensión fúngica hasta que se determinara que se requería exactamente $2,5 \cdot 10^8$ esporas para cumplir con los requerimientos. A continuación, sin alterar la concentración de ninguna de las soluciones a utilizar, se determinó la razón proporcional entre el volumen de la suspensión fúngica base y la solución base en cuestión, luego, por medio del uso de una regla de tres se determinó el volumen escalado de la solución en cuestión.

Anexo F

Aproximación de tiempos de implementación

A continuación, se presentan aproximaciones para determinar el tiempo que puede involucrar desarrollar cada uno de los métodos de encapsulación que han sido escalados. Debido a que corresponden a aproximaciones, al ejecutar los procedimientos se podría incurrir en tiempos diferentes al tiempo estimado.

F.1. Gelificación iónica

1. Preparar una solución al 2% de alginato de sodio y agua destilada a 40°C, para esta etapa se aproxima un tiempo de 20 minutos.
2. Preparar una solución 0,2 M de cloruro de calcio, proceso para el que se estima un tiempo de 20 minutos.
3. Autoclavar a 121°C por 20 minutos todas las soluciones y elementos a utilizar, para lo que se estima un tiempo total de 2 horas [38].
4. Realizar el cultivo de *Trichoderma reesei* en una placa de Petri, para esto se estima un tiempo de 8 días.
5. Añadir agua destilada a la placa y extraer cuidadosamente las esporas, recuperar la suspensión de esporas del organismo, para esto se estima un tiempo de 1 hora.
6. Realizar el recuento de las esporas en una cámara Neubauer, procurando contar con una concentración de $1 \cdot 10^9$ esporas por mililitro de suspensión, para esta etapa se aproxima un tiempo de 2 horas.
7. A la solución de alginato de sodio añadir un volumen específico de suspensión fúngica y de agua destilada, posteriormente homogeneizar, para este proceso se aproxima un tiempo de 30 minutos.

8. Configurar el caudal, de los 0,96 mililitros solución de alginato de sodio con esporas, en 861,7 mililitros por minuto, el tiempo aproximado dedicado a esta etapa se determina en la Ecuación F.1.

$$t_{\text{gelificación}} = \frac{0,96 \left[\frac{mL}{min} \right]}{861,7 \left[\frac{mL}{min} \right]} = 1,1 \cdot 10^{-3} [min] = 0,07 [s] \quad (F.1)$$

9. Extraer cuidadosamente las perlas blandas desde el recipiente de cloruro de calcio, para lo que se estima un tiempo aproximado de 30 minutos.
10. Dejar endurecer las perlas blandas a 4°C, este proceso contempla un tiempo fijo de 2 horas.
11. Lavar cuidadosamente con agua destilada las perlas ya endurecidas, con el fin de eliminar excesos de cloruro de calcio, para este proceso se aproxima un tiempo de 3 horas.

Con todo lo anterior, el tiempo requerido para desarrollar la metodología de gelificación iónica corresponde a:

$$t_{\text{total}} = 8 [\text{días}] \text{ con } 11 [h] \text{ y } 40 [min]$$

F.2. Montaje LbL

1. Autoclavar a 121°C por 20 minutos todas las soluciones y elementos a utilizar, para lo que se estima un tiempo total de 2 horas [38].
2. Determinar el contenido molar de grupos OH en la lignina alkali utilizada, para este proceso se aproxima un tiempo de 1 hora.
3. Preparar una solución de lignina alkali y NaOH 2M, para esta etapa se estima un tiempo de 10 minutos.
4. Definir la cantidad de GTAC a utilizar y añadirla a la solución de lignina alkali y NaOH, lo que se aproxima que consuma un tiempo de 1 hora.
5. Calentar la solución de lignina alkali, NaOH y GTAC a 70 °C, por un periodo fijo de 1 hora.
6. Neutralizar la solución, utilizando ácido sulfúrico, proceso que contempla un tiempo de 1 hora.
7. Dializar la solución neutralizada frente a agua por un periodo fijo de 3 días.
8. Eliminar la parte insoluble de la solución y rescatar la parte soluble en agua, donde está la lignina catiónica, para este proceso se aproxima un tiempo de 1 hora.
9. Evaporar el agua contenida en la parte soluble rescatada, para este proceso se estima un tiempo de 12 horas.

10. Liofilizar la parte soluble concentrada, esta etapa contempla una duración de 8 horas.
 11. Preparar las soluciones de polielectrolitos, proceso que se estima tarda aproximadamente 1 hora.
 12. Autoclavar a 121°C por 20 minutos ambas soluciones polielectrolíticas y elementos a utilizar, para lo que se estima un tiempo total de 2 horas [38].
 13. Realizar el cultivo de *Trichoderma reesei* en una placa de Petri, para esto se estima un tiempo de 8 días.
 14. Añadir agua destilada a la placa y extraer cuidadosamente las esporas, recuperar la suspensión de esporas del organismo, para esto se estima un tiempo de 1 hora.
 15. Realizar el recuento de las esporas en una cámara Neubauer, procurando contar con una concentración de $4,5 \cdot 10^7$ esporas por mililitro de suspensión, para esta etapa se aproxima un tiempo de 2 horas.
 16. Añadir la solución policationica a la suspensión fúngica y agitar, proceso que contempla un tiempo aproximado 10 minutos.
 17. Dejar reposar sin agitación la mezcla de solución policationica y suspensión fúngica, por un periodo fijo de 15 minutos.
 18. Centrifugar y resuspender las esporas, para esta etapa se aproxima un tiempo de 30 minutos.
 19. Medir el potencial zeta, para esto se estima un tiempo de 1 hora [154].
 20. Añadir la solución polianionica e incubar, por un periodo fijo de 15 minutos.
- * Dependiendo de la cantidad de capas de polielectrolitos que se deseen obtener, se repiten los pasos desde la etapa 16 a la etapa 20.

Asumiendo que se desean obtener 20 bicapas de polielectrolitos, los pasos 16-20 se repiten 20 veces, el tiempo requerido para desarrollar la metodología de montaje LbL corresponde a:

$$t_{total} = 14 \text{ [días]} \text{ con } 4 \text{ [h]} \text{ y } 30 \text{ [min]}$$

F.3. Secado por aspersión

1. Prepara la solución compuesta de dextrina, HPMC, leche descremada y quitosano, para esto se aproxima un tiempo de 1 hora.
2. Autoclavar a 121°C por 20 minutos la solución compuesta y los elementos a utilizar, para lo que se estima un tiempo total de 2 horas [38].
3. Realizar el cultivo de *Trichoderma reesei* en una placa de Petri, para esto se estima un tiempo de 8 días.

4. Añadir agua destilada a la placa y extraer cuidadosamente las esporas, recuperar la suspensión de esporas del organismo, para esto se estima un tiempo de 1 hora.
5. Realizar el recuento de las esporas en una cámara Neubauer, procurando contar con una concentración de $2,5 \cdot 10^6$ esporas por mililitro de suspensión, para esta etapa se aproxima un tiempo de 2 horas.
6. Añadir suspensión fúngica a la solución compuesta, proceso que se aproxima tarde 30 minutos.
7. Configura el equipo de secado por aspersión a baja temperatura y correr un flujo de solución de 0,21 L/h, como el volumen de la mezcla de suspensión fúngica y solución compuesta es de 957 mL, el tiempo que tarda esta etapa se muestra en la Ecuación F.2.

$$t_{\text{secado por aspersión}} = \frac{957 \text{ [mL]}}{0,21 \left[\frac{\text{L}}{\text{h}} \right]} \cdot \frac{1 \text{ [L]}}{1000 \text{ [mL]}} = 4,6 \text{ [h]} = 273 \text{ [min]} \quad (\text{F.2})$$

Con todo lo anterior, el tiempo requerido para desarrollar la metodología de secado por aspersión corresponde a:

$$t_{\text{total}} = 8 \text{ [días]} \text{ con } 11 \text{ [h]} \text{ y } 3 \text{ [min]}$$

F.4. Electrohilado

1. Preparar una solución al 8% de acrilamida, para lo que se estima un tiempo de 30 minutos.
2. Polimerizar la solución de acrilamida utilizando persulfato de potasio, con el objetivo de producir poliacrilamida, por un periodo fijo de 2 horas.
3. Verificar la correcta producción de poliacrilamida, determinando el peso molecular promedio de viscosidad, para esta etapa se aproxima un tiempo de 1 hora.
4. Preparar una solución de quitosano en ácido acético, para lo que se estima un tiempo de 30 minutos.
5. Preparar una solución de poliacrilamida en agua destilada, proceso que se estima tarde 30 minutos.
6. Unir ambas soluciones previamente preparadas y extraer una cantidad fija de solución compuesta, para esta etapa se aproxima un tiempo de 30 minutos.
7. Autoclavar a 121°C por 20 minutos todas las soluciones y los elementos a utilizar, para lo que se estima un tiempo total de 2 horas [38].
8. Realizar el cultivo de *Trichoderma reesei* en una placa de Petri, para esto se estima un tiempo de 8 días.

9. Añadir agua destilada a la placa y extraer cuidadosamente las esporas, recuperar la suspensión de esporas del organismo, para esto se estima un tiempo de 1 hora
10. Realizar el recuento de las esporas en una cámara Neubauer, para esta etapa se aproxima un tiempo de 2 horas.
11. Extraer el volumen de suspensión fúngica que permite contar con una cantidad fija de $1,9 \cdot 10^9$ esporas, para lo que se estima un tiempo total de 30 minutos.
12. Filtrar y recolectar las esporas del microorganismo, proceso que se estima tarde 1 hora.
13. Mezclar la solución compuesta con la masa de esporas extraída, proceso que se estima tarde 30 minutos.
14. Ajustar el equipo de electrohilado, cargar en la jeringa la solución compuesta con esporas y correr un caudal de 0,7 mL/h, como el volumen de solución total es de 0,26 mL, el tiempo que tarda esta etapa se muestra en la Ecuación F.3.

$$t_{\text{electrohilado}} = \frac{0,26 \left[\frac{mL}{h} \right]}{0,7 \left[\frac{mL}{h} \right]} = 0,37 [h] = 22 [min] \quad (F.3)$$

Con todo lo anterior, el tiempo requerido para desarrollar la metodología de electrohilado corresponde a:

$$t_{\text{total}} = 8 [\text{días}] \text{ con } 12 [h] \text{ y } 22 [min]$$