



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA**



CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Evaluación de la actividad antifúngica de un microencapsulado rico en polifenoles del residuo de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) frente a *Botrytis cinerea*

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Viviana Gabriela Abril Díaz

Tutor: Dr. Orestes Darío López Hernández

Ambato – Ecuador

Agosto – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Orestes Darío López Hernández

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 28 de junio del 2024

Dr. Orestes Darío López Hernández

1754784864

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Viviana Gabriela Abril Díaz, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga, son absolutamente originales, auténticos y personales, a excepción de las referencias bibliográficas.



Viviana Gabriela Abril Díaz

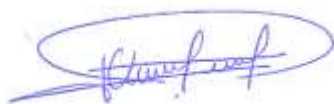
1850616853

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Viviana Gabriela Abril Díaz

1850616853

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Presidente del Tribunal

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

1714348859

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

Ambato, 05 de agosto del 2024

DEDICATORIA

A Dios

A mi madre Viviana Díaz por nunca soltar de mi mano a pesar de las adversidades, tu amor de madre, ejemplo mujer y ser humano son todo lo bueno que Dios y el universo pudo darme para seguir adelante y nunca rendirme.

A mi padre Diego Abril por su amor incondicional, enseñanzas y apoyo durante toda mi vida.

A mi hermano Diego, por su apoyo y cariño a lo largo de mi vida, te quiero pollito.

A mi tía Amandi y primo Mateo que siempre se han preocupado por mí, gracias por quererme y cuidarme, por sus consejos, apoyo y amor.

A mis papitos; mami Bertha y papi Gilberto por cada enseñanza que me han brindado, por su amor puro y sincero, por su apoyo y preocupación por mi bienestar en cada etapa de mi vida.

A mis seres de luz que en la inmensidad del universo me cuidan.

Viviana Abril

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento se dirige, ante todo, a Dios por haberme permitido llegar hasta este punto con salud y fortaleza para lograr mis objetivos; además que con su infinita bondad y amor acogió mis esfuerzos y los bendijo.

A mi tutor, PhD. Orestes López por brindarme de su guía y saberes durante el desarrollo de este trabajo. Agradezco su paciencia, confianza y apoyo. A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, por permitirme hacer uso de sus instalaciones para mi formación profesional y humana,

A mi mami Viviana Margarita, pilar fundamental de mi vida, por ser esa mujer abnegada, fuerte y resiliente, sin ti no podría haber seguido adelante, eres la luz que guía mi camino y quien le da sentido a ella, gracias por confiar en mí, amarme por, sobre todo, apoyarme en mis decisiones y nunca dejarme sola. Aun cuando el cielo se torna gris, tú le das color.

A mis dos Diegos mi papito y hermano que a pesar de no convivir o congeniar mucho sé que me aman y siempre buscan lo mejor para mí, y nunca me dejarían sola en este largo camino llamado vida.

A mi familia en general tíos, tías y primos, abuelitos que nunca me han dejado sola y han contribuido en la formación de mi persona a lo largo de este tiempo, gracias por amarme, apoyarme.

A mis hijitos, Bongo, Jack, Mateo, y en el cielo Susu y Jonas. Gracias por el amor que me bridan día con día.

A quienes he conocido a lo largo de las diferentes etapas de mi vida y que a pesar de la distancia me apoyan, quieren y cuidan Antonio, Alexito, Juan. A mis amigos no solo de “U” sino, espero de vida; Fer, Washo, Juanito, Abel, Josu, Josa, Erick, gracias por los momentos vividos. A las novias Mishu, Cami y Kerly, gracias por las risas, lágrimas y apoyo, gracias por cuidarme y ser más que solo amigas. A Kevito por ser incondicional a mí persona, por tu apoyo y amor en cada momento del día te amo.

A todos quienes han formado parte de mi vida gracias por todo.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiii
RESUMEN EJECUTIVO	xiv
ABSTRACT.....	xv
CAPITULO I	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Justificación.....	1
1.1.2. Residuos vegetales	2
1.1.3. Caña de azúcar	2
1.1.4. Residuo de la caña de azúcar.....	4
1.1.4.1. Generalidades.....	4
1.1.4.2. Usos	4
1.1.4.3. Composición química.....	5
1.1.5. Polifenoles.....	6
1.1.5.1. Generalidades.....	6
1.1.5.2. Propiedades antimicrobianas de los polifenoles.....	6
1.1.5.3. Polifenoles en el residuo de caña de azúcar	7
1.1.6. Métodos de preservación de polifenoles	9

1.1.7.	Microencapsulación de polifenoles	9
1.1.8.	<i>Botrytis cinérea</i>	10
1.1.9.	Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de polifenoles.....	12
1.2.	Objetivos.....	12
1.2.1.	Objetivo general	12
1.2.2.	Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO II		14
METODOLOGÍA		14
2.1.	Materiales.....	14
2.1.1.	Material Vegetal	14
2.1.2.	Reactivos	14
2.1.3.	Insumos de laboratorio	14
2.1.4.	Equipos.....	15
2.2.	Métodos.....	15
2.2.1.	Obtención del material vegetal.....	15
2.2.2.	Preparación del material vegetal	15
2.2.3.	Obtención de extractos	16
2.2.4.	Determinación de sólidos totales.....	17
2.2.5.	Determinación de polifenoles totales	17
2.2.6.	Preparación de soluciones	17
2.2.7.	Secado por aspersión para la obtención de microencapsulados	18
2.2.8.	Evaluación de eficiencia de microencapsulación cualitativa mediante FTIR	18
2.2.9.	Cálculo de rendimiento del proceso de microencapsulación	18
2.2.10.	Determinación de la eficiencia de microencapsulación	18
2.2.11.	Elaboración de placa madre de <i>B. cinerea</i>	19
2.2.12.	Identificación microscópica y macroscópica de <i>B. cinerea</i>	19

2.2.13. Evaluación de la actividad antifúngica del microencapsulado frente a <i>B. cinerea</i>	19
CAPÍTULO III.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
CAPÍTULO IV	37
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	37
ANEXOS	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de <i>S. officinarum</i> L	3
Tabla 2. Usos del bagazo de caña de azúcar.....	4
Tabla 3. Composición química (%) de la Caña de Azúcar.	5
Tabla 4. Porcentaje de inhibición de polifenoles presentes en el bagazo de caña de azúcar	8
Tabla 5. Taxonomía de <i>B. cinerea</i> ,	11
Tabla 6. Variables independientes en el proceso de extracción.....	13
Tabla 7. Variables independientes de la evaluación de actividad antifúngica.....	13
Tabla 8. Tratamientos de extracción.....	16
Tabla 9. Contenido total de polifenoles obtenidos de los tratamientos.	21
Tabla 10. Eficiencia de la microencapsulación	26
Tabla 11. Datos obtenidos de la evaluación antifúngica	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Plantación de caña de azúcar	3
Figura 2. Bagazo de la caña de azúcar	4
Figura 3. Fenólicos y Flavonoides del bagazo de caña de azúcar	8
Figura 4. Proceso de secado por aspersión	10
Figura 5. Diagrama de Pareto Estandarizada para polifenoles totales	23
Figura 6 Gráfico de superficie de respuesta estimada.....	24
Figura 7. Resultado de la espectrometría infrarroja del extracto de bagazo de caña de azúcar	28
Figura 8 Resultado de la espectrometría infrarroja del agente encapsulante	29
Figura 9. Resultado de la espectrometría infrarroja del microencapsulado	29
Figura 10. B. cinerea	30
Figura 11. Placa madre de B. cinerea.....	31
Figura 12. ANOVA de suma de cuadrados para porcentaje de inhibición	33
Figura 13. Grafica de barras de crecimiento micelial de B. cinerea	34
Figura 14. Grafica de barras de porcentaje de inhibición de B. cinerea	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de Varianza para polifenoles.....	45
Anexo 2. Curva de calibración de polifenoles	45
Anexo 3. Curva de calibración de etanol	46
Anexo 4. Curva de calibración de agua	46
Anexo 5. ANOVA multifactorial de evaluación antifúngica	47
Anexo 6. Crecimiento micelial de B. cinerea	47
Anexo 7 Imágenes del proceso experimental del proyecto	48

RESUMEN EJECUTIVO

Actualmente, la biotecnología busca alternativas que sustituyan a los fungicidas comerciales en el control de patógenos como *Botrytis cinerea*, responsable de aproximadamente el 10 por ciento de pérdidas anuales en cultivos. La investigación sobre el uso de residuos vegetales, cuyos metabolitos cumplan con este propósito sin causar daños al medio ambiente ni a los humanos han emergido como áreas centrales de estudio. Tal es el caso del bagazo de caña de azúcar, rico en polifenoles con actividad antifúngica, siendo capaz de utilizarse a futuro dentro de los campos como agente controlador de plagas.

Para la obtención del extracto rico en polifenoles se usó el método de extracción por disolventes orgánicos utilizando etanol a 30, 50 y 70 por ciento evaluado a 30, 45 y 60 minutos en una relación 1:20 material vegetal:disolvente. Posterior a esto se realizó la prueba de Folin para medir la concentración de polifenoles totales siendo el mejor tratamiento 50 por ciento a 30 minutos para 63 gramos GAE. A continuación, se realizó la microencapsulación del concentrado a una relación 20:80 usando maltodextrina, mediante la técnica de secado por aspersión y se evaluó su eficiencia mediante FTIR. Finalmente se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* a 10, 30 y 50 por ciento de microencapsulado a manera de antibiograma obteniendo un mayor porcentaje de inhibición al 50 por ciento de microencapsulado del promedio total de los 8 días del ensayo.

Palabras clave: Bagazo de caña de azúcar, residuo agroindustrial, actividad antifúngica, secado por aspersión, fitopatógeno.

ABSTRACT

Currently, biotechnology is looking for alternatives to replace commercial fungicides in the control of pathogens such as *Botrytis cinerea*, responsible for approximately 10% of annual crop losses. Research on the use of plant residues, whose metabolites fulfill this purpose without causing harm to the environment or humans, have emerged as central areas of study. Such is the case of sugarcane bagasse, rich in polyphenols with antifungal activity, being capable of being used in the future within the fields as a pest control agent.

To obtain the extract rich in polyphenols, the organic solvent extraction method was used using ethanol at 30, 50 and 70 percent evaluated at 30, 45 and 60 minutes in a 1:20 plant material:solvent ratio. After this, the Folin test was performed to measure the concentration of total polyphenols, the best treatment being 50 percent at 30 minutes for 63 g/GAE. Next, microencapsulation of the concentrate was carried out at a 20:80 ratio using maltodextrin, using the spray drying technique, and its efficiency was evaluated using FTIR. Finally, the in vitro antifungal activity was evaluated at 10, 30 and 50 percent microencapsulation as an antibiogram, obtaining a higher percentage of inhibition at 50 percent microencapsulation than the total average of the 8 days of the trial.

Keywords: Sugarcane bagasse, agroindustrial waste, antifungal activity, spray drying, phytopathogen, *B. cinerea*.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Justificación

En la actualidad, se ha evidenciado el aumento de investigaciones que permitan desarrollar controladores biológicos, centrados en la mitigación de patógenos en cultivos agrícolas. Dentro de este grupo se encuentran los fitoquímicos, que pueden ser obtenidos a partir de residuos vegetales, mismos que causan un gran porcentaje de efectos negativos al medio ambiente ya que genera gases de efecto invernadero y contaminación del suelo debido a su largo periodo de descomposición **(Moreno et al., 2023)**.

Este es el caso de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L), que a nivel mundial produce 1,700 millones de toneladas al año, de las cuales aproximadamente 600 millones toneladas son residuos **(Lagos-Burbano & Castro-Rincón, 2019)**. Dentro del Ecuador la **Coordinación General de Información Nacional Agropecuaria (2021)** establece que se produce un estimado de 6'460.032 T/año de caña de azúcar utilizados para la elaboración de subproductos de interés alimenticio provocando un equivalente al 42% de residuos de la cosecha total.

El bagazo, residuo de esta planta, es considerado rico algunos tipos de polifenoles, de los cuales se conoce los flavonoides, antocianinas y taninos, mismos que han demostrado poseer actividad antifúngica frente a múltiples fitopatógenos como *Botrytis cinérea* **(Vidal, 2018)**. Este hongo genera pudrición de tejidos blandos en al menos el 10% de las más de 200 especies que infecta; incluyendo frutales, hortalizas, viña y plantas ornamentales generadas dentro de la región Andina **(Belesansky et al., 2019)**.

Es así como la extracción de metabolitos secundarios de origen fenólico a concentraciones óptimas permitiría reducir el impacto de este microorganismo. Sin embargo, los polifenoles debido a la sensibilidad propia de su estructura tienden a degradarse fácilmente frente condiciones ambientales como luz, humedad y temperatura. Por ello la microencapsulación mediante técnicas como el secado

por aspersión resulta ser favorecedor en el control de su estabilidad, prologando su vida útil y facilitando así también el estudio en su dosificación como tratamiento fitoquímico (Luna et al., 2017).

1.1.2. Residuos vegetales

Los residuos vegetales son aquellos desechos generados a partir de las plantas tras su cosecha y procesamiento. Según su origen se clasifican en tres principales tipos: agrícola, vinculado a la producción de alimentos; forestal, producto del uso de maderas como troncos, ramas, hojas; y finalmente, industriales, resultado de procesos fabriles (Gomis Valero, 2022). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), un tercio de los residuos orgánicos totales, terminan convirtiéndose en contaminantes propios de la industria alimentaria y agrícola (Gustavsson & Cederberg, 2012).

Estos despojos se generan principalmente en países de desarrollo donde la agricultura y pérdidas postcosecha constituyen un porcentaje representativo del total de pérdida y desperdicio de alimentos (FAO, 2019). Es así como el manejo adecuado de los desperdicios se convierte en un tema de interés fundamental para la biotecnología, misma que permite mitigar los impactos ambientales y fomentar la fabricación de insumos como recursos valiosos, productos químicos renovables, biocombustibles y fertilizantes orgánicos (Putra et al., 2022).

1.1.3. Caña de azúcar

1.1.3.1. Generalidades

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L), es una gramínea tropical originaria de Nueva Guinea llevada hacia la India y regiones Orientales, que posteriormente se introdujo en África, Europa y América (Dinesh Babu et al., 2022). De acuerdo a su metabolismo esta se encuentra dentro de la clasificación C4 con capacidad de adaptabilidad a las condiciones ambientales en las que se desarrolla, alto rendimiento en la conservación de agua y resistencia elevada a la radiación solar (Villacís, 2016).

Esta planta monocotiledónea en etapa de madurez puede llegar a medir hasta 5 metros de altura con un tallo de aspecto robusto, erguido y nudos en donde se almacenan altas concentraciones de sacarosa (Rivera, 2010). Su estructura tiene una sección aérea con hojas, inflorescencias, semillas y una sección subterránea de raíces y rizomas (Marasca et al., 2015). Por otro lado, se considera su proceso de fotosíntesis como altamente eficaz, debido a que convierte la mayor cantidad de energía solar que recibe en energía química (Lagos-Burbano & Castro-Rincón, 2019).



Figura 1. Plantación de caña de azúcar

Nota. La imagen muestra la cosecha del programa de variedades de un plantío de caña de azúcar de aproximadamente 5 metros de altura. Tomada de CINAIE (2020).

1.1.3.2. Taxonomía

La caña de azúcar, o también llamada caña dulce, pertenece a la familia de las *Poaceae* con alrededor de 12.000 especies en 780 géneros. Esta especie (**Tabla 1**) es usada principalmente en la producción de azúcar, etanol y biocombustible, mostrándose así las características principales de la clasificación taxonómica en la tabla siguiente:

Tabla 1.

Taxonomía de *S. officinarum* L

Categoría taxonómica	
Reino	Plantae
Clase	Liopsida
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Género	Saccharum
Especie	Saccharum officinarum L

Nota. Tomada de Mercado (2020).

1.1.4. Residuo de la caña de azúcar

1.1.4.1. Generalidades

La caña de azúcar, tras ser utilizado en las diversas industrias produce una serie de desechos tales como las puntas, hojas y tallos (Triana-Hernández et al., 2014). Por lo general, el procesamiento de esta planta involucra la trituración del tejido vegetal con el fin de extraer su jugo, dando como resultado al residuo fibroso denominado "bagazo" (Loh et al., 2013). A nivel mundial se estima que se produce un total 600 millones de toneladas anualmente de bagazo de caña de azúcar, mismo que representa hasta el 30-34% de la masa total de caña de azúcar recolectada (Lagos-Burbano & Castro-Rincón, 2019).



Figura 2. Bagazo de la caña de azúcar

Nota. En la imagen se muestra la fotografía de el residuo de caña de azúcar (bagazo). Tomada de PROAIN (2020).

1.1.4.2. Usos

El bagazo de caña de azúcar dentro de la industria tiene múltiples aplicaciones debido a la estructura química que posee, bajos costos de producción, fácil manipulación del material vegetal y buena adaptabilidad al estar en contacto con otros subproductos (Pozo García, 2012).

Tabla 2.
Usos del bagazo de caña de azúcar.

Industrias	Descripción de uso
Alimenticia	Se usa como recurso forrajero, fuente de fibra y suplemento en la alimentación de rumiantes.

Construcción	Tras ser incinerado este residuo, posee la capacidad de reemplazar al cemento en la elaboración de hormigón.
Papelera, plástica, textil	Es utilizado como pulpa química en la elaboración de papel, tejidos,
Energética	Participa en la elaboración de bioetanol debido a sus altas concentraciones de celulosa y así como capacidad de fermentación.
Remediación de suelos	Debido a la capacidad de absorción que posee esta es colocada en suelos para eliminación de residuos líquidos contaminantes

Nota. Los usos fueron tomados de la recopilación realizada por Lagos-Burbano & Castro-Rincón (2019); Xu et al. (2018), Larson et al. (2001)

1.1.4.3. Composición química

La caña de azúcar está constituida de un 74,05% de agua, 25% de materia orgánica y el restante de minerales tal como se observa en la **Tabla 3.**, además de ser considerada una rica fuente de energía debido a su elevada cantidad de carbohidratos (**Moreno et al., 2023**). Por otro lado, la fracción fibrosa remanente de la planta, “bagazo” demuestra estar compuesta por celulosa en un 44,35%, hemicelulosa 24,70%, lignina 24,19%, minerales 5,93% y sustancias extractivas tales como compuestos fenólicos 4,04% (**Forteza Monzón, 2015**).

Tabla 3.

Composición química (%) de la Caña de Azúcar.

Constituyentes químicos	Porcentaje (%)
Agua	73 - 76
Sólidos totales	24 - 27
Sólidos Solubles (Brix)	10 - 16
Fibra (Seca)	11 - 16
Sacarosa	75 - 92
Glucosa	70 - 88
Fructosa	2 - 4
Sales inorgánicas	3 - 3,4
Sales orgánicas	1,5 - 4,5

Ácidos orgánicos	1 - 3
Aminoácidos	1,5 - 5,5
Proteína	0,5 - 0,6
Almidones	0,001 - 0,050
Gomas	0,3 - 0,6
Ceras, grasas, etc.	0,15 - 0,50
Compuestos fenólicos	0,10 - 0,80

Nota. Los porcentajes de la composición química fueron obtenidos de Chaves Solera (2004).

1.1.5. Polifenoles

1.1.5.1. Generalidades

Los polifenoles son metabolitos secundarios que se sintetizan en las plantas, su estructura química se caracteriza por tener uno o varios anillos fenólicos conectados por diferentes elementos estructurales lo que permite clasificarlas desde ácidos fenólicos simples, estilbenos, lignanos y alcoholes fenólicos hasta flavonoides complejos (**Ghani, 2020**). Los compuestos fenólicos pueden ser solubles o insolubles, característica ligada a su peso molecular bajo, medio o alto. Por otro lado, tienen la capacidad formar conjugados con elementos estructurales como; ácidos carboxílicos y orgánicos, lípidos, aminas, mono y polisacáridos (**Galanakis, 2018**).

En esa misma línea, estos compuestos reflejan cualidades beneficiosas para la salud, al participar en la regulación del metabolismo y peso (**Cory et al., 2018**). Además, gracias a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria contribuyen al tratamiento de enfermedades crónicas y control de la proliferación celular (**Lecour & Lamont, 2011**). Asimismo, gracias a que se encuentra en las paredes celulares de las especies vegetales estos compuestos de propiedades bioactivas, actúan como defensores frente a la agresión provocada por patógenos y proporcionan protección contra la radiación UV, estrés oxidativo y ambiental (**Quiñones et al., 2012**).

1.1.5.2. Propiedades antimicrobianas de los polifenoles

Naturalmente las plantas poseen polifenoles considerados fitoquímicos de actividad directa gracias a su rango amplio de acción como agente antimicrobiano. En general este puede inhibir la presencia de bacterias Gram positivas y Gram negativas, levaduras protozoos y hongos (**Khanzada et al., 2021**). Su

principal mecanismo de acción se centra en la alteración de la membrana citoplasmática y pared celular, lo que provoca disfunción metabólica y muerte celular, así:

- Los polifenoles inhiben la síntesis de enzimas intra y extracelulares como iones y azúcares. Además, este metabolito induce la disfunción de la membrana fúngica, aumenta la permeabilidad celular, reduce el pH provocando la desnaturalización de las proteínas **(Makarewicz et al., 2021)**.
- Algunos polifenoles como los flavonoides inhiben las topoisomerasas y síntesis de ácidos nucleicos causando daño al ADN. Así a concentraciones altas causa lisis celular provocando despolarización de la membrana e inhibición de la síntesis de ADN y ARN **(Makarewicz et al., 2021)**.
- Por otro lado, dependiendo del tipo de polifenol se puede observar inhibición completa o parcial de la actividad de la ATPasa y por ende del metabolismo energético. Así también se muestra una alteración en el transporte de nutrientes entre el interior de la célula, con la pared celular lo que permite reducir la proliferación de los microorganismos **(Vio-Michaelis et al., 2012)**.

1.1.5.3. Polifenoles en el residuo de caña de azúcar

La concentración de polifenoles es afectada por varios factores, entre ellos la especie vegetal, los perfiles fitoquímicos y el método de extracción utilizados; microondas, ultrasonido, Soxhlet, maceración, sonicación y solventes orgánicos, **(Putra et al., 2022)**. En promedio el bagazo de caña de azúcar está constituido por un 4,04% de sustancias extractivas propias de compuestos fenólicos. Estos se encuentran en las fibras vegetales del residuo, categorizándolas en tres grupos principales; flavonoides 50%; ácidos fenólicos 30% y otros polifenoles 20% **Forteza Monzón, (2015)**.

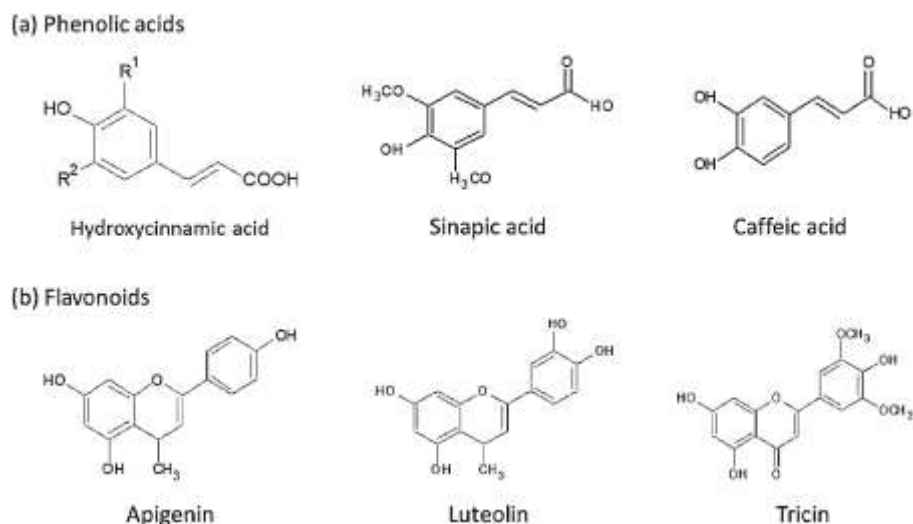


Figura 3. Fenólicos y Flavonoides del bagazo de caña de azúcar.

Nota. Estructura química de los polifenoles encontrados mediante cromatografía en el bagazo de caña de azúcar. Tomada de Wani et al., (2023)

Los polifenoles presentes en el residuo de caña de azúcar pueden presentar actividad antifúngica, esto se ha podido evidenciar en diversos estudios, donde han sido utilizados dentro de la evaluación de su capacidad inhibitoria frente a múltiples patógenos del reino Fungi como *B. cinerea*, teniendo como resultados lo descrito en la Tabla 4.

Tabla 4.

Porcentaje de inhibición de polifenoles presentes en el bagazo de caña de azúcar

Polifenol	Concentración (mg/ml)	Porcentaje de inhibición (%)
Flavonoles	50	74
Antocianinas	20	20
Ácido ferúlico	0,02	50,1
Resveratrol	20	70
Quercetina	0,2	50

Nota. Porcentajes de inhibición de polifenoles obtenidas de múltiples investigaciones Ávila et al., (2011), Yan et al., (2023); Lucas Bautista, (2018); Velázquez-Martínez et al., (2022); Carrillo,(2015).

1.1.6. Métodos de preservación de polifenoles

Dentro de la industria se exploran métodos que permitan preservar la vida útil de los polifenoles, para ello es necesario tener en cuenta los factores ambientales en los que se desempeña la sustancia, tales como temperatura, luz y oxígeno. A estos se puede añadir aditivos químicos encargados de proteger a los polifenoles del estrés oxidativo (antioxidantes) y de reacciones de oxidación (quelantes). Por otro lado, dentro de las industrias se aplican también técnicas de procesamiento basadas en congelación y deshidratación (liofilización, secado) **(Moreno Jiménez, 2022)**. Sin embargo, aquellas que reducen la temperatura de este compuesto manteniéndolo en estado líquido en ocasiones suelen resultar desfavorables ya que tienden a formar precipitados **(Guzmán, 2021)**. Por esta razón, los métodos que incluyen la deshidratación de los polifenoles se usan con mayor preferencia, ya que aseguran una mejor estabilidad en su integridad **(Loayza Gutiérrez, 2021)**.

1.1.7. Microencapsulación de polifenoles

La microencapsulación es considerada una técnica efectiva en la encapsulación de sustancias de bajo peso molecular. En ella se forman micropartículas permitiendo minimizar factores y condiciones ambientales que interfieren con la viabilidad de las sustancias **(Esquivel, 2015)**. Los compuestos orgánicos pueden verse afectados por factores ambientales como la temperatura, luz y oxígeno. Estos degradan las moléculas reduciendo su estabilidad y actividad biológica **(Kang et al., 2019)**. Este es el caso de los polifenoles que al exponerse a temperaturas mayores a 75 °C y pH 4 la molécula puede llegar a degradarse, por lo que la microencapsulación representa una alternativa viable para su conservación, además de permitir mejor manejo en la dosificación de tratamientos agrícolas **(Luna et al., 2017)**.

1.1.7.1. Secado por aspersión

El secado por aspersión es un método muy usado, permite obtener polvos finos o partículas secas de aproximadamente 10 a 50 µm a partir de una solución líquida o suspensión, en donde el principio activo se encuentra envuelto en el interior de la matriz polimérica. **(Olive, Dueik, and Diosady, 2023)**. El proceso ocurre tras alimentar la cámara de secado de la matriz con la mezcla homogénea de interés, el resultante se expone a un flujo de aire caliente que permita eliminar la humedad de la matriz mediante microgotas generadas por el atomizador. Las microcápsulas generadas al final se caracterizan por poseer una estructura esférica, no poseer porosidades y cuya película encapsulante permite mantener una fase interna definida en su interior **(Esquivel, 2015)**.

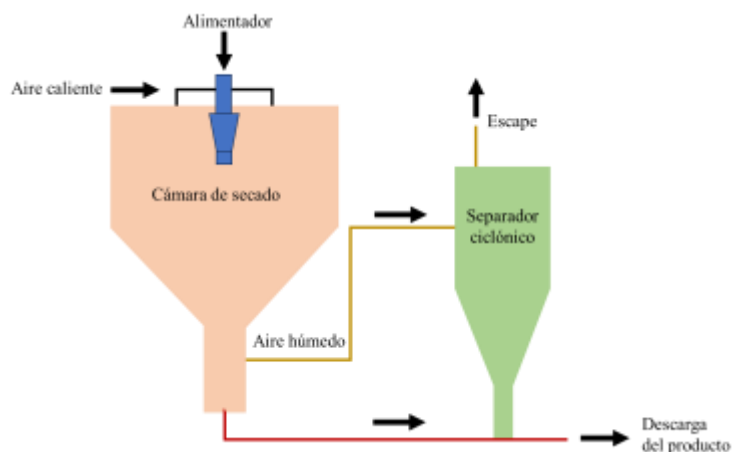


Figura 4. Proceso de secado por aspersión

Nota. Diagrama del proceso de microencapsulación mediante secado por aspersión. Adaptado de El Proceso de Secado Por Pulverización (2022).

1.1.8. *Botrytis cinérea*

1.1.8.1. Generalidades

B. cinérea conocido como “moho gris”, es considerado un hongo fitopatógeno capaz de infectar flores, frutos, tallos y hojas causantes de pérdidas económicas de entre 10 y 100 mil millones de dólares en todo el mundo, al ocasionar necrosis, podredumbre de tejidos blandos, colapso y saturación de agua de los tejidos del parénquima (Shao, Zhao, and Ma, 2021). Este hongo posee esporas asexuales llamados conidios y esporas sexuales conocidos como esclerocios que se propagan mediante agua y viento asegurando su supervivencia dentro el medio ambiente (Hua et al., 2018).

Por otro lado, para que este microorganismo pueda desarrollarse tiene que cumplir con ciertos factores de crecimiento tales como; ambientes ácidos con pH que rodeen los 3,5 a 8,0; temperaturas en un rango de 10 a 25 °C y 20 a 23 °C. que permitan infectar frutos y flores (Fedele, Brischetto, and Rossi 2020).

1.1.8.2. Taxonomía

La *B. cinerea*, es un hongo que puede llegar a infectar más de 2000 especies, esta prefiere a las dicotiledóneas como huéspedes, aunque también atacan a las monocotiledóneas (Roca-Couso et al., 2021). Este se caracteriza por su tejido aterciopelado e inclinación por dañar tejidos maduros o senescentes (Williamson et al., 2007) y pertenece a la familia de las Sclerotiniaceae con alrededor de 15 géneros y 260 especies como se puede observar en (Tabla 5)

Tabla 5.Taxonomía de *B. cinerea*,

Categoría taxonómica	
Reino	Fungi
Clase	Ascomycota
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>cinerea</i>

Nota. Tomado de Infante et al. (2009).

1.1.8.3. Mecanismo de infección

Este hongo puede llegar a infectar a sus huéspedes en los inicios del cultivo, donde se mantienen inactivos hasta la madurez de las plantas (Roca-Couso et al., 2021) . Los esclerocios se desarrollan dentro los tejidos vegetales, para producir después conidióforos y conidios multinucleados (Williamson et al., 2007). Tras la germinación de estos últimos se da la penetración del patógeno directamente en los tejidos mediante la creación de una clavija que rompe la cutícula o a través de heridas previas (Boddy, L.,2016). Tras esto, la *B. cinerea* actúa como biotrofo dentro de la planta, para luego desencadenar cambios bioquímicos en los nutrientes propios de la maduración de la planta (Cheung et al., 2020). Durante la etapa de necrosis, el hongo altera el metabolismo del huésped mediante la liberación de enzimas y ácido oxálico que degradan la pared celular y destruyen el sistema inmunitario e integridad celular. (Roca-Couso et al., 2021).

1.1.8.4. Técnicas de control

Existen múltiples técnicas que permiten inhibir el crecimiento y propagación de la *B. cinerea* dentro de los cultivos. Durante décadas, se ha presenciado el uso de pesticidas químicos como la única forma de contrarrestar este hongo; sin embargo, estudios han permitido evidenciar que este produce residuos toxicológicos que se acumulan en el suelo, lo que puede provocar resistencia en el microorganismo (Cheung et al., 2020). Por otro lado, se ha evidenciado al control biológico como una alternativa favorecedora, esta utiliza agentes microbiológicos que inducen resistencia del huésped, o a su vez producen enzimas con capacidad de lisis celular favoreciendo la infección del patógeno (Hua et al., 2018) . Por último, se estudia la posibilidad del uso de compuestos fitoquímicos derivados de

metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas que posean beneficios similares a los fungicidas químicos con la diferencia de que estos no sean tóxicos a corto o largo plazo (Mesa et al., 2019).

1.1.9. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de polifenoles

En la agroindustria varios de sus productos son propensos al ataque de agentes microbianos, por lo que durante décadas esta ha buscado innovar con productos que además de presentar alta efectividad, no sean nocivos para la salud humana (Pérez et al., 2020). Es por ello por lo que los insumos fitoquímicos extraídos de plantas se evalúan en principio mediante pruebas *in vitro* previo a su uso en sembradíos (Luna et al., 2017). Es así como la caracterización de los factores de patogenicidad, mecanismos de infección y metodologías experimentales son elementos esenciales que proporciona información crucial para la identificación de puntos de intervención, con el fin de desarrollar estrategias de control duraderas, efectivas y respetuosas con el medio ambiente (Roca-Couso et al., 2021).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico de un microencapsulado rico en polifenoles a partir de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L) frente a *Botrytis cinerea*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Extraer polifenoles a partir del residuo de la caña de azúcar.
- Obtener un microencapsulado de polifenoles del extracto de residuo de la caña de azúcar.
- Determinar mediante pruebas *in vitro* la capacidad antifúngica del microencapsulado de polifenoles del extracto obtenido frente a *Botrytis cinérea*.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis Nula

El microencapsulado rico en polifenoles de *Saccharum officinarum* L no tiene actividad antifúngica frente a *Botrytis cinérea*.

1.3.2. Hipótesis Alternativa

El microencapsulado rico en polifenoles de *Saccharum officinarum* L tiene actividad antifúngica frente a *Botrytis cinérea*.

1.4. Variables

1.4.1. Variables independientes

- Proceso de extracción

Tabla 6. Variables independientes en el proceso de extracción

Variables	Niveles
Concentración de etanol	30%
	50%
	70%
Tiempo de extracción	30 min
	45 min
	60 min

- Evaluación de actividad antifúngica

Tabla 7. Variables independientes de la evaluación de actividad antifúngica

Variables	Niveles
Concentración de polifenoles en el microencapsulado	10%
	30%
	50%
Tiempo	8 (días)

1.4.2. Variables dependientes

Concentración de polifenoles obtenidos, eficiencia de microencapsulación, porcentaje de inhibición del microencapsulado frente a *Botrytis cinerea*.

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Material Vegetal

Bagazo de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L)

2.1.2. Reactivos

- Etanol 96%
- Reactivo de Folin-Ciocalteu
- Carbonato de sodio
- Ácido gálico
- Agar Papa Dextrosa (PDA)
- Gentamicina
- Agua destilada
- Solución salina
- Maltodextrina
- Fungicida comercial (Manzate)

2.1.3. Insumos de laboratorio

- Matrices Erlenmeyer de 250 mL
- Vaso de Precipitación 250 mL
- Frasco tapa rosca azul 250 mL
- Tubos falcom
- Tubos eppendorf
- Magnetos Elicrom
- Termómetro
- Frascos ámbar
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Paquete de fundas Ziploc de Aluminio

- Micropipetas de 100-1000 μ L y 20-200 μ L
- Puntas de micropipetas
- Probeta
- Pinza
- Paquete de cajas Petri (x10)
- Mechero Bunsen

2.1.4. Equipos

- Balanza analítica Ohaus PA-313
- Destilador de agua QUMIS
- Espectroscopio FTIR Perkin Elmer Spectrum Two
- Mini Spray Dryer BUCHI -B290
- Deshidratador por convección (5093443)
- Plancha de calentamiento Corning PC-620D
- Refrigerador INDURAMA
- Espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go
- Rotoevaporador IKA HB10
- Balanza de humedad Kern MLS 50-3
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Computador Hp con sistema operativo Windows 10

2.2. Métodos

2.2.1. Obtención del material vegetal

El bagazo de caña de azúcar (*S. officinarum* L) se obtuvo de la recolección de residuos producidos frente al terminal terrestre de la ciudad de Baños, en los locales dedicados a la venta de subproductos a partir de esta planta. A continuación, estos fueron almacenados y trasladados a los laboratorios de la UODIDE de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología para su uso.

2.2.2. Preparación del material vegetal

Se llevó a cabo un proceso de purificación donde se lavó con agua destilada el residuo vegetal para eliminar sus impurezas. Después para el proceso de secado se cortó en pedazos uniformes y pequeños

al bagazo, a continuación, se los llevó al deshidratador por convección durante 50 horas a 50 °C. Finalmente se trituro las muestras secas con ayuda de la licuadora y se los almacenó en una funda hermética para preservarlos (Putra et al., 2022).

2.2.3. Obtención de extractos

Se realizó nueve tratamientos donde se usó tres soluciones acuosas de etanol a concentraciones de 30, 50 y 70 (%v/v) para su posterior evaluación de rendimiento de extracción a tres tiempos 30, 45 y 60 minutos cada uno, con una relación de material vegetal/disolvente 1:20. Se colocó 100 mL del disolvente en un vaso de precipitación que fue llevado a la plancha de calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 70 °C. Se colocaron 5 g del polvo de bagazo en la solución para tomar inmediatamente el tiempo con ayuda de un cronometro, mientras se mantenía una agitación de 400 min⁻¹ y temperatura constante hasta terminada la extracción. Por último, el extracto fue filtrado para luego medirlo con una probeta y llevarlo a almacenaje en frascos ámbar para su posterior uso (Zhao Z et al., 2020).

A continuación se presenta los nueve diferentes tratamientos empleados dentro del estudio, donde se especifica las variables a analizarse; así, la concentración de etanol usada como solvente orgánico para obtener polifenoles del residuo vegetal y el tiempo en minutos a los que este fue expuesto durante el proceso de extracción.

Tabla 8.

Tratamientos de extracción

Tratamiento	Concentración de etanol (%)	Tiempo (min)
A	30	30
B	30	45
C	30	60
D	50	30
E	50	45
F	50	60
G	70	30
H	70	45
I	70	60

Nota. En la tabla se exponen las condiciones empleadas dentro del proceso de extracción de polifenoles.

2.2.4. Determinación de sólidos totales

Se determinó el contenido de humedad residual de cada extracto realizando por triplicado la medición de la humedad. Se colocó en el platillo de la balanza de humedad 2,3g de cada muestra y se inició con el proceso. Posteriormente el equipo arrojó el porcentaje de humedad, el mismo que se reemplazó en la ecuación de determinación de sólidos totales según lo expresado por (Putra et al., 2022).

$$\% SST = 100 - \% Humedad \text{ (Ec1)}$$

2.2.5. Determinación de polifenoles totales

Se determinaron los polifenoles totales de los extractos obtenidos empleando el método de Folin-Ciocalteu según la metodología de Putra et al., (2022) con algunas modificaciones.

En una placa de 96 pocillos se colocó 10 μL del extracto obtenido de caña de azúcar, 130 μL de agua destilada y 10 μL del reactivo de Folin para posteriormente dejarlo reposar por 6 minutos. A continuación, se colocaron 100 μL de solución de carbonato de sodio al 7%, se cubrió con papel aluminio la placa para proteger la solución de la luz, debido a que el reactivo es fotosensible y se almacenó durante 1 hora en un lugar oscuro.

Transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia con un espectrofotómetro UV-Vis a una longitud de onda de 765 nm y el resultado de este cálculo se expresó en términos de miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de muestra (mg GAE/g).

$$\text{Contenido fenólico total} = \frac{(\text{Equivalente de ácido gálico}) \text{ (GAE)} \text{ (mg)}}{\text{g muestra de masa seca}} \text{ (Ec2)}$$

2.2.6. Preparación de soluciones

Para la microencapsulación se utilizó el método de secado por aspersión, para lo cual se preparó una solución de agua destilada y el extracto de mayor concentración de polifenoles al cual se adiciono la maltodextrina como polímero encapsulante; teniendo una relación 20:80, sólidos de extracto: polímero (Esquivel, 2015).

2.2.7. Secado por aspersión para la obtención de microencapsulados

Se realizó el secado por aspersión mediante el uso de un Mini Spray Drier (Büchi B-290) en donde las condiciones de operación fueron: temperatura de entrada 150 °C; temperatura de salida de 84 °C; caudal de aspirador de 100%. Tras ello se realizó la recolección de los polifenoles microencapsulados para su posterior pesaje y almacenamiento (Ríos-Aguirre & Gil-Garzón, 2021).

2.2.8. Evaluación de eficiencia de microencapsulación cualitativa mediante FTIR

Se evaluó cualitativamente la eficiencia de microencapsulación haciendo uso del espectroscopio infrarrojo FTIR (PerkinElmer) situado en el Laboratorio de Canje de deuda- España de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. La evaluación se realizó aplicando un intervalo de frecuencias entre 500 a 4000 cm^{-1} para las muestras del extracto de polifenol sin microencapsular y se repitió el proceso para el polímero utilizado y el microencapsulado obtenido previamente mediante el proceso de secado por aspersión (Estevinho et al., 2016).

2.2.9. Cálculo de rendimiento del proceso de microencapsulación

Se obtuvo el valor del rendimiento de encapsulación del polvo obtenido de la mezcla del extracto de polifenoles y maltodextrina a partir de la fórmula propuesta por Pinheiro et al., (2019), misma que fue adaptada.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{polvo microencapsulado de polifenoles obtenido (g)}}{\text{masa de sólidos alimentada al secador (g)}} \times 100 \text{ (Ec3)}$$

2.2.10. Determinación de la eficiencia de microencapsulación

Se cuantifico el contenido de polifenoles totales y superficiales de la microesfera mediante la elaboración de dos soluciones. Se disolvió 0,25 g de microencapsulado en 5 ml de agua destilada y 0,25 g de microencapsulado en 5 ml de etanol al 96%. Posteriormente se llevaron las soluciones a centrifugar durante 5 minutos a 4000 min^{-1} . A continuación, se realizó la cuantificación de polifenoles totales, haciendo uso de la metodología establecida en el apartado 2.2.5., donde en lugar del extracto se usó el sobrenadante de las soluciones acuosa y alcohólica. Por último, se reemplazaron los valores obtenidos en la ecuación de la eficiencia de microencapsulación.

$$EE\% = \frac{CPT_{Agua} - CPS_{Etanol}}{CPT_{Agua}} \text{ (Ec4)}$$

Donde:

EE% = Eficiencia de la microencapsulación

CPT_{Agua} = Concentración de polifenoles totales en la microesfera

CPS_{Etanol} = Concentración de polifenoles presentes en la superficie de la microesfera

2.2.11. Elaboración de placa madre de *B. cinerea*

Se elaboro 260 ml de medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), al cual se lo autoclavó a 121 °C durante 15 minutos. Dentro de la cámara de flujo se le colocó 0,40625 ml de Gembexil 160 mg (gentamicina) es decir 125 ppm según la metodología propuesta por **(Rodríguez, 2013)**. Se cortó con un bisturí una porción de micelio de la *B. cinerea*, y se lo colocó en el centro de la placa. Posteriormente se incubó durante 8 días a 27,5 °C.

2.2.12. Identificación microscópica y macroscópica de *B. cinerea*

- Microscópica

Se tomó un portaobjeto al cual se le añadió una gota de azul de lactofenol. Se rozó el hongo de la placa madre con ayuda de un asa de microbiología con la finalidad de que este se impregne en él. A continuación, se colocó en el portaobjeto y se realizó movimientos suaves para incorporarlo en el colorante. Luego se colocó el cubreobjeto y se procedió a observarlo en el microscopio óptico.

- Macroscópica

Se observó las características fenotípicas macroscópicas de la *B. cinerea*, como color del micelio, aparición de esclerocios y textura.

2.2.13. Evaluación de la actividad antifúngica del microencapsulado frente a *B. cinerea*

En las placas Petri previamente preparadas que contenían PDA y gentamicina se colocaron 2 círculos de papel filtro, de los cuales uno se sumergió en las soluciones del microencapsulado a diferentes concentraciones (10%, 30% y 50%), y se colocaron en una esquina de la caja Petri. Luego se tomó otro disco el cual se sumergió en solución salina y pasó por la placa madre con la finalidad de que las esporas del microorganismo se queden en él para luego colocarlo dentro de la caja Petri en el extremo frente al

del papel filtro que posee el microencapsulado. Por último, se incubó a 27 °C durante 8 días. Este proceso se realizó por triplicado para cada tratamiento, además para el control negativo se utilizó agua destilada en lugar del microencapsulados de polifenoles, mientras que como control positivo se usó 5% de “Manzante” fungicida comercial cuyo principio activo es el Mancozeb **(Rodríguez, 2013)**.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Obtención de extractos y cuantificación de polifenoles totales

El manejo de residuos vegetales debido a la contaminación que puede generar en el medio ambiente se ha convertido en el uno de los temas de interés dentro del estudio de la biotecnología. Este es el caso del residuo de caña de azúcar, mismo que cuenta con compuestos orgánicos de interés tales como los polifenoles. En la presente investigación se buscó obtener un extracto rico de polifenoles mediante la técnica de solventes orgánicos debido a la afinidad y eficacia de obtención de los metabolitos deseados.

Dentro de este estudio, se estableció y evaluó un total de los tratamientos que permitiesen analizar las condiciones de temperatura y concentración de etanol que minimizaran la degradación del metabolito secundario de interés y maximizara los niveles de polifenoles en los extractos, para luego ser sometidos a un diseño experimental 3² donde se visualizó las medias resultantes de los tratamientos realizados.

Es así como en la tabla 9 se muestran los resultados de las medias de la evaluación de la extracción de polifenoles obtenidos a partir de los tratamientos A,B,C correspondientes a tres diferentes concentraciones de soluciones hidroalcohólicas de etanol (30, 50 y 70) , cada una sometida a tres tiempos de exposición (30, 45 y 60 minutos), es decir un total de nueve tratamientos diferentes.

Tabla 9. Contenido total de polifenoles obtenidos de los tratamientos.

Tratamiento		Concentración de etanol (v/v)	Tiempo de extracción (min)	Contenido total de polifenoles (mg GA/ g)
A	1	30	30	36,321 ± 2,884
	2	30	45	28,919 ± 1,741
	3	30	60	29,237 ± 0,942
B	1	50	30	44,275 ± 1,296
	2	50	45	39,396 ± 1,735
	3	50	60	46,414 ± 5,296
C	1	70	30	39,554 ± 2,020
	2	70	45	45,333 ± 8,325

3	70	60	36,961 ± 1,231
---	----	----	----------------

Nota. Se muestra en la presente tabla el contenido total de polifenoles, en una relación 1:20 vegetal/volumen de solvente realizado mediante el método de Folin-Ciocalteu.

Se calculó la concentración de polifenoles mediante el uso del método de Folin-Ciocalteu, con el que se obtuvo el contenido total de polifenoles del residuo de caña de azúcar (*S. officinarum* L), como se puede observar, se sometió a diferentes concentraciones de solvente y tiempos de exposición, con un intervalo en los tratamientos A2 y B3 cuyos valores fueron: mínimo de $28,919 \pm 1,741$ y máximo de $46,414 \pm 5,296$ (mg GA/ g) respectivamente. Estos valores al ser analizados revelan superar a los rangos obtenidos por otra investigación, la cual se centró en la extracción de estos metabolitos del mismo residuo pero con métodos de extracción diferentes como la maceración al 70% de etanol, presentándose un total de polifenoles de 1,67 mg GAE/g (**Putra et al., 2022**).

Por otro lado, un estudio en el que se utiliza el etanol como solvente para la extracción del metabolito de interés en el residual de la quinoa a las mismas concentraciones de nuestra investigación (30, 50, 70% v/v) mostraron que se obtuvo valores altos, así 179 y 229 mg de GAE /100 g de polifenoles. Las diferencias de estos valores sugieren que el método de extracción, como el disolvente utilizado influye en la cantidad de concentrado fenólico obtenido, independiente de los materiales vegetales que se utilicen.

Tras las pruebas realizadas dentro del laboratorio de la concentración de polifenoles, se procedió a realizar su respectivo análisis estadístico. Es así como seguidamente en la figura 5 se muestra el diagrama de Pareto, el cual permitió comprender gráficamente las variables estudiadas en el proyecto de investigación, así como la influencia de cada uno, favoreciendo a la optimización de los valores obtenidos en la tabla ANOVA.

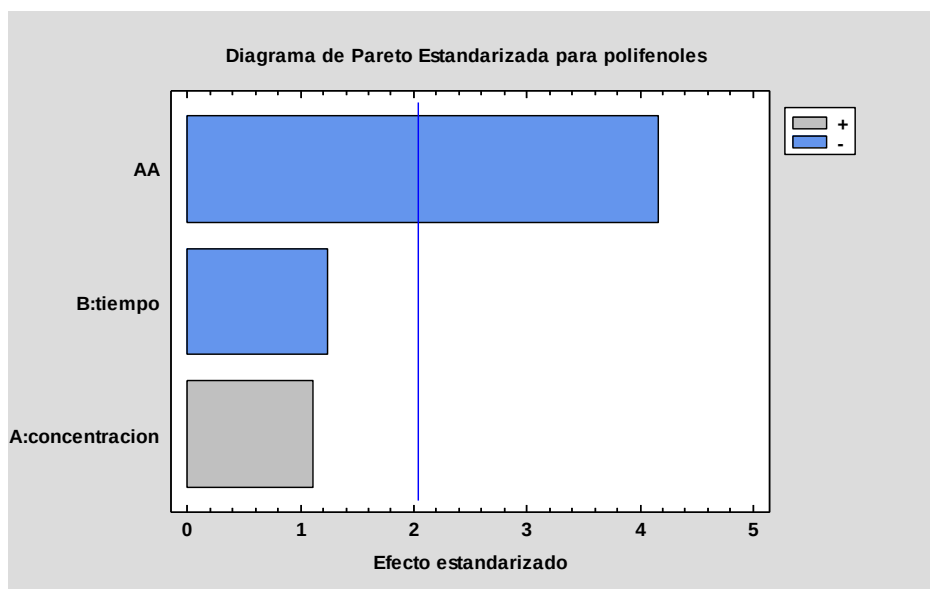


Figura 5. Diagrama de Pareto Estandarizada para polifenoles totales

Nota. Gráfico obtenido de Statgraphics, este demuestra los factores influyentes dentro del proceso de extracción de polifenoles. A:Concentración y B:Tiempo de extracción empleado

Como se puede observar en la figura 5 se demuestra que en el análisis de varianza únicamente el factor AA tuvo influencia significativa ($p < 0,05$) dentro del proceso de extracción de polifenoles lo que puede ser apreciado también en la tabla ANOVA **anexo1**. Al ser este factor un efecto cuadrático y no una variable lineal se puede asumir que, de ser el caso si la concentración llega a ser mayor o menor de lo estipulado como valor óptimo, podría llegar a producirse cambios no proporcionales en la respuesta alterando los resultados finales de la investigación, como lo describe **Montgomery, (2017)** al referirse a los cambios no proporcionales propios de los efectos cuadráticos que alteran la respuesta cuando los valores de los factores se desvían de los óptimos.

A continuación, se observa la **figura 6**, correspondiente al gráfico de superficie de respuesta estimada. Esta permite evaluar óptimamente la variable respuesta, maximizando significativamente el rendimiento del proceso de extracción de polifenoles, mismo que se ve afectado por los cambios que ocurren en las variables de entrada como el tiempo de exposición y la concentración del solvente.

Optimizar Respuesta

Meta: Maximizar la concentración de polifenoles

Valor óptimo= 71,4134 porciento

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración	30,0	70,0	53,7246
Tiempo	30,0	60,0	30,0

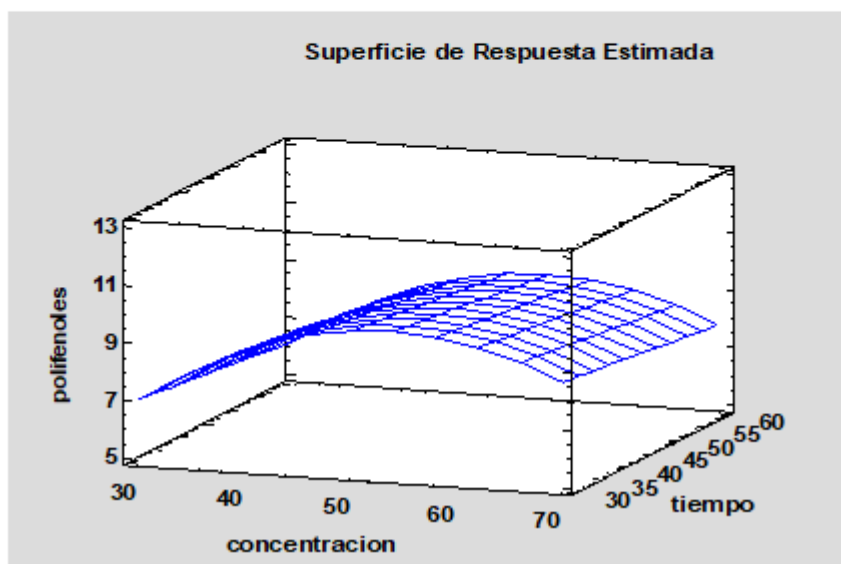


Figura 6 Gráfico de superficie de respuesta estimada.

Nota. El gráfico muestra las condiciones óptimas con las que se debería trabajar para favorecer el proceso de obtención de polifenoles

Como se puede observar en la **figura 6**, se presenta un gráfico cuyo punto estacionario es de máxima respuesta, demostrándose así que, si se aumenta el tiempo de reacción del valor óptimo, la superficie de respuesta comienza a disminuir. Además, si se reduce la concentración del disolvente por debajo del valor óptimo, la superficie de respuesta decae, por lo que al trabajar con los valores óptimos de ambos factores se logra maximizar la concentración de polifenoles en el extracto. Es así como se determinó que la mejor concentración de solvente dentro de este proceso consiste en aplicar etanol al 53,7246% durante un tiempo de exposición de 30 minutos del residuo vegetal.

En comparación a esto, se puede tomar como ejemplo la investigación de (**Girardi et al., 2019**) donde obtuvo como mejor tratamiento el uso de etanol al 50% durante 30 minutos para un total de $728,201 \pm 58,21$ mg GAE/100 g de base seca de polifenoles. Además, dentro la presente investigación se trabajó con la temperatura de ebullición del solvente a 70°C, que a comparación de los 60°C utilizados por (**Girardi et al., 2019**) permiten demostrar que la temperatura dentro de procesos de extracción

puede influir significativamente, debido a que a temperaturas mayores de exposición los compuestos fenólicos tienden a degradarse disminuyendo su concentración debido a las reacciones de oxidación que en ellas se produce (**R et al., 2017**).

Además, es importante tener en cuenta el rol que cumple el etanol como solvente ya que, al ser considerado polar, este influye positivamente en la extracción de los metabolitos presentes en la caña de azúcar. Esto es posible gracias a la afinidad que presenta con los polifenoles, ya que permite aumentar la solubilidad del material orgánico con menor polaridad (**Guntero et al., 2015**). Por otro es importante tomar en cuenta que los compuestos fenólicos de la caña de azúcar son de solubilidad variable, por lo que una mezcla entre agua y etanol suele resultar efectiva ya que proporciona un balance en la polaridad de la solución posiblemente debido al debilitamiento de los enlaces de hidrógeno en las soluciones acuosas, favoreciendo la extracción de aquellos considerados como moderadamente polares (flavonoles y resveratrol) y polares (antocianinas y ácido ferúlico) (**Garcés et al., 2023**).

3.1.2. Microencapsulación

La microencapsulación se presenta como un método que además de preservar las propiedades fisicoquímicas de los diferentes metabolitos les otorga una estabilidad adecuada durante un periodo prolongado de tiempo. Es por esto por lo que su uso ha ido incrementando en la actualidad dentro del procesamiento de polifenoles, estas al poseer funciones biológicas de interés son incorporadas en diversas matrices alimentarias, farmaceutas y cosméticas asegurando que sus compuestos se mantengan estables (**Ríos-Aguirre & Gil-Garzón, 2021**)

Dentro de este estudio se utilizó la técnica de secado por aspersión que mediante el uso de una mezcla de agua y maltodextrina como agente encapsulante a una temperatura de entrada de 150 y una de salida de 84°C se logró obtener microesferas cuyo compuesto bioactivo obtenido a partir del extracto purificado de los polifenoles del residuo de la caña de azúcar es hidrosoluble.

A continuación, se observa la **Tabla 10**, en donde se puede evidenciar los resultados del rendimiento y eficiencia del microencapsulado tras la medición de sus concentraciones al ser disuelto tanto en agua como en etanol mediante el empleo de la técnica de Folin- Ciocalteu.

Tabla 10. Eficiencia de la microencapsulación

Muestra	Concentraciones (mg GAE/ L)	Rendimiento	Eficiencia
Microencapsulado + Agua	63,72916667	74,98%	82,92
Microencapsulado + Etanol	12,81818182		

Nota. Muestras utilizadas dentro de la medición de la eficiencia del microencapsulado en agua o etanol en una relación 1:20.

Es así como tras realizado el proceso de microencapsulación donde la relación de la sustancia activa:polímero fue de 20:80 obteniendo así un rendimiento de microencapsulación. Este se consideró como alto, ya que al calcular la relación de cantidad de microencapsulado obtenido (37,37 g) y microencapsulado esperado (49,83 g) (**Ec3**) se obtuvo un resultado de 74,98%, lo que demuestra que tan solo 25,02% de unidades de microencapsulado se perdieron durante el proceso de secado. Este resultado se estima como adecuado dentro de la escala de laboratorio en contraste a nivel industrial, ya que gracias en ellos existen equipamientos que maximizan la recuperación del polvo en el interior de los secadores (**Hernández et al., 2022**). Además, es importante denotar a la maltodextrina, ya que se considera que el uso de este como agente encapsulante favorece al aumento del rendimiento de las sustancias a secar, provee una matriz de soporte del extracto a secar y permite la obtención de polvo de libre flujo (**López et al., 2004**).

Por otro lado, se calculó la eficiencia del proceso de microencapsulación realizado con maltodextrina. Es así como se obtuvo un valor de 82,92%, el mismo que resulta ser alto en relación con lo obtenido por **Rios-Aguirre y Gil-Garzón (2021)** dando en su investigación un total de eficiencia de 80% para un extracto fenólico de pulpa de *Averrhoa carambola*. Esta similitud en los resultados puede ser consecuencia del uso del mismo agente encapsulante, la maltodextrina, el cual resulta favorecedor en mezcla con polifenoles porque permite inducir una formación rápida de la microesfera que otorga mayor estabilidad (**Altintas et al., 2016**). Así también, se calculó la concentración de polifenoles existentes en el microencapsulado, con un total de 63,73%, valor que puede ser considerado bajo, esto puede deberse a la temperatura de entrada de 150 °C, tal como sugiere (**Tolun et al., 2016**) en su estudio, donde a temperaturas mayores de 140 °C la pérdida en concentración total de polifenoles suele resultar ser significativa.

3.1.3. Análisis por espectroscopia infrarroja (FTIR)

La Espectroscopía Infrarroja por la Transformada de Fourier (FT-IR), es una técnica que permite determinar grupos funcionales de compuestos orgánicos e inorgánicos basada en la absorción y emisión

de radiación infrarroja por parte de las moléculas además de registrar las diferentes frecuencias de radiación infrarroja **(Berna, 2017)**.

El espectro FTIR consta de picos de absorción que corresponden a las frecuencias de vibración entre los enlaces de los átomos en la partícula en función del número de onda o longitud de onda. Se considera una técnica excelente para el análisis cualitativo de compuestos orgánicos **(Estevinho et al., 2016)**.

Es así como la eficiencia de la microencapsulación también se verificó mediante la aplicación del FTIR, en donde se analizaron los grupos funcionales de las muestras del agente encapsulante (maltodextrina), extracto líquido del residuo y del microencapsulado. En la figura 7, perteneciente a la muestra del extracto líquido, se aprecian claramente cuatro picos distintivos cuyo rango va desde 600 a 4000 cm^{-1} , siendo estos: 3316,72 cm^{-1} , 1633,56 cm^{-1} , 1258,39 cm^{-1} y 1053,48 cm^{-1} .

En dicho contexto se puede afirmar que el proceso de extracción de compuestos fenólicos fue realizado con éxito ya que al comparar los resultados con bibliografía demuestran que, según **(Dai et al., 2023)** en las bandas de absorción en la región de 3700 y 3600 cm^{-1} asociadas con estiramientos de O-H, se encuentran presentes en diversos compuestos orgánicos que incluyen polifenoles. Por otro lado, las bandas de absorción en la región de 1700-1600 cm^{-1} vinculadas a estiramientos de C=O, denotan compuestos orgánicos como ácidos carboxílicos, aldehídos y cetonas **(Saavedra Nizama et al., 2010)**. Dentro del gráfico cabe mencionar que aquellos picos situados en el rango de 1600 y 1500 son propios del estiramiento de -OH quelatado, asociado con los grupos carbonilo presentes en las antocianinas **(Barragán Condori et al., 2018)**, mientras que aquellos en un rango de 1200 cm^{-1} son representativos del estiramiento fenólico de C-O propio del pirano, típico de los anillos C de los taninos **(Wongsa et al., 2022)**. Sin embargo, es importante mencionar que el último valor que se presenta en un rango de 1000 cm^{-1} , no pertenece a los grupos fenólicos, sino más bien a las cetonas y ésteres, resultado posible que los compuestos en este sean pertenecientes a los aceites esenciales que posee la planta.

En la **figura 7** se puede observar la imagen obtenida a partir de la prueba cualitativa FT-IR, propia del extracto líquido de polifenoles a partir del bagazo de caña de azúcar, en la cual se presenta una línea negra con picos y rangos que favorecen a la interpretación de los valores de las absorciones de los grupos funcionales.

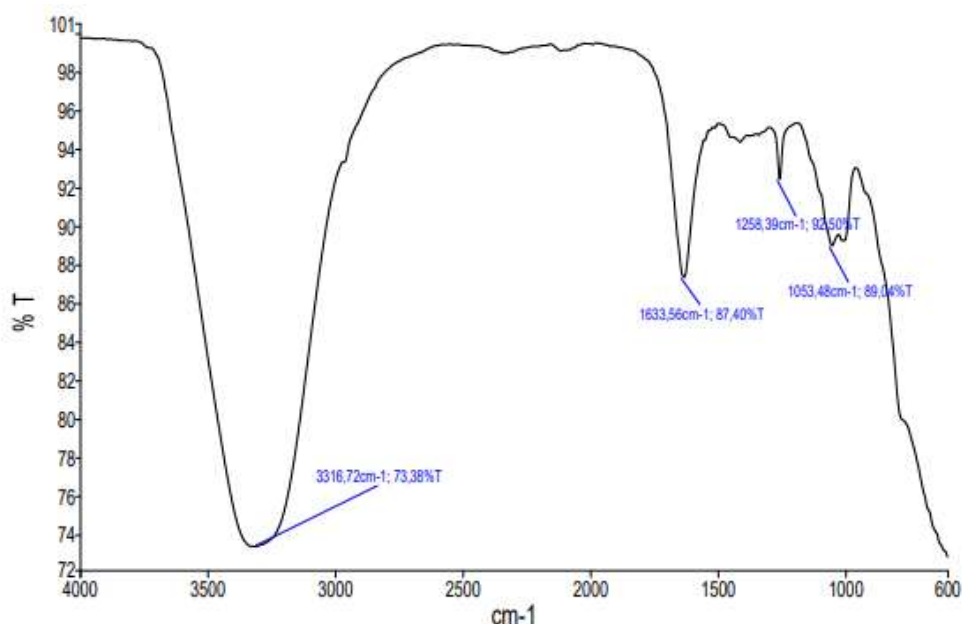


Figura 7. Resultado de la espectrometría infrarroja del extracto de bagazo de caña de azúcar

Nota. En la figura se muestra los rangos y picos obtenidos del extracto concentrado a partir del residuo de la caña de azúcar.

Se analizaron también los picos representativos del agente encapsulante, siendo este polímero la maltodextrina, tal como se muestra en la **figura 9**. Se observó cinco valores significativos; 3312 cm^{-1} , 2926 cm^{-1} , $1360,33\text{ cm}^{-1}$, $1148,30\text{ cm}^{-1}$, $1077,38\text{ cm}^{-1}$. Estos números se encuentran en la clasificación de bandas características, como el estiramiento O-H en el rango de $3200\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$, correspondiente a los grupos hidroxilo propios de los azúcares (**Sánchez-Molina et al., 2018**). También, la banda de flexión C-H situada en $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$, relacionada con los grupos metilo y metileno en la molécula. La banda de estiramiento C=O presente en $1700\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ asociada con los grupos carbonilo de los azúcares (**Estupiñan Amaya, 2022**). Además, la banda de flexión C-H se encuentra en el intervalo de $1350\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$, relacionada con la deformación de los enlaces C-H. Por último, la banda de estiramiento C-O, ubicada en el rango de $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, relacionada con los grupos éter y éster presentes en la maltodextrina (**Alfaro Bejarano, 2022**).

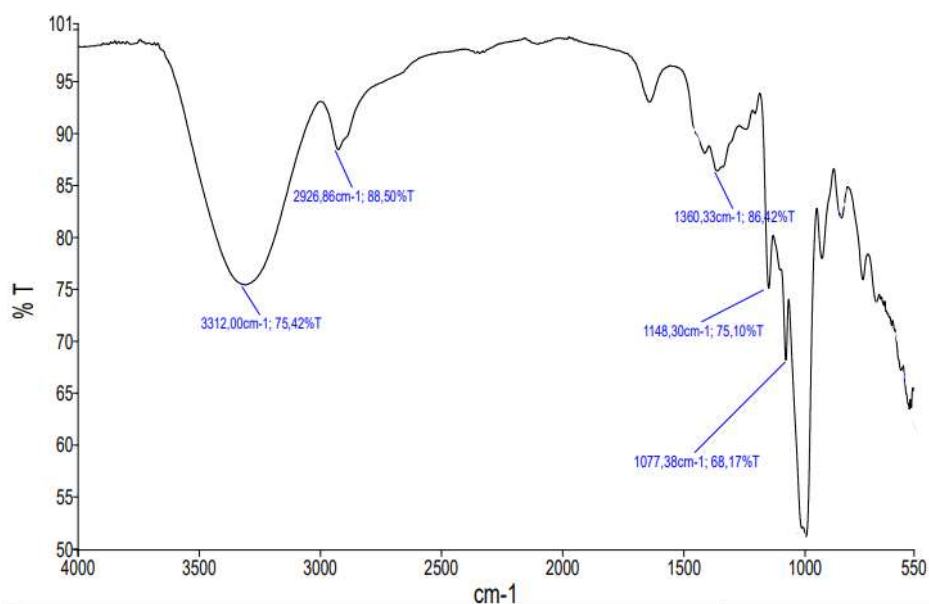


Figura 8 Resultado de la espectrometría infrarroja del agente encapsulante

Nota. En la figura se muestra los rangos y picos obtenidos de la maltodextrina

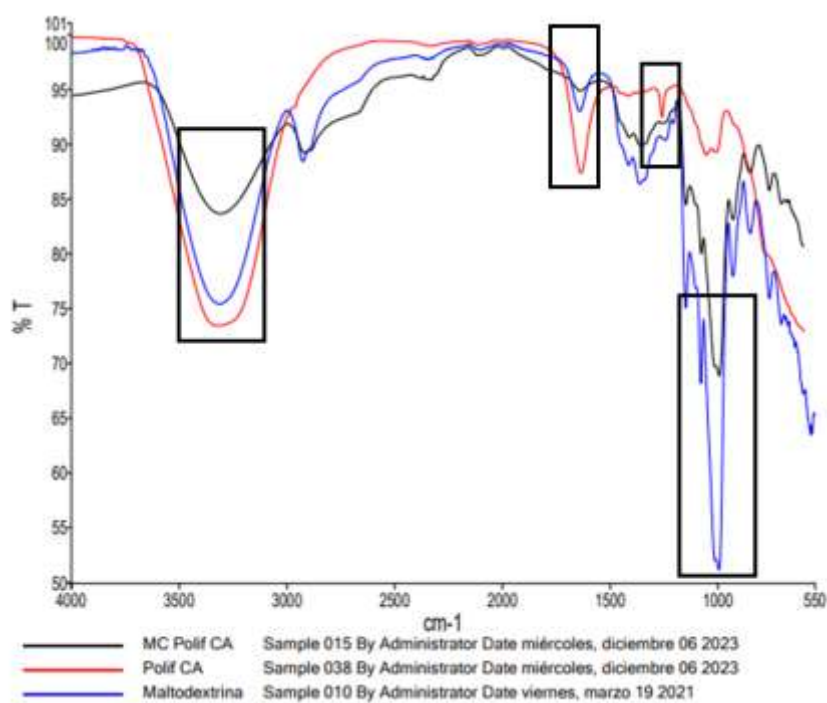


Figura 9. Resultado de la espectrometría infrarroja del microencapsulado

Nota. En la figura se muestra la comparación de los espectros obtenidos del microencapsulado de polifenol con maltodextrina

Así, se logró determinar la eficiencia de forma cualitativa del proceso mediante el análisis de la **Figura 8**. Se observó esta eficiencia en las tres líneas representadas siendo notoria la similitud pronunciada en los picos entre las líneas correspondientes al microencapsulado (negro) y la maltodextrina (azul) en los tres picos observados de derecha a izquierda, en contraste con la línea de polifenoles (roja). Este hecho evidencia que las moléculas de polifenoles del extracto líquido ya no se encuentran en estado libre, sino que han formado un complejo con el polímero encapsulante asegurando el aumento del efecto protector y la estabilidad del material de la pared (**Maqsoudlou et al., 2020**).

3.1.4. Identificación de *B. cinerea*

Dentro de todo estudio microbiológico, es necesario realizar la identificación de los microorganismos que van a ser empleados con la finalidad de asegurar la precisión en los resultados deseados, así como el uso de protocolos adecuados que permitan un desarrollo óptimo bajo condiciones adecuadas, así como la prevención de patogenicidad frente a quien lo manipula y desecho correcto. Es así como en la figura 10 se puede observar el análisis microscópico del hongo con el que se trabajó en el presente estudio *B. cinerea*, el cual fue posible gracias al uso de un tinte que permitió identificar las estructuras que presenta el microorganismo.

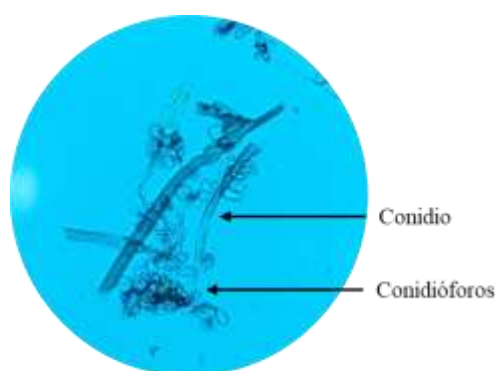


Figura 10. *B. cinerea*

Nota. Observación microscopía de *B. cinerea* mediante lente 40X

Se realizó la identificación del hongo con el que se trabajó previo a su inoculación en las diferentes placas de la prueba de evaluación antifúngica. Al ser la muestra sometida al método de tinción con azul de lactofenol y analizarse bajo el microscopio se observó estructuras representativas de la *B. cinerea*, en la figura 10 así; conidióforos ramificados con células apicales redondeadas y conidios elipsoidales agrupados, asemejando su morfología a un racimo de uvas tal como lo reportado por (**Isaza et al., 2019**)

Así también, se puede observar a continuación en la **figura 11** la caja Petri cubierta completamente por el hongo tras 8 días de haber sido inoculada a una temperatura de 27,5 °C en medio de Agar papa dextrosa (PDA) , pudiéndose así obtener de un cultivo puro, de *B. cinerea*, el cual se usó como “caja madre” para las pruebas que se realizaron posteriormente.

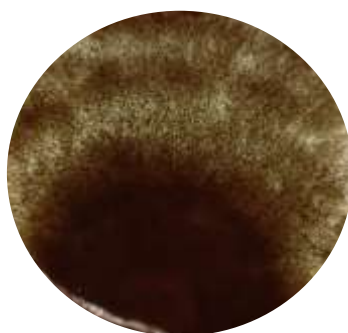


Figura 11. Placa madre de *B. cinerea*

Nota. Subcultivo de *B. cinerea* de una placa con cultivo puro

Dentro de las principales características fenotípicas macroscópicas que pueden apreciarse se encuentra la formación de masas miceliales blanquecinos y grisáceos de aspecto algodonoso, sin presencia de esclerocios. Este último demostraría que al ser incubados, las condiciones de humedad eran bajas o que por el contrario la temperatura llegó a ser elevada puesto que los valores óptimos se encuentran en el rango de 11-15 según el estudio realizado por **Ángel - Bayer (2012)** lo que haría que los esclerocios no se evidencien o en su defecto aún no se establezcan ya que su proceso de formación se ralentizó por las condiciones a las que fue expuesta. Aunque por otro lado la textura esponjosa de algodón muestra que el crecimiento se dio correctamente y la esporulación fue favorecedora para un crecimiento micelial amplio a temperaturas de 25 a 28 °C y porcentaje de humedad de 98% (**Isaza et al., 2019**).

3.1.5. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del microencapsulado de polifenoles del residuo de caña de azúcar frente a *B. cinerea*

Se estableció las condiciones a evaluar para la elección del mejor tratamiento que permitiese determinar el porcentaje de microencapsulado rico en polifenoles cuyos niveles de inhibición sean elevados reduciendo así el crecimiento micelial del hongo. Es así como a continuación en la **Tabla 11**, se aprecia los datos obtenidos tras la evaluación del accionar de la concentración de soluciones de microencapsulado al 10%, 30% y 50% con respecto a la concentración total de polifenoles del microencapsulado de 63,73 % durante un periodo de incubación de 8 días, donde se tomó la medida del diámetro micelial.

Tabla 11.

Datos obtenidos de la evaluación antifúngica

Tratamiento	Concentración de microencapsulado	Tiempo	Diámetro de crecimiento micelial (cm)	Porcentaje de inhibición (%)	Promedio Porcentaje de inhibición (%)
Control	0	1	0,000	0,000	0,000
		2	0,935		
		3	2,692		
		4	3,461		
		5	4,023		
		6	4,645		
		7	5,367		
		8	5,989		
P1	10	1	0,000	0,000	25,502
		2	0,721	22,852	
		3	1,336	50,359	
		4	2,323	32,881	
		5	2,870	28,668	
		6	3,490	24,858	
		7	4,111	23,402	
		8	4,732	20,994	
P2	30	1	0,000	0,000	31,133
		2	0,595	36,364	
		3	1,276	52,588	
		4	1,811	47,674	
		5	2,625	34,750	
		6	3,296	29,042	
		7	3,967	26,085	
		8	4,638	22,558	
P3	50	1	0,000	0,000	32,636
		2	0,524	43,922	
		3	1,350	49,839	
		4	2,044	40,952	
		5	2,554	36,507	

6	3,150	32,178
7	3,746	30,197
8	4,342	27,495

Nota. Se muestra en la presente tabla los promedios obtenidos de los datos recolectados del crecimiento de diámetro micelial y porcentaje de inhibición del control y tratamientos a los 8 días.

Además, es importante saber el promedio de los porcentajes de inhibición para cada tratamiento, así P1 es igual a 25,50%; P2 con un 31,133% y finalmente P3 valor de 32,63%, así como el del testigo el cual tuvo un 0% ya que tuvo un crecimiento micelial menor al de todos los datos. Como puede observarse en la tabla 10. cuando se realiza el análisis de las medias de los tratamientos frente al porcentaje de inhibición micelial, hay un aumento de 10% a 30% de concentración del microencapsulado, sin embargo, esta no resulta ser representativa cuando pasa de 30% a 50%. Es también importante tener en cuenta que el control positivo con un 5% Mancozeb conocido fungicida de amplio espectro utilizado dentro de plantíos para erradicar hongos como la *B. cinerea*. permitiendo evaluar la eficacia del uso de tratamientos gracias a que no presento crecimiento del hongo alrededor de la placa debido a que posee la capacidad de inhibir la respiración mitocondrial del patógeno en estudio.

A continuación se presenta la tabla ANOVA de los principales efectos que influyen dentro de la evaluación de capacidad antifúngica así como la interacción entre los factores concentración- tiempo, en él se presentó la suma de cuadrados así como los grados de libertad, cuadrado medio, y principalmente la razón F- y el valor -P que permitieron determinar si los factores mostraban significancia dentro del estudio.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Días	4594,22	7	656,317	41,24	0,0000
B:Concentración	226,317	2	113,158	7,11	0,0074
RESIDUOS	222,82	14	15,9157		
TOTAL (CORREGIDO)	5043,35	23			

Figura 12. ANOVA de suma de cuadrados para porcentaje de inhibición

Nota. Obtenido de Statgraphics 19 tras el análisis de datos del porcentaje de inhibición *B. cinerea* en base a los factores días y concentración de microencapsulado.

Se realizó también el análisis de varianza de suma de cuadrados donde se evaluó la influencia de los factores de concentración y tiempo frente al porcentaje de inhibición de la *B. cinerea*, Es así como, a continuación, en la figura 13. se pudo observar que ambos factores poseían valores con significancia de -P representativa, puesto a que el efecto de días poseía un valor de 0, mientras que la concentración un valor de 0,0074 lo que favorecería a la aceptación de la hipótesis alternativa. Es así como la concentración del tratamiento tiene un efecto significativo en el porcentaje de inhibición, con niveles de concentración más altos tendiendo a mostrar mayores porcentajes de inhibición, así es como se puede

entender que a pesar de que los días posean una variabilidad notable a lo largo del tiempo, este también tuvo efecto significativo en el porcentaje de inhibición.

A continuación, se puede observar las figuras 14 y 15, correspondientes al diámetro de crecimiento micelial de hongo, así como el porcentaje de inhibición tomado tras su medición durante 8 días. En la figura 14 puede observarse que el existe crecimiento diario de micelio en todos los medios a diferentes concentraciones, sin embargo, en la barra de color naranja correspondiente a 30% de microencapsulado, la diferencia en el aumento del diámetro entre días es menor a diferencia de las barras azul (10%), gris (30%) y amarillo considerado como control.

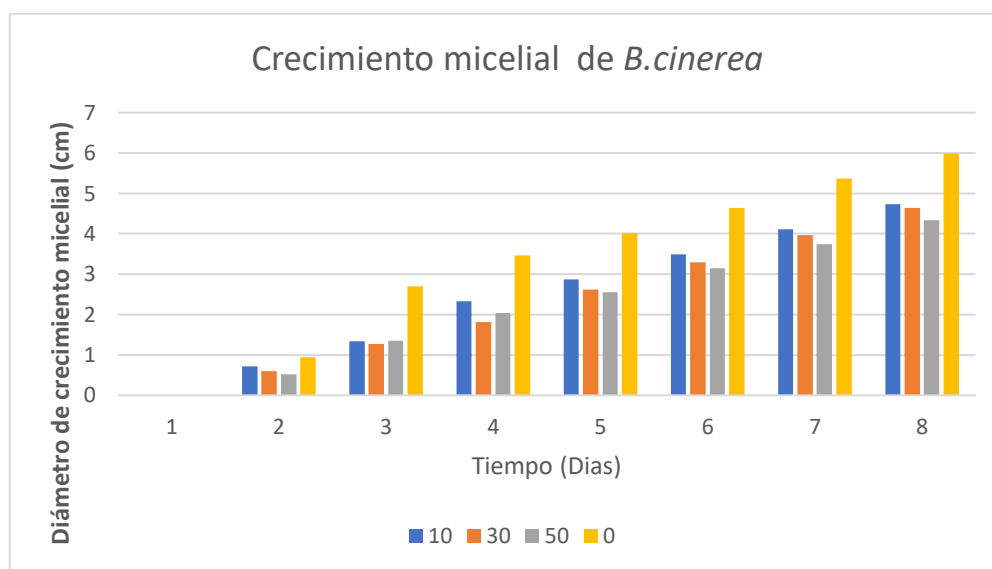


Figura 13. Grafica de barras de crecimiento micelial de *B. cinerea*

Nota. Se presenta el grafico de barras de crecimiento micelial del hongo, diferenciando cada concentración por una barra de diferente color así; azul: 10%, naranja: 30%, gris: 50% y amarillo:0%

A continuación, en la figura 15 puede observarse el porcentaje de inhibición del microencapsulado sobre el hongo, mismo que varía considerablemente durante los 8 días de estudio. Se aprecia que en general la inhibición del 50% es la más alta en la mayor cantidad de días a comparación del resto de concentraciones de microencapsulados. Por otro lado, en el tercer día se puede apreciar que existe el mayor porcentaje de inhibición de las tres concentraciones, siendo la mayor el de 30%.

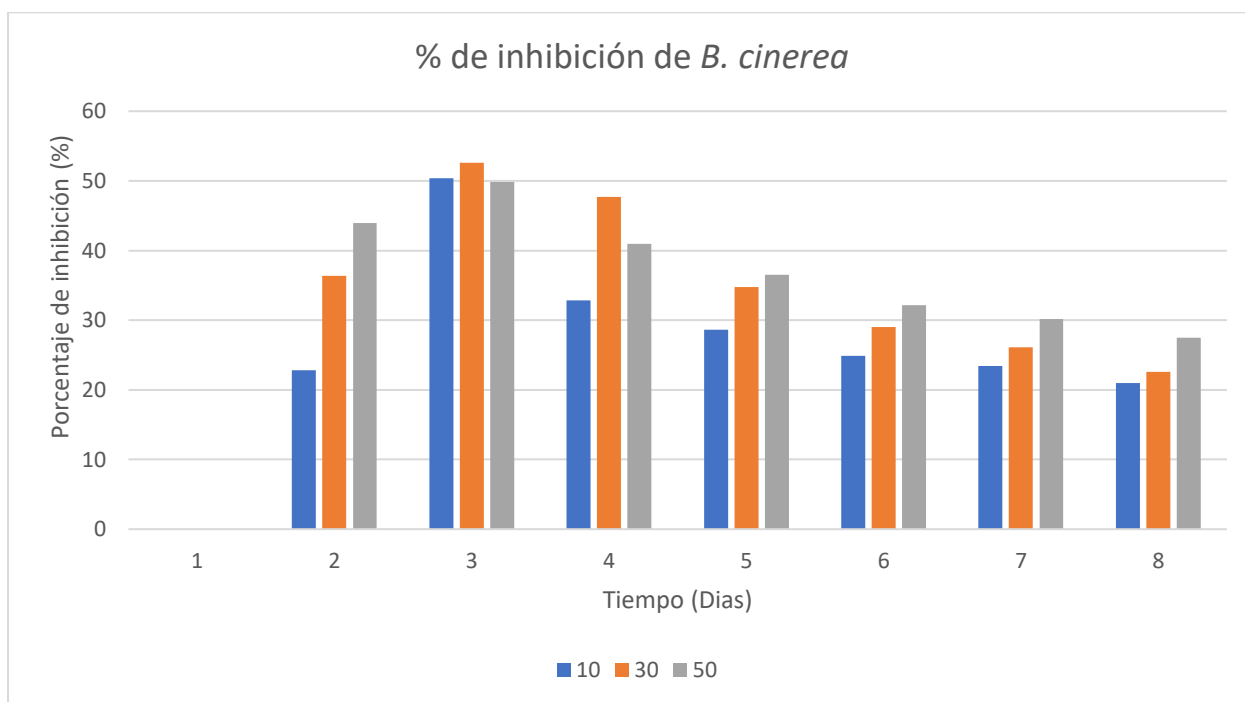


Figura 14. Grafica de barras de porcentaje de inhibición de *B. cinerea*

Nota. Se presenta el grafico de barras de porcentaje de inhibición del hongo, diferenciando cada concentración por una barra de diferente color así; azul: 10%, naranja: 30%, gris: 50% y amarillo:0%

Además, es conveniente mencionar que se pudo observar que el efecto inhibitorio del microencapsulado de polifenoles aumenta junto con la concentración. Este resulta presentar un mayor efecto inhibitorio en el tercer día para las tres concentraciones como se observa en la tabla 10, pudiendo considerarse así el a pesar de que el tratamiento P2 obtiene mejores resultados al tercer día con un total de 52,59% de inhibición aquellos pertenecientes al 50% tienen un promedio de inhibición total mayor que el resto de ensayos realizados. Es importante mencionar que del día 1 al 3 el porcentaje inhibitorio va en aumento, sin embargo, transcurrido este periodo se comienza notar una disminución hasta el día 8, lo que sugiere que el microorganismo pudo generar resistencia al microencapsulado o en su defecto este empezó a degradarse por efectos ambientales perdiendo su capacidad antimicrobiana, tal como lo sucedido en el estudio realizado por (Bustamantes, 2018).

También es importante mencionar que el hongo se visibiliza por primera vez pasadas las 48 horas con el aparecimiento del disco en color verde oscuro, mismo que con el transcurso de los días crea un micelio de apariencia blanquecino aterciopelado mismo que a partir del tercer demostró el aparecimiento de hifas que aún no se encontraban en su etapa reproductiva. Pasado los cinco días se comienza a presentar la formación de “manchas” con un tono verde-grisáceo que representó la maduración del hongo debido a que comienza su fase reproductivo mediante esporulación y

presentación de esclerocios, sin embargo estos se evidenciaron principalmente terminados las mediciones en las placas cuyas concentraciones eran de 10%, y 30% de microencapsulado, mientras que en la de 50% solo se apreció el micelio blanquecino asumiéndose que el microencapsulado ralentizó el crecimiento y propagación del hongo por lo que se le consideraría un cultivo más joven frente a los otros (Vidal, 2018).

3.2. Verificación de hipótesis

$H_0 \neq 0$ Se rechaza la hipótesis nula.

$H_a = 0$ Se acepta la hipótesis alternativa, la cual expresa que el microencapsulado rico en polifenoles de *Saccharum officinarum* L tiene actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Se evaluó el efecto antifúngico del microencapsulado de polifenoles del residuo de caña de azúcar frente a *B. cinerea*, ya que inhibió y disminuyó el crecimiento micelial del hongo en un periodo de 8 días al ser expuesto a diferentes concentraciones.
- Se obtuvo un concentrado rico en polifenoles a partir de residuos del bagazo de la caña de azúcar mediante el proceso de extracción con etanol a diferentes concentraciones, del cual se alcanzó la mayor concentración de polifenoles con 50% de concentración de la solución hidroalcohólica, en un tiempo de 30 minutos para un valor de polifenoles totales de 44,27mg GA/100 g expresado en base seca.
- Se obtuvo un microencapsulado rico en polifenoles del extracto de residuo de la caña de azúcar, con un rendimiento del 74% del proceso de secado por aspersión, por otro lado se calculó su eficiencia de microencapsulación cuantitativa con un valor de 82,92%, y su eficiencia de microencapsulación cualitativa se demostró mediante el FTIR que indicó, los picos de un extracto enmascarado por la matriz polimérica, además esta técnica permitió también identificar que en el microencapsulado la presencia de grupos funcionales correspondientes a flavonoides y taninos como los principales componentes.
- Las pruebas *in vitro* realizadas a diferentes concentraciones de microencapsulado de polifenoles del extracto obtenido frente a *B. cinérea* permitieron determinar que este poseía actividad antifúngica, en donde la mayor inhibición en un periodo de 8 días se presentó en la concentración de 30% al tercer día con un total de 52%, además de demostrar que todos los tratamientos, P1, P2 y P3 presentan actividad antifúngica independiente a la concentración del microencapsulado, siendo el P3 correspondiente al de 50% el de mejor concentración y mayor porcentaje de inhibición en promedio total a comparación del resto.

4.2. Recomendaciones

- Realizar la evaluación morfológica del microencapsulado por microscopía electrónica de barrido (SEM) con la finalidad de conocer la calidad de la superficie de las partículas obtenidas sean las adecuadas, así como su forma.
- Probar otros métodos de extracción de polifenoles, encapsulación y microorganismos con la finalidad de determinar si estos factores influyen en la obtención de una mayor efectividad en la evaluación de la capacidad antifúngica de los residuos de la caña de azúcar.
- Realizar pruebas *in vivo* a futuro, que permitan evaluar el accionar del microencapsulado en los cultivos y así comprobar que lo realizado dentro del laboratorio es aplicable y efectivo en campo.

BIBLIOGRAFIA

- Angel, M. L., & Bayer. (2012). *Botrytis Cinerea* pers. Bases epidemiológicas y control. *Metroflor*, 1(3). <https://lc.cx/0EaeXD>
- Alfaro Bejarano, A. (2022). Encapsulación de aceites grasos poliinsaturados empleando la esporopolenina como potencial agente encapsulante. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/112951>
- Altintas, Z., Tolun, A., & Artik, N. (2016). Supporting Research Findings for Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization.
- Avila, M., Patiño, O., Prieto, J., Delgado, W., & Cuca, L. E. (2011). FLAVONOIDES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA AISLADOS DE *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Revista Colombiana de Química*, 40(1), Article 1.
- Barragán Condori, M., Aro Aro, J. M., Huamaní Meléndez, V. J., & Cartagena Cutipa, R. (2018). Antocianinas, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del mio—Mio (*Coriaria ruscifolia* L.). *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 20(4), 419-428. <https://doi.org/10.18271/ria.2018.419>
- Belesansky, C., Rafart, E. A., & Sandoval, M. C. (Eds.). (2019). Epidemiología y manejo de *Botrytis cinerea* Pers. Fr. en frutilla (*Fragaria x ananassa* (Weston) Duchesne) (Vol. 6, Número 3). *Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria*. <https://revistafcaunlz.gramaweb.com.ar/wpcontent/uploads/2019/09/belesansky-et-al.pdf>.
- Berna, F. (2017). Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). En A. S. Gilbert (Ed.), *Encyclopedia of Geoarchaeology* (pp. 285-286). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4409-0_15
- Boddy, L. (2016). Pathogens of Autotrophs. En *The Fungi* (pp. 245–292). Elsevier.
- Bustamantes, S. (2018). “Evaluación del potencial antifúngico de los extractos etanólicos de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* frente al hongo *Botrytis cinerea*” [Universidad Nacional Mayor de San Marcos Universidad del Perú. Decana de América]. <https://core.ac.uk/download/pdf/323347279.pdf>
- Cadena Terán, D. C. (2020). Evaluación del método de conservación de atmósferas controladas sobre el contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante de la uvilla *Physalis Peruviana* L. con cáliz durante su almacenamiento [bachelorThesis]. <http://repositorio.utn.edu.ec/handle/123456789/10541>
- Carrillo Freire, D. (2015). Encapsulación de polifenoles para su aplicación como fungicidas. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/14347>

- Chaves Solera, M. (2004). La caña de azúcar como materia prima para la producción de alcohol carburante / (1. edición). Liga Agrícola Industrial de la Caña de Azúcar .
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020a). The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*— Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens*, 9(11), 923. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>
- Coordinación General de Información Nacional Agropecuaria. (2021), Boletín Situacional Caña de Azúcar. (2021). Recuperado 26 de octubre de 2023, de <https://online.fliphtml5.com/ijia/banu/>
- Cory, H., Passarelli, S., Szeto, J., Tamez, M., & Mattei, J. (2018). The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition*, 5, 87. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>
- Dai, F., Zhuang, Q., Huang, G., Deng, H., & Zhang, X. (2023). Infrared Spectrum Characteristics and Quantification of OH Groups in Coal. *ACS Omega*, 8(19), 17064-17076. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c01336>
- Dinesh Babu, K. S., Janakiraman, V., Palaniswamy, H., Kasirajan, L., Gomathi, R., & Ramkumar, T. R. (2022). A short review on sugarcane: Its domestication, molecular manipulations and future perspectives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 69(8), 2623-2643. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01430-6>
- El Proceso de Secado Por Pulverización | PDF | Evaporación | Gases. (s. f.). Scribd. Recuperado 11 de enero de 2024, de <https://es.scribd.com/document/335987042/El-Proceso-de-Secado-Par-Pulverizacion>
- Esquivel, B., Ochoa, L., Rutiaga, O., 2015. “Microencapsulación Mediante Secado Por Aspersión de Compuestos Bioactivos.” *Rev. Iber. Tecnología Postcosecha* 16(2):180–92.
- Estevinho, B. N., Carlan, I., Blaga, A., & Rocha, F. (2016). Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. *Powder Technology*, 289, 71-78. <https://doi.org/10.1016/J.POWTEC.2015.11.019>
- FAO. (2019). El estado mundial de la agricultura y la alimentación 2019: Progresos en la lucha contra la pérdida y el desperdicio de alimentos. FAO. <https://doi.org/10.4060/CA6030ES>
- Forteza Monzón, A. (2015). Obtención de resinas fenólicas a partir de bagazo de caña de azúcar pretratado por explosión con vapor. <http://rein.umcc.cu/handle/123456789/1171>
- Galanakis, C. M. (2018). Polyphenols: Properties, Recovery, and Applications. Woodhead Publishing.
- Garcés, E. C. S., Ortiz, M. L. S., Duchicela, R. H. P., Borja, W. X. C., & Mendoza, C. A. Z. (2023). Efecto de solvente y temperatura para la extracción de compuestos fenólicos en hojas de fresa. *Ciencia Latina*, 7(3), 2563-2575. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v7i3.6365
- Ghani, U. (2020). Chapter three—Polyphenols. En U. Ghani (Ed.), *Alpha-Glucosidase Inhibitors* (pp. 61-100). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102779-0.00003-4>

- Girardi, I., Padilha, R., & Sant Anna, V. (2019). SUGARCANE BAGASSE: ANALYSIS OF POLYPHENOLS, COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES. *Tecno-Lógica*, 23, 59-62. <https://doi.org/10.17058/tecnolog.v23i1.12376>
- Gomis Valero, M. del P. (2022). Desarrollo y validación de medios de cultivo alternativos de alto valor añadido para su uso en sistemas hortícolas y forestales en el estado mediterráneo. <http://dspace.umh.es/handle/11000/29305>
- Guntero, V. A., Longo, M. B., Ciparicci, S., Martini, R. E., & Andreatta, A. E. (2015). Comparación de métodos de extracción de polifenoles a partir de residuos de la industria vitivinícola. *CAIQ2015*. <https://ria.utn.edu.ar/xmlui/handle/20.500.12272/2976>
- Gustavsson, J., & Cederberg, C. (Eds.). (2012). Pérdidas y desperdicio de alimentos en el mundo. FAO.
- Guzmán, L. (2021). Formulación de snack saludable en forma de barrita integral a base de remolacha. <https://repositorio.umaza.edu.ar/handle/00261/2724>
- Hernández, O. D. L., Del Pilar Silva Ordoñez, M., & Navarro, Y. H. (2022). RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES a PARTIR DE RESIDUOS DEL PROCESO DE FABRICACIÓN DE PULPA DE MORTIÑO. *Talentos*, 9(2), 65-76. <https://doi.org/10.33789/talentos.9.2.170>
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018b). Pathogenic mechanisms and control strategies of Botrytis cinerea causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Isaza, L., Zuluaga, Y. P., & Marulanda, M. L. (2019b). Morphological, pathogenic and genetic diversity of Botrytis cinerea Pers. in blackberry cultivations in Colombia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41, e. <https://doi.org/10.1590/0100-29452019490>
- Kang, Yu-Ra, Yun-Kyung Lee, Young Jun Kim, and Yoon Hyuk Chang. 2019. "Characterization and Storage Stability of Chlorophylls Microencapsulated in Different Combination of Gum Arabic and Maltodextrin." *Food Chemistry* 272:337–46. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.08.063.
- Khanzada, B., Akhtar, N., Okla, M. K., Alamri, S. A., Al-Hashimi, A., Baig, M. W., Rubnawaz, S., AbdElgawad, H., Hirad, A. H., Haq, I.-U., & Mirza, B. (2021). Profiling of Antifungal Activities and In Silico Studies of Natural Polyphenols from Some Plants. *Molecules*, 26(23), 7164. <https://doi.org/10.3390/molecules26237164>
- Lagos-Burbano, E., & Castro-Rincón, E. (2019). Sugar cane and by-products of the sugar agro-industry in ruminant feeding: A review. *Agronomía Mesoamericana*, 30(3), 917-934. <https://doi.org/10.15517/am.v30i3.34668>
- Lecour, S., & Lamont, K. T. (2011). Natural polyphenols and cardioprotection. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(14), 1191-1199. <https://doi.org/10.2174/13895575111091191>
- Loayza Gutiérrez, L. T. (2021). Estrategia nutricional a base de fucoidano de algas para el control del estrés oxidativo en diabetes mellitus experimental: Lima, Perú 2018. Universidad Nacional Federico Villarreal. <https://repositorio.unfv.edu.pe/handle/20.500.13084/5809>

- Lopez, B., Carvajal, L., & Millán, L. (2004). ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE LA MEZCLA DE PULPA DE BANANO (*Musa paradisiaca* L.) PARA SOMETER A SECADO POR ASPERSIÓN. *Vitae*, 6(3). ISSN 0121-4004
- Lucas Bautista, J. A. (2018). Actividad antimicrobiana in vitro de antocianinas de fresa contra bacterias fitopatógenas. <http://tesis.ipn.mx/xmlui/handle/123456789/25104>
- Luna, J., Barreto, Juan., B, Marín, Zaira. (2017). ADESARROLLO DE UN MODELO MATEMÁTICO QUE PERMITA PREDECIR EL CAMBIO DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES EN UNA MATRIZ ALIMENTARIA SOMETIDA A TRATAMIENTOS TÉRMICOS CON DIFERENTES CONDICIONES. *Alimentos Hoy*, 24(39), 117.
- Maqsoudlou, A., Mahoonak, A., Mohebodini, H., & Koushki, V. (2020). Stability and structural properties of bee pollen protein hydrolysate microencapsulated using maltodextrin and whey protein concentrate. *Heliyon*, 6, e03731. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03731>
- Marasca, I., Silva, R. B. D., Sartori, M. M. P., Gonçalves, A. P., & Pereira Lanças, K. (2015). Morfología de la caña de azúcar en la preparación profunda del suelo en canteros. *Idesia (Arica)*, 33(4), 23-29. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292015000400004>
- Mercado, P. R. A. (s. f.). Ficha Técnica del Cultivo de la Caña de Azúcar (*Saccharum officinarum* L.).
- Montgomery, D. C. (2017). *Design and Analysis of Experiments* (9th ed.). John Wiley & Sons.
- Moreno, J., Pozo, C., & Nájena, F. (2023). APROVECHAMIENTO DEL BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR EN LA FABRICACIÓN DE BLOQUES ECOLÓGICOS PARA MAMPOSTERÍA LIVIANA. *Perfiles Epoch*, 8(3), 20. <https://perfiles.epoch.edu.ec/public/arhtml/Perfiles08/Perfiles08Art3/>
- Pozo García, C. P. (2012). Aprovechamiento del Bagazo de Caña de Azúcar en la Fabricación de Bloques Ecológicos para Mampostería Liviana. [bachelorThesis, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. <http://dspace.epoch.edu.ec/handle/123456789/1631>
- Putra, L. S., Sukweenadhi, J., Nathania, C., Wibowo, E. S., Buschle-Diller, G., & Marianti Purwanto, M. G. (2022). Comparative study of polyphenolic compound extraction from empty palm fruit bunches and sugarcane pulp. *Heliyon*, 8(2), e08951. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e08951>
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
- R, J. C. L., B, J. A. B., & A, Z. T. M. (2017). DESARROLLO DE UN MODELO MATEMÁTICO QUE PERMITA PREDECIR EL CAMBIO DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES EN UNA MATRIZ ALIMENTARIA SOMETIDA A TRATAMIENTOS TÉRMICOS CON DIFERENTES CONDICIONES. *Alimentos Hoy*, 24(39), 117.

- Ríos-Aguirre, S., & Gil-Garzón, M. A. (2021). Microencapsulación por secado por aspersión de compuestos bioactivos en diversas matrices: Una revisión. *TecnoLógicas*, 24(51), Article 51. <https://doi.org/10.22430/22565337.1836>
- Rivera, N. A. (2010). La Caña De Azúcar Y Sus Derivados En La Huasteca San Luis Potosí México. *Diálogos Revista Electrónica de Historia*, 11(1), 81-110.
- Roca-Couso, R., Flores-Félix, J. D., & Rivas, R. (2021b). Mechanisms of Action of Microbial Biocontrol Agents against *Botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*, 7(12), 1045. <https://doi.org/10.3390/jof7121045>
- Rodríguez Blanco, J. (2013). Encapsulación de Resveratrol para su aplicación como fungicida. <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/3906>
- Saavedra Nizama, F., Ale Borja, N., Gordillo Rocha, G., Apesteguía Infante, A., Jurado Teixeira, B., & Revilla Casalino, A. (2010). Análisis por espectroscopía UV y FTIR de macerados acuosos y alcohólicos de Aloe vera L. y Aloe barbadensis Miller. Interacción con sales inorgánicas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 76(3), 242-260.
- Sánchez-Molina, D., Vargas-Porras, M., Ortega-Toro, R., Piñeros-Castro, Y., Sánchez-Molina, D., Vargas-Porras, M., Ortega-Toro, R., & Piñeros-Castro, Y. (2018). Extracción y encapsulación de compuestos fenólicos provenientes de cascarilla de arroz. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 47(3), 410-423. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v47n3.77373>
- Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2021). Advances in Understanding Fungicide Resistance in *Botrytis cinerea* in China. *Phytopathology®*, 111(3), 455-463. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-20-0313-IA>
- Tolun, A., Altintas, Z., & Artik, N. (2016). Microencapsulation of grape polyphenols using maltodextrin and gum arabic as two alternative coating materials: Development and characterization. *Journal of Biotechnology*, 239, 23-33. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.10.001>
- Triana-Hernández, O., León-Martínez, T. S., Céspedes-Vázquez, M. I., & Cámara-Pérez, A. (2014). Caracterización de los residuos de la cosecha de la caña de azúcar almacenados a granel. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 48(1), 65-70.
- Velázquez-Martínez, V., Valles-Rosales, D., Rodríguez-Urbe, L., Laguna-Camacho, J. R., López-Calderón, H. D., & Delgado, E. (2022). Effect of different extraction methods and geographical origins on the total phenolic yield, composition, and antimicrobial activity of sugarcane bagasse extracts. *Frontiers in nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.834557>
- Vidal, Araceli; Cotoras, Milena; Mendoza Leonora. (2018). Actividad antifúngica contra botrytis cinerea de hongo endófito aislado desde planta endémica de Chile.
- Villacís, C. (2016). “UTILIZACIÓN DEL BAGAZO DE LA CAÑA DE AZÚCAR PARA LA FABRICACIÓN DE COMPLEMENTOS DECORATIVOS PARA EL HOGAR”. Universidad Católica del Ecuador.

- Vio-Michaelis, S., Apablaza-Hidalgo, G., Gómez, M., Peña-Vera, R., & Montenegro, G. (2012). Antifungal activity of three Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. *Botanical Sciences*, 90(2), 179-183.
- Wani, A. K., Rahayu, F., Fauziah, L., & Suhara, C. (2023). Advances in safe processing of sugarcane and bagasse for the generation of biofuels and bioactive compounds. *Journal of Agriculture and Food Research*, 12, 100549. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100549>
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. a. L. (2007b). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Wongsa, P., Phatikulrungsun, P., & Prathumthong, S. (2022). FT-IR characteristics, phenolic profiles and inhibitory potential against digestive enzymes of 25 herbal infusions. *Scientific Reports*, 12(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10669-z>
- Xu, Q., Ji, T., Gao, S.-J., Yang, Z., & Wu, N. (2018). Characteristics and Applications of Sugar Cane Bagasse Ash Waste in Cementitious Materials. *Materials*, 12(1), 39. <https://doi.org/10.3390/ma12010039>
- Yan, H., Meng, X., Lin, X., Duan, N., Wang, Z., & Wu, S. (2023). Antifungal activity and inhibitory mechanisms of ferulic acid against the growth of *Fusarium graminearum*. *Food Bioscience*, 52, 102414. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102414>
- Zhao Zhengang, Zheng Rui, Liu Ruihai, & Fu Xiong. (2020). Sugarcane polyphenol extract and preparation method and application thereof (Patent Núm. CN:105816702:B). En Patent (CN:105816702:B).

ANEXOS

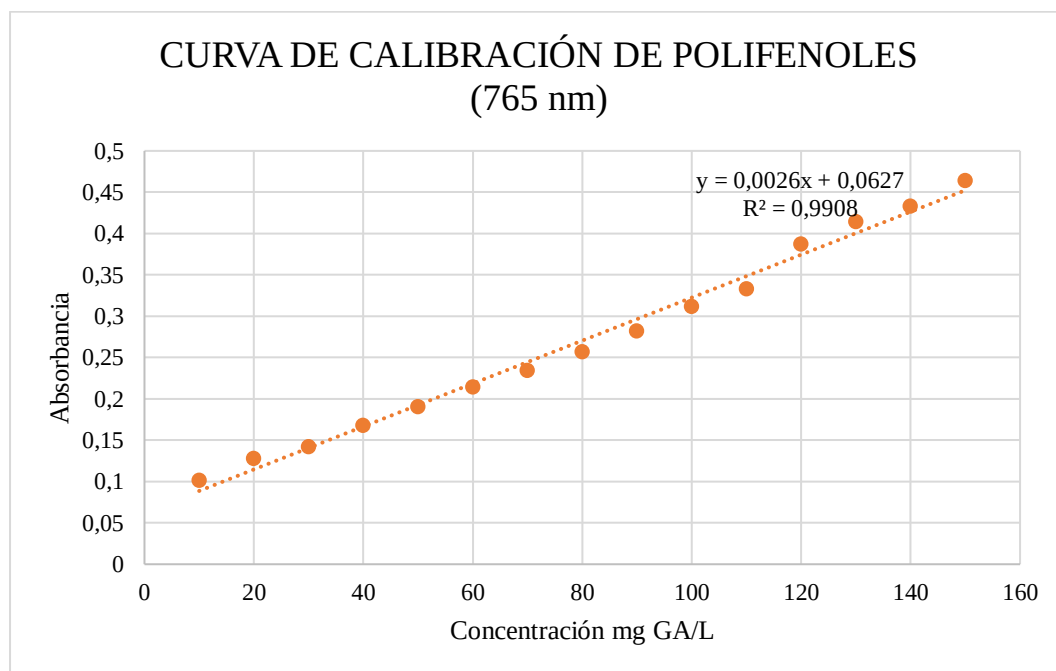
Anexo 1.

Análisis de Varianza para polifenoles

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A: concentración	1,20607	1	1,20607	1,17	0,2894
B: tiempo	1,50905	1	1,50905	1,46	0,2372
AA	10,5868	1	10,5868	10,25	0,0035
AB	0,00439696	1	0,00439696	0,00	0,9485
BB	0,459979	1	0,459979	0,45	0,5102
bloques	5,06813	3	1,68938	1,64	0,2044
Error total	27,8854	27	1,03279		
Total (corr.)	97,5471	35			

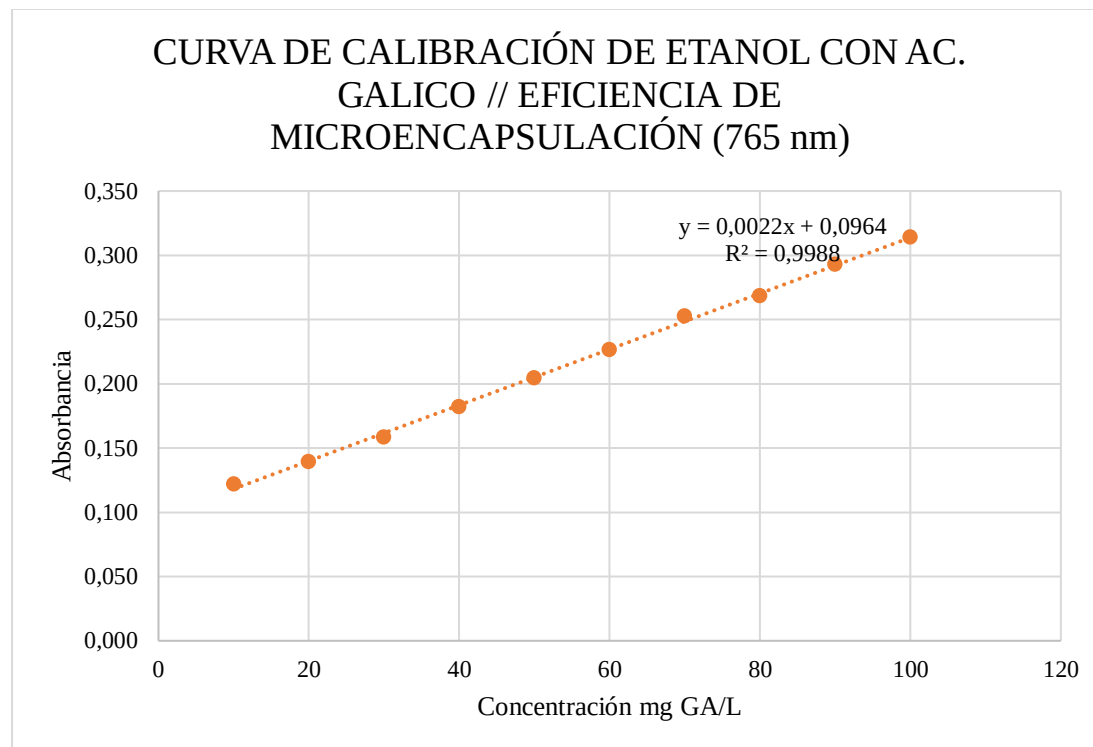
Anexo 2.

Curva de calibración de polifenoles



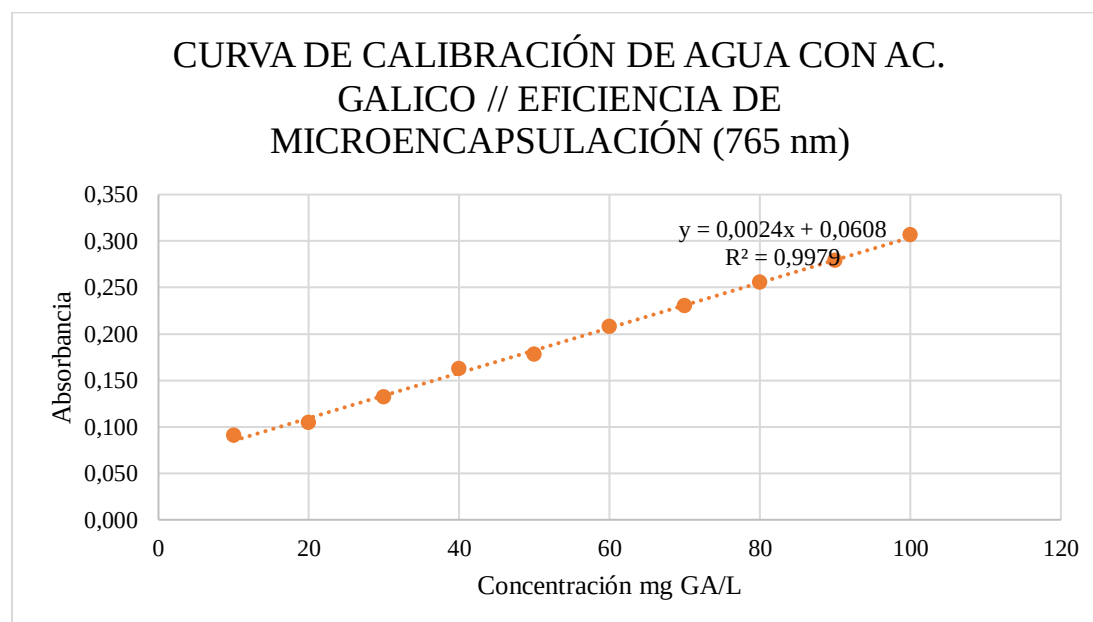
Anexo 3.

Curva de calibración de etanol



Anexo 4.

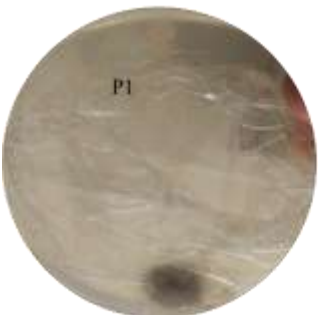
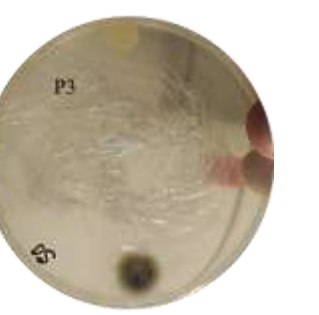
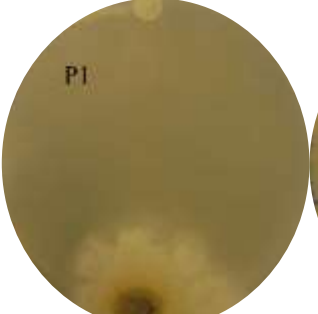
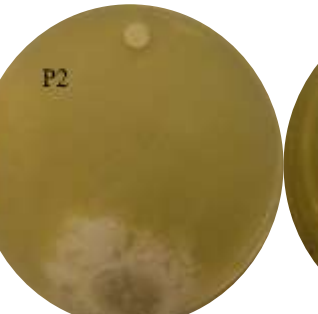
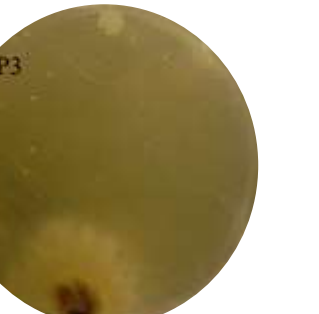
Curva de calibración de agua



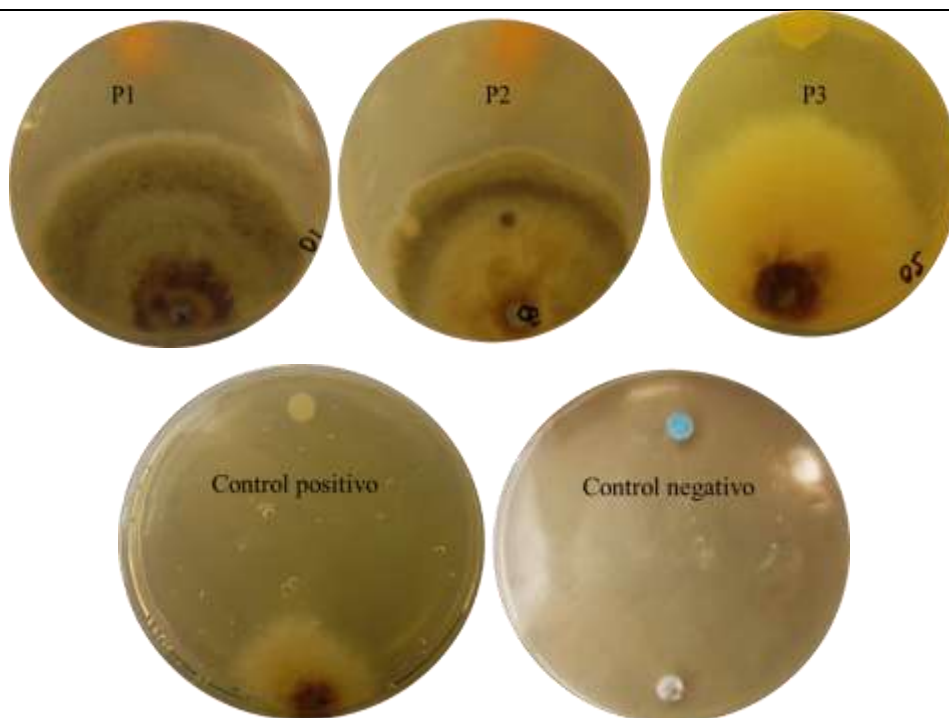
Anexo 5.*ANOVA multifactorial de evaluación antifúngica*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración	678,905	2	339,452	21,90	0,0000
B: Días	13782,6	7	1968,94	127,02	0,0000
INTERACCIONES					
AB	668,452	14	47,7466	3,08	0,0019
RESIDUOS	744,076	48	15,5016		
TOTAL (CORREGIDO)	15874,0	71			

Anexo 6.*Crecimiento micelial de B. cinerea*

Día	Crecimiento micelial		
2			
3			

8



Anexo 7

Imágenes del proceso experimental del proyecto

