

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Evaluación del potencial antifúngico de nanopartículas de cobre
biosintetizadas por *Trichoderma* contra *Moniliophthora roreri*

Proyecto de Titulación

Previo la obtención del Título de:

Magíster en Sanidad Vegetal

Presentado por:

Hamilton Octavio Intriago Reyna

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

A Dios, por brindarme la fortaleza necesaria para perseverar en este camino académico.

A mis hijos, quienes con su paciencia y comprensión han sabido sobrellevar mis ausencias durante este proceso formativo.

A mi madre, pilar fundamental en mi vida, cuyo impulso constante y fe inquebrantable han sido el soporte que me ha permitido alcanzar mis metas académicas.

A la Escuela Superior Politécnica del Litoral, por abrirme sus puertas y permitirme formar parte de su distinguida comunidad estudiantil.

A la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, alma máter que ha forjado mi carácter profesional y me ha brindado las herramientas para mi desarrollo en el campo laboral.

Al Dr. Pablo Álvarez, por su invaluable confianza, guía y respaldo incondicional durante el planteamiento y ejecución de este proyecto.

Declaración Expresa

Yo Hamilton Octavio Intriago Reyna acuerdo y reconozco que: La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 14 de agosto del 2025.

Autor: Ing. Hamilton Octavio Intriago Reyna

Evaluadores

Ing. Adriana Patricia Santos Ordoñez, Ph.D.
Profesor de Materia

Ing. Pablo Israel Álvarez Romero, Ph.D.
Tutor de Proyecto

Resumen

El sector cacaotero ecuatoriano enfrenta una crisis fitosanitaria severa debido a la moniliasis, enfermedad que destruye entre 50-80% de las cosechas anuales y compromete la seguridad alimentaria de más de 100 000 familias. Los métodos convencionales de control presentan limitaciones económicas y ambientales que demandan soluciones innovadoras. Este estudio evaluó el desarrollo de nanopartículas de cobre biosintetizadas por cepas nativas de *Trichoderma* como estrategia de control biotecnológico contra *Moniliophthora roreri*, estableciendo metodologías para su caracterización y evaluación antifúngica. Se implementaron técnicas de aislamiento microbiano, biosíntesis de nanopartículas de cobre mediante filtrados extracelulares con sulfato de cobre (5 mM), caracterización espectroscópica UV-visible y ensayos de inhibición en medio sólido con diseño experimental riguroso. Los análisis confirmaron la identidad fenotípica de los microorganismos aislados y la formación exitosa de nanopartículas evidenciada por picos de absorción a 590 nm. Los porcentajes de inhibición del crecimiento patogénico fueron 10,28% y 1,67% para las dos cepas evaluadas, inferiores al control químico (21,39%) pero superiores al control negativo. La investigación proporciona un protocolo estandarizado y demuestra la factibilidad de la biosíntesis de nanopartículas antifúngicas, estableciendo fundamentos para el desarrollo de alternativas sostenibles en el manejo integrado de la moniliasis del cacao.

Palabras Clave: Cacao, moniliasis, nanotecnología, fitosanidad.

Abstract

*The Ecuadorian cacao sector is currently facing a severe phytosanitary crisis due to moniliasis, a disease responsible for destroying between 50–80% of annual harvests, thereby threatening the food security of over 100,000 families. Conventional control methods exhibit both economic and environmental limitations, necessitating the exploration of innovative solutions. This study evaluated the development of copper nanoparticles biosynthesized by native *Trichoderma* strains as a biotechnological control strategy against *Moniliophthora roreri*, establishing protocols for their characterization and antifungal assessment. Microbial isolation techniques were implemented, followed by the biosynthesis of copper nanoparticles using extracellular filtrates and copper sulfate (5 mM), UV-visible spectroscopic characterization, and inhibition assays on solid media under a rigorous experimental design. The analyses confirmed the phenotypic identity of the isolated microorganisms and the successful formation of nanoparticles, as evidenced by absorption peaks at 590 nm. Inhibition percentages of pathogenic growth were 10.28% and 1.67% for the two strains evaluated-lower than the chemical control (21.39%) but superior to the negative control. The research provides a standardized protocol and demonstrates the feasibility of biosynthesizing antifungal nanoparticles, thus laying the groundwork for the development of sustainable alternatives for the integrated management of cacao moniliasis.*

Keywords: *Cacao, moniliasis, nanotechnology, plant health.*

Índice General

Resumen	i
<i>Abstract</i>	ii
Índice General	iii
Abreviaturas	vii
Simbología	viii
Índice de Figuras	ix
Índice de Tablas	x
Capítulo 1	1
Introducción	2
Descripción del Problema	3
Justificación del Problema.....	4
Objetivos	4
<i>Objetivo General</i>	4
<i>Objetivos Específicos</i>	4
Marco Teórico	5
<i>Cacao (Theobroma cacao L.)</i>	5
<i>Principales Enfermedades</i>	5
<i>Moniliophthora roreri</i>	6
<i>Biología y Ciclo de Vida</i>	6
<i>Sintomatología</i>	7
<i>Métodos de Control</i>	8
<i>Trichoderma spp.</i>	8
Características Generales.....	8
Mecanismos de Biocontrol.....	9
<i>Nanopartículas</i>	9

Nanopartículas de Cobre.	9
Métodos de Síntesis.	9
Biosíntesis de Nanopartículas Mediante Microorganismos.	10
Proceso y Mecanismos de Biosíntesis.	10
Mecanismos de Biosíntesis Mediante <i>Trichoderma</i>	10
Factores que Influyen en la Biosíntesis.	11
Caracterización y Propiedades.	12
Resonancia de Plasmón Superficial.	12
Mecanismos de Acción Contra Fitopatógenos.	13
Aplicaciones en Control de Enfermedades.	13
Capítulo 2	15
Metodología.....	16
Materiales y Reactivos	16
<i>Reactivos</i>	16
<i>Medios de Cultivo</i>	17
<i>Equipos y Materiales</i>	17
Aislamiento y Caracterización de Microorganismos.....	17
<i>Aislamiento y Caracterización de Cepas de Trichoderma</i>	17
<i>Aislamiento y Caracterización de Cepa de Moniliophthora roreri</i>	19
Biosíntesis de Nanopartículas de Cobre	20
<i>Preparación del Material Biológico</i>	20
<i>Obtención de Filtrados Extracelulares</i>	20
<i>Proceso de Síntesis de Nanopartículas</i>	21
<i>Purificación y Almacenamiento</i>	21
<i>Caracterización de Nanopartículas</i>	22
Espectroscopía UV-visible.	22
Evaluación del Potencial Antifúngico <i>in vitro</i>	22

<i>Inhibición del Crecimiento Micelial</i>	22
Análisis Estadístico	23
Consideraciones Éticas y Legales	24
Capítulo 3	25
Resultados y Análisis	26
Aislamiento y Caracterización de Microorganismos.....	26
<i>Aislamiento de Cepas de Trichoderma spp.</i>	26
<i>Caracterización Fenotípica de Trichoderma spp.</i>	26
Características Culturales.	26
Características Microscópicas.....	28
Tasa de Crecimiento Micelial.....	29
<i>Aislamiento de Moniliophthora roreri</i>	29
<i>Caracterización Fenotípica de Moniliophthora roreri</i>	29
Características Culturales.	29
Características Microscópicas.....	30
Tasa de Crecimiento Micelial.....	31
Biosíntesis y Caracterización de Nanopartículas de Cobre	31
<i>Biosíntesis de Nanopartículas Mediante Trichoderma</i>	31
<i>Caracterización de Nanopartículas Mediante Espectroscopía UV-visible</i>	34
Evaluación de la Actividad Antifúngica <i>in vitro</i>	36
<i>Análisis de la Tasa de Crecimiento Micelial</i>	36
<i>Análisis del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial</i>	38
<i>Factores Metodológicos que Influyen en la Actividad Antifúngica</i>	41
Protocolo Estandarizado para la Biosíntesis y Evaluación Antifúngica de Nanopartículas de Cobre	42
Capítulo 4	48
Conclusiones y Recomendaciones	49

<i>Conclusiones</i>	49
<i>Recomendaciones</i>	50
Referencias	51

Abreviaturas

AA	Agar Agua
ANOVA	Análisis de Varianza
BCAs	<i>Biological Control Agents</i> (Agentes de Control Biológico)
CuNPs	Nanopartículas de Cobre
CuO	Óxido de Cobre
CuONPs	Nanopartículas de Óxido de Cobre
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
CV	Coeficiente de Variación
DCA	Diseño Completamente al Azar
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> (Dispersión Dinámica de Luz)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDAX	<i>Energy Dispersive X-ray Analysis</i> (Análisis de Energía Dispersiva de Rayos X)
HSD	<i>Honestly Significant Difference</i>
MIPE	Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)
NIR	<i>Near Infrared</i> (Infrarrojo Cercano)
NPs	Nanopartículas
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i> (Agar Papa Dextrosa)
PDB	<i>Potato Dextrose Broth</i> (Caldo Papa Dextrosa)
PIC	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies Reactivas de Oxígeno)
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (Microscopía Electrónica de Barrido)
TCM	Tasa de Crecimiento Micelial
TEM	<i>Transmission Electron Microscopy</i> (Microscopía Electrónica de Transmisión)
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

Simbología

°C	Grados Celsius
cm	Centímetro
Cu	Cobre
Cu ²⁺	Ion cúprico
Dc	Diámetro de la colonia en el control
Dt	Diámetro de la colonia en el tratamiento
g	Gramo
H ₂ O	Agua
L	Litro
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)
nm	Nanómetro
pH	Potencial de Hidrógeno
PIC	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento
ppm	Partes por millón
R ²	Coeficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
u.a.	Unidades de absorbancia
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
%	Porcentaje
h	horas
FOB	Franco a bordo

Índice de Figuras

Figura 3.1	<i>Características culturales y morfológicas de cepa de Trichoderma spp. (BO-07)</i>	27
Figura 3.2	<i>Características culturales y morfológicas de cepa de Trichoderma spp. (YN-06)</i>	28
Figura 3.3	<i>Tasa de Crecimiento Micelial de Cepas de Trichoderma spp.</i>	29
Figura 3.4	<i>Características morfológicas de Moniliophthora roreri</i>	30
Figura 3.5	<i>Tasa de Crecimiento Micelial de Moniliophthora roreri</i>	31
Figura 3.6	<i>Produccion de esporas y biomasa fúngica de Trichoderma para biosíntesis de nanopartículas de cobre</i>	32
Figura 3.7	<i>Filtrados extracelulares y nanopartículas de cobre biosintetizadas por cepas de Trichoderma</i>	33
Figura 3.8	<i>Análisis espectroscópico UV-VIS de nanopartículas de cobre biosintetizadas</i>	34
Figura 3.9	<i>Tasa de crecimiento micelial de M. roreri bajo diferentes tratamientos</i>	37
Figura 3.10	<i>Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de M. roreri tratamiento</i>	38
Figura 3.11	<i>Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con Trichoderma spp.: preparación del material biológico</i>	43
Figura 3.12	<i>Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con Trichoderma spp.: obtención de filtrados extracelulares</i>	44
Figura 3.13	<i>Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con Trichoderma spp.: síntesis de nanopartículas</i>	45
Figura 3.14	<i>Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con Trichoderma spp.: purificación y almacenamiento</i>	46
Figura 3.15	<i>Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con Trichoderma spp.: verificación preliminar</i>	47

Índice de Tablas

Tabla 3.1	<i>Cepas de Trichoderma obtenidas con sus códigos y localidades de origen.....</i>	26
------------------	--	-----------

Capítulo 1

Introducción

El cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.) constituye un patrimonio histórico y económico fundamental para Ecuador, líder mundial en producción de cacao fino de aroma, con aproximadamente 590 579 hectáreas dedicadas a este cultivo en las regiones Costa y Amazonía, sustentando a más de 100 000 familias productoras (Paredes Andrade et al., 2022). Este sector representa una fuente vital de ingresos para el país y mantiene una tradición agrícola centenaria.

Sin embargo, este sector enfrenta una severa crisis fitosanitaria debido a la Moniliasis, enfermedad devastadora causada por *Moniliophthora roreri*, que afecta exclusivamente a las mazorcas (frutos) de la planta. Los síntomas incluyen manchas oleosas que evolucionan a color chocolate, deformación de frutos, maduración prematura y desarrollo de micelio blanco, culminando en la momificación de las mazorcas y la destrucción de las semillas, ocasionando pérdidas del 50-80% de las cosechas anuales (Phillips-Mora et al., 2007).

Las características biológicas del patógeno complican significativamente su control: presenta un período de incubación prolongado que varía según la edad de la mazorca al momento de la infección (Phillips-Mora et al., 2007), produce billones de esporas con alta resistencia ambiental y tiene gran capacidad de disseminación (Díaz-Valderrama et al., 2022). Las estrategias actuales resultan insuficientes: el manejo cultural requiere dedicación intensiva, mientras que los tratamientos químicos generan preocupaciones sobre residualidad tóxica, daño a organismos benéficos y desarrollo de resistencia (Lahlali et al., 2022).

La moniliasis afecta significativamente el cultivo de cacao en Ecuador, impactando especialmente a los pequeños productores, al incrementar sus costos operativos hasta un 40% y comprometiendo la viabilidad de sus fincas (Paredes Andrade et al., 2022). Por lo tanto, este proyecto investigó soluciones innovadoras que combinan la nanotecnología con nanopartículas de cobre biosintetizadas por *Trichoderma*, buscando desarrollar una alternativa de control contra el patógeno que garantice sostenibilidad ambiental y accesibilidad económica para los productores.

Descripción del Problema

El cultivo de cacao en Ecuador enfrenta una severa crisis fitosanitaria debido a la Moniliasis, causada por *M. rozeri* que devasta entre 50-80% de las cosechas anuales, configurándose como una amenaza sistémica para la sostenibilidad del sector. El patógeno exhibe características biológicas particulares que dificultan su manejo: períodos de incubación variables (30-75 días según la edad de la mazorca), capacidad de producir hasta 44 millones de esporas por cm² en mazorcas infectadas, persistencia de inóculo viable hasta por siete meses, y mecanismos de dispersión tanto activos como pasivos que facilitan su establecimiento en nuevas áreas geográficas.

La problemática se agrava por la limitada eficacia de las estrategias de control disponibles. Los enfoques convencionales presentan restricciones significativas: las prácticas culturales, aunque fundamentales, demandan alta inversión de mano de obra y supervisión constante; los fungicidas sistémicos y de contacto enfrentan cuestionamientos por su impacto en la biodiversidad, acumulación de residuos en productos finales y la emergencia de cepas resistentes. Esta convergencia de factores coloca a los pequeños productores en una posición de vulnerabilidad extrema, donde el incremento desproporcionado de costos de producción y la reducción de rendimientos comprometen la viabilidad de sus sistemas productivos.

Se requieren urgentemente soluciones innovadoras que combinen efectividad contra el patógeno, sostenibilidad ambiental y accesibilidad económica.

Justificación del Problema

Controlar la moniliasis resulta crucial para la viabilidad del sector cacaotero ecuatoriano, considerando que esta fitopatología ocasiona una disminución del rendimiento entre 50-80% anualmente, comprometiendo la posición privilegiada del país en los mercados internacionales de cacao fino de aroma. Los métodos fitosanitarios actuales muestran deficiencias significativas: requieren elevada inversión operativa, causan deterioro ecosistémico y enfrentan la aparición de cepas resistentes.

Ante este escenario, la presente investigación planteó la integración de nanopartículas de cobre biosintetizadas por hongos del género *Trichoderma*, buscando desarrollar una estrategia innovadora, ecológicamente responsable y económicamente viable para las comunidades agrícolas vulnerables.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar el potencial antifúngico *in vitro* de las nanopartículas de cobre biosintetizadas por cepas nativas de *Trichoderma* contra *Moniliophthora roreri* (Cif.) H.C. Evans, agente causal de la Moniliasis del cacao, estableciendo las bases teóricas y metodológicas para investigaciones futuras.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar fenotípicamente cepas nativas de *Trichoderma* spp. y *Moniliophthora roreri* aisladas de muestras de suelo rizosférico y mazorcas infectadas de cacao.
2. Biosintetizar nanopartículas de cobre utilizando filtrados extracelulares de cepas de *Trichoderma* mediante la adaptación de parámetros fisicoquímicos reportados en literatura científica.
3. Caracterizar las nanopartículas de cobre biosintetizadas mediante espectroscopía UV-Visible para confirmar su formación y determinar características espectrales.

4. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de las nanopartículas de cobre biosintetizadas sobre el crecimiento micelial de *Moniliophthora roreri* mediante ensayos de inhibición en medio sólido.

Marco Teórico

Cacao (Theobroma cacao L.)

El cultivo de cacao en Ecuador representa un pilar fundamental en la economía agrícola nacional. Su origen se remonta a la Alta Amazonía, específicamente en el yacimiento Santa Ana-La Florida en Zamora Chinchipe, donde se evidenció su uso desde el 3 300 A.C. (Paredes Andrade et al., 2022).

En el mercado internacional, Ecuador destaca como productor de cacao fino o de aroma, que constituye el 5% de la producción mundial. En términos de superficie, para 2020 el país contaba con 590 579 hectáreas cultivadas, distribuidas principalmente en la Costa (77%) y Amazonía (10%). (Paredes Andrade et al., 2022). Las exportaciones han experimentado un crecimiento sin precedentes: durante enero-abril de 2025, las exportaciones de cacao y elaborados alcanzaron \$1 623,1 millones USD FOB, representando un incremento del 109,8% respecto al mismo período de 2024. Particularmente significativo es el aumento en la participación del cacao dentro de las exportaciones no petroleras, que creció de 10,2% en 2024 a 17,4% en 2025, consolidándose como el segundo producto de exportación más importante después del camarón (Banco Central del Ecuador, 2025).

Principales Enfermedades

De acuerdo con Paredes Andrade et al. (2022), el cultivo de cacao en la Amazonía enfrenta tres enfermedades principales que causan pérdidas significativas en la producción: la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), que puede destruir hasta el 80% de los frutos y se caracteriza por manchas café con pelusa blanca; la mazorca negra (*Phytophthora palmivora*), que ataca principalmente frutos maduros manifestándose con manchas café y micelio blanquecino; y la escoba de bruja (*Moniliophthora perniciosa*), que afecta múltiples partes de la planta causando

crecimientos anormales. Otros estudios reportan a *Phytophthora theobromicola* como una nueva especie causante de la mazorca negra del cacao (Decloquement et al., 2021). La situación es particularmente crítica en la región amazónica, donde las condiciones ambientales y prácticas de manejo inadecuadas, como la falta de podas, generan un ambiente propicio para el desarrollo y propagación de estas enfermedades, resultando en pérdidas productivas mayores que en la región Costa (Díaz-Valderrama et al., 2022; Correa Álvarez et al., 2014).

Moniliophthora roreri

Según Phillips-Mora et al. (2007) *M. roreri* es un hongo altamente especializado que infecta exclusivamente frutos de especies pertenecientes a los géneros *Theobroma* y *Herrania*, siendo una enfermedad endémica reportada por primera vez en Colombia en 1817 y documentada en Ecuador en 1895, aunque el primer brote registrado ocurrió en la década de 1910. Actualmente está presente en nueve países de América Central y del Sur, manteniendo un comportamiento invasivo con detección reciente en Guatemala. Las pérdidas económicas que ocasiona son devastadoras, con estimaciones entre 50% y 80% de la producción anual, pudiendo alcanzar hasta 100% en plantaciones sin manejo adecuado, consolidándose como uno de los principales factores limitantes de la producción cacaotera en América Latina.

Biología y Ciclo de Vida

El ciclo patogénico se inicia con la dispersión de conidios desde mazorcas momificadas hacia frutos sanos, requiriendo una película de agua para su germinación. Según Solis Hidalgo et al. (2021), el desarrollo es relativamente lento, tomando entre 6-10 semanas desde la infección hasta la manifestación de síntomas, que inician con manchas chocolate en la superficie, seguidas por micelio blanco y posteriormente esporas color crema.

Meinhardt et al. (2014) describen el proceso de infección en dos fases principales: la biotrófica, que ocurre durante los primeros 30 días, donde el patógeno crece intercelularmente sin matar las células, utilizando enzimas especializadas para degradar la matriz intercelular y evadiendo las defensas de la planta mediante la secreción de proteínas similares a las PR-1

(pathogenesis-related proteins) que pueden interferir con las respuestas defensivas del hospedero; y la fase necrotrófica, que inicia aproximadamente a los 60 días post-infección, caracterizada por una estrategia más agresiva donde el hongo secreta enzimas ligninolíticas (como aril-alcohol oxidasas y lacasas), hidrolasas de glicósidos, proteasas extracelulares y proteínas inductoras de necrosis que degradan activamente las paredes celulares y causan la muerte del tejido, preparándose para la esporulación.

Sintomatología

La moniliasis causada por *M. roreri* presenta una sintomatología característica que se desarrolla exclusivamente en los frutos del cacao, manifestándose durante cualquier fase del desarrollo vegetativo, siendo los primeros estados los más susceptibles (Phillips-Mora et al., 2007). El proceso infeccioso comienza con el desarrollo intracelular del patógeno e invasión del parénquima cortical, constituyendo el período más largo de incubación de la enfermedad (Jaimes & Aranzazu, 2010). Los síntomas evolucionan desde puntos aceitosos de diámetros pequeños (< 2 mm) que aumentan progresivamente de tamaño durante 10 a 20 días, mientras las mazorcas afectadas adquieren un color "cenizoso" característico y detienen su crecimiento normal.

Después de 2 a 3 meses, los síntomas evolucionan hacia la aparición de protuberancias y manchas aceitosas de color café oscuro sobre las lesiones previas, culminando con el desarrollo de micelio blanco y esporas infectivas que causan la transformación a una pigmentación marrón del fruto (Ram, 1989). Paralelamente, el desarrollo interno se ve comprometido desde las etapas tempranas, causando que las semillas adquieran apariencia acuosa y se adhieran entre sí, desarrollando pudrición completa con consistencia acuosa. La progresión es notablemente rápida bajo condiciones favorables, con capacidad de destruir toda la cosecha en una semana, siendo la severidad directamente relacionada con condiciones de alta humedad relativa susceptibles (Phillips-Mora et al., 2007).

Métodos de Control

Los métodos de control tradicionales, según Solis Hidalgo et al. (2021), enfrentan limitaciones significativas como la presión de la diversidad genética de los patógenos, la necesidad de implementación coordinada entre fincas debido a la dispersión de esporas, y las condiciones ambientales favorables de la región amazónica. Sin embargo, el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) ha demostrado ser una alternativa efectiva, combinando variedades tolerantes, fertilización adecuada, podas sistemáticas, manejo de sombra y control biológico, logrando reducir la incidencia de la enfermedad en un 60% y aumentar el rendimiento hasta en un 300% (Pico et al., 2019).

El control biológico tradicional utiliza microorganismos beneficiosos vivos que actúan mediante sus mecanismos naturales de antagonismo (Lahlali et al., 2022). Paralelamente, la biosíntesis de nanopartículas metálicas representa una estrategia biotecnológica innovadora que aprovecha las capacidades reductoras de hongos como *Trichoderma* para producir agentes antimicrobianos con mecanismos de acción fisicoquímicos. Sanguiñedo et al. (2023) demostraron que las nanopartículas de cobre biosintetizadas por *T. harzianum* ejercen control antifúngico mediante generación de especies reactivas de oxígeno, adhesión electrostática a membranas celulares y liberación controlada de iones metálicos, mecanismos fundamentalmente diferentes a los del biocontrol tradicional. Esta aproximación biotecnológica ofrece ventajas como mayor estabilidad, control preciso del tamaño de partícula y actividad antimicrobiana a concentraciones más bajas que las sales metálicas convencionales.

Trichoderma spp.

Características Generales. El género *Trichoderma*, descubierto por Persoon en 1794, representa la etapa asexual del género *Hypocrea* (Ascomycota). Son hongos saprófitos de vida libre presentes en suelos templados y tropicales (10^1 - 10^3 propágulos·g⁻¹), que se reproducen asexualmente mediante conidios y clamidosporas. Destaca por ser no patógeno, ambientalmente

amigable, de fácil cultivo y capaz de producir diversas proteínas, enzimas y metabolitos secundarios (Tomah et al., 2023).

Mecanismos de Biocontrol. Meyer et al. (2022) describen tres mecanismos principales que actúan sinérgicamente en *Trichoderma*: el micoparasitismo, mediante el cual utiliza enzimas hidrolíticas como quitinasas y glucanasas para degradar la pared celular de fitopatógenos, destacando las especies *T. virens* y *T. atroviride* por su abundancia de enzimas quitinolíticas; la antibiosis, que implica la producción de metabolitos secundarios antifúngicos distribuidos en más de 120 estructuras moleculares, incluyendo peptaiboles y terpenos; y la competencia, donde compete eficazmente por espacio y nutrientes en la rizosfera, demostrando alta versatilidad metabólica y producción de sideróforos.

Nanopartículas

Las nanopartículas (NPs) representan un avance significativo en nanotecnología, particularmente en su síntesis mediante *Trichoderma*. Tomah et al. (2023) reportan que más de 100 estudios han utilizado este género fúngico para sintetizar diversos tipos de nanopartículas, incluyendo plata (54% de los estudios), oro, selenio, óxido de zinc, cobre, titanio y magnesio. Esta metodología destaca por ser un proceso "verde", económico, no tóxico y ambientalmente sostenible.

Nanopartículas de Cobre. Específicamente, las nanopartículas de óxido de cobre (CuO) producidas por *T. asperellum* presentan morfología cristalina y esférica con un tamaño promedio de 110 nm. Tomah et al. (2023) describen que su mecanismo antimicrobiano opera a múltiples niveles, generando especies reactivas de oxígeno (ROS), causando degradación de antioxidantes, alterando membranas y afectando la expresión génica. Su efectividad ha sido demostrada contra fitopatógenos como *Poria hypolateritia* y *P. theae*.

Métodos de Síntesis. Los métodos tradicionales de síntesis, que incluyen técnicas físicas y químicas (radiación UV, litografía, ablación láser), presentan desventajas significativas por sus altos costos y generación de compuestos tóxicos. En contraste, Alghuthaymi et al. (2022) señalan que la biosíntesis ofrece ventajas considerables: es simple, económica, escalable y produce

nanopartículas con menor toxicidad y mejor biocompatibilidad debido a su estabilización con compuestos orgánicos.

Biosíntesis de Nanopartículas Mediante Microorganismos. La biosíntesis mediante microorganismos representa una alternativa versátil que puede utilizar diversos organismos y materiales biológicos, incluyendo extractos de plantas, bacterias, hongos, algas y levaduras (Alghuthaymi et al., 2022). De las aproximadamente 460 especies de *Trichoderma* registradas, solo 13 han demostrado capacidad para sintetizar nanopartículas, destacando *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. viride*, *T. atroviride* y *T. virens* (Tomah et al., 2023).

Proceso y Mecanismos de Biosíntesis. El proceso se caracteriza por ser económico, eficiente y preciso en el control del tamaño y morfología de las partículas. Alghuthaymi et al. (2022) describen que los metabolitos secundarios de *T. harzianum* actúan como agentes de recubrimiento y reducción, mientras que biomoléculas específicas proporcionan sitios de unión para iones metálicos. El proceso involucra grupos funcionales específicos (-OH, -COOH, -SH, -NH₂, -PO₄) y requiere la coenzima NADH y enzimas dependientes para la formación y estabilidad de las nanopartículas.

Mecanismos de Biosíntesis Mediante *Trichoderma*. La síntesis de nanopartículas mediante *Trichoderma* emplea enzimas reductasas como agentes bioreductores, junto con proteínas y metabolitos secundarios que proporcionan actividad biológica y estabilidad adicional. Ramírez-Valdespino & Orrantia-Borunda (2021) señalan que las nanopartículas resultantes muestran actividad antimicrobiana contra diversos fitopatógenos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*.

Los procesos de biosíntesis pueden ser intracelulares o extracelulares. Alghuthaymi et al. (2022) describen que en *T. longibrachiatum*, las proteínas se unen a las AgNP mediante grupos carbonilo, mientras que en *T. harzianum* se han identificado 35 metabolitos significativos para la síntesis de nanopartículas de selenio. *T. reesei* destaca como el productor más efectivo de enzimas extracelulares entre los hongos filamentosos.

Factores que Influyen en la Biosíntesis. Tomah et al. (2023) identifican varios factores críticos para la biosíntesis efectiva con *Trichoderma*: la selección apropiada de cepas con capacidad de síntesis; las condiciones óptimas de crecimiento, incluyendo temperatura (25°C) y pH (7,0); el tiempo adecuado de incubación (96 h); la velocidad de agitación (150 rpm).

La biosíntesis de nanopartículas metálicas requiere una optimización rigurosa de parámetros físico-químicos para controlar las propiedades del material resultante. Variables como temperatura, tiempo de reacción, concentración de precursor y condiciones de agitación influyen directamente en la cinética de formación, morfología y estabilidad coloidal de las nanopartículas.

La temperatura constituye el parámetro más crítico en la biosíntesis de nanopartículas metálicas. Saravanakumar et al. (2019) y Elamawi et al. (2018) establecieron 28°C como óptima para sistemas *Trichoderma*, fundamentando que esta temperatura maximiza la actividad enzimática reductasa sin desnaturalizar las proteínas catalíticas.

El tiempo de síntesis refleja la cinética específica de cada sistema biológico. Saravanakumar et al. (2019) utilizaron 120 horas basándose en cinética de primer orden con fase exponencial (0-72h) y estabilización (72-120h). Elamawi et al. (2018) optimizaron 72 horas identificando patrón sigmoideo: adaptación metabólica (0-24h), formación exponencial (24-48h) y maduración cristalina (48-72h).

La concentración del precursor balancea eficiencia de síntesis con prevención de toxicidad celular. Saravanakumar et al. (2019) emplearon 5 mM $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, concentración que evita saturación de sitios enzimáticos sin limitar velocidad de reacción. Elamawi et al. (2018) utilizaron 1 mM AgNO_3 , manteniéndose bajo el umbral de toxicidad de plata hacia microorganismos.

Las condiciones de mezclado influyen en la uniformidad y morfología de nanopartículas. Elamawi et al. (2018) determinaron que la ausencia de agitación es óptima para plata, demostrando que perturbaciones mecánicas interfieren con la nucleación ordenada y generan distribuciones de tamaño menos uniformes.

Caracterización y Propiedades. La caracterización morfológica y estructural, según Alghuthaymi et al. (2022), se realiza mediante técnicas avanzadas como espectroscopía UV-vis, microscopía electrónica de transmisión (TEM) y análisis de energía dispersiva de rayos X (EDAX). Las CuONPs presentan tamaños entre 10-190 nm (promedio 110 nm), mientras que las nanopartículas de cobre puras muestran dimensiones de 5-25 nm, todas con morfología predominantemente esférica. Este método biosintético representa una alternativa ventajosa frente a los métodos tradicionales, ofreciendo mayor sostenibilidad, menor toxicidad y mejor control del tamaño y morfología de las partículas (Tomah et al., 2023).

Resonancia de Plasmón Superficial. El plasmón superficial localizado constituye un fenómeno físico fundamental que emerge cuando los electrones de conducción en nanopartículas metálicas oscilan colectivamente en respuesta a la interacción con radiación electromagnética de frecuencia específica. Saravanakumar et al. (2019) explican que esta resonancia ocurre debido a la oscilación colectiva de electrones de conducción cuando interactúan con luz de frecuencia específica, generando una absorción característica que permite la detección inequívoca de la formación de nanopartículas metálicas. Este fenómeno es exclusivo de estructuras nanométricas porque requiere que las dimensiones de las partículas sean comparables a la longitud de onda de la luz incidente, condición que no se cumple en materiales metálicos masivos donde los electrones están confinados en estructuras cristalinas extensas.

En el caso específico del cobre, Hassan et al. (2023) establecen que los electrones libres en la superficie de las nanopartículas metálicas oscilan colectivamente al interactuar con radiación electromagnética de frecuencia específica, generando una absorción característica en el espectro visible, típicamente en el rango de 575-590 nm para nanopartículas de cobre biosintetizadas. La posición exacta del pico plasmónico proporciona información valiosa sobre las características físico-químicas del material, ya que Elamawi et al. (2018) demuestran que la resonancia plasmónica es extremadamente sensible al tamaño, forma y entorno químico de las nanopartículas, permitiendo inferir propiedades morfológicas específicas del sistema

biosintetizado y estableciendo una correlación directa entre características espectrales y propiedades estructurales del nanomaterial.

Mecanismos de Acción Contra Fitopatógenos. Las nanopartículas ejercen su control sobre patógenos vegetales mediante un complejo mecanismo de interacción celular que, según Alghuthaymi et al. (2022), comprende tres procesos principales: la adhesión electrostática, donde existe interacción entre las cargas superficiales positivas de las nanopartículas y las cargas negativas de glicoproteínas en la pared celular fúngica; la penetración, que ocurre mediante internalización a través de receptores específicos o proteínas transportadoras de iones; y la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que provocan degradación de antioxidantes y disrupción de membranas. A nivel molecular, Tomah et al. (2023) describen que las nanopartículas escinden enlaces de monómeros de N-acetilglucosamina de la quitina, interrumpen el transporte de electrones, afectan el potencial de la membrana mitocondrial, causan daños al DNA y proteínas, e interfieren con la absorción de nutrientes.

Aplicaciones en Control de Enfermedades. Específicamente, las nanopartículas de cobre (CuNPs y CuONPs) han demostrado actividad antifúngica significativa contra *Fusarium* y *Aspergillus*, provocando cambios morfológicos como deformaciones del micelio y conidios no germinados (Ramírez-Valdespino & Orrantia-Borunda, 2021). Estos efectos estructurales son consecuencia directa de la interacción entre las nanopartículas y los componentes celulares de los hongos fitopatógenos, comprometiendo su viabilidad y capacidad infectiva.

La efectividad de estas nanopartículas ha sido documentada por Tomah et al. (2023) en diversos casos: inhibición de *Fusarium oxysporum*, un patógeno que causa marchitez vascular en numerosos cultivos; control del tizón de la vaina en arroz causado por *Rhizoctonia solani*, con una reducción notable de incidencia del 88% al 20% utilizando AgNPs a concentraciones de 200 ppm; y control efectivo de *Cercospora theae* y otros hongos del suelo que representan amenazas significativas para diversos cultivos agrícolas.

Esta tecnología representa una solución innovadora, ambientalmente aceptable y económica para el manejo de enfermedades vegetales, combinando la eficacia del control con la

sostenibilidad ambiental. La capacidad de *Trichoderma* para sintetizar estas nanopartículas añade valor al proceso, creando un sistema integrado donde el organismo que produce las nanopartículas también contribuye al biocontrol mediante sus mecanismos naturales.

Capítulo 2

Metodología

La presente investigación se desarrolló siguiendo un enfoque experimental para abordar el problema de la moniliasis en el cultivo de cacao. Ante las limitaciones de sostenibilidad ambiental, viabilidad económica para pequeños productores y el desarrollo de resistencia asociadas con los métodos convencionales de control, se propuso como alternativa la biosíntesis de nanopartículas de cobre mediante cepas de *Trichoderma* para su evaluación como agente antifúngico contra *M. roreri*.

El estudio se estructuró en cuatro etapas secuenciales: (1) aislamiento y caracterización de microorganismos, (2) biosíntesis y caracterización de nanopartículas de cobre, (3) evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*, y (4) análisis estadístico de los resultados.

Esta investigación se diseñó como un estudio preliminar para establecer la factibilidad técnica de la biosíntesis de nanopartículas de cobre por *Trichoderma* y evaluar su potencial antifúngico contra *M. roreri*, identificando limitaciones metodológicas que orienten investigaciones futuras.

Materiales y Reactivos

Para el desarrollo de esta investigación, se utilizó los siguientes reactivos, medios de cultivos, equipos y materiales:

Reactivos

- Sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) grado analítico, pureza $\geq 98\%$
- Alcohol etílico 70% y 95%
- Hipoclorito de sodio 5% (grado comercial, diluido a concentraciones de trabajo)
- Glicerol (LOBA CHEMIE)
- Cloranfenicol
- Lugol (LOBA CHEMIE)
- Agua destilada

Medios de Cultivo

- Agar Papa Dextrosa (PDA, Difco™)
- Caldo Papa Dextrosa (PDB, Difco™)
- Agar Deshidratado (BD, Bacto™)

Equipos y Materiales

- Autoclave vertical (BIOBASE, BQK-B50II)
- Balanza analítica (BOECO, modelo, BAS31 PLUS)
- Cámara de flujo laminar (BIOBASE, modelo BBS-H1100)
- Incubadora (BIOBASE, modelo BJPX-H50)
- Agitador orbital (BOECO, modelo PSU-10i)
- Centrífuga refrigerada (BIOBASE, BKC-TB4K)
- Espectrofotómetro UV-visible (HACH, modelo DR1900)
- Microscopio óptico (EUROMEX, modelo BSCOPE)
- Potenciómetro (OAKTON, modelo pH2700)
- Agitador vórtex (DLAB, modelo MX-S)
- Cámara de Neubauer
- Membranas de filtración de nitrocelulosa (0,22 µm y 0,45 µm)
- Placas Petri estériles de 90 mm y 60 mm
- Material de vidrio (matraces Erlenmeyer, probetas, vasos de precipitado, tubos de ensayo)
- Pipetas automáticas
- Estufas de secado (MEMMERT, modelo UF110)

Aislamiento y Caracterización de Microorganismos

Aislamiento y Caracterización de Cepas de Trichoderma

El aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* se realizó a partir de muestras de suelo rizosférico de plantaciones de cacao de la variedad Nacional (*Theobroma cacao* L. var. Nacional)

en la provincia de Orellana, Ecuador. Se seleccionaron dos sitios de muestreo en el cantón Francisco de Orellana: Nueva Providencia y La Belleza. La región presenta un clima tropical lluvioso con precipitación anual promedio de 3 000 mm, temperatura media de 28°C y humedad relativa del 85% (Montilla Pacheco et al., 2024).

Se recolectaron muestras de suelo de la zona radicular (0-20 cm de profundidad) siguiendo un patrón aleatorio según la metodología descrita por Samuels (2006). Las muestras fueron transportadas en bolsas de polietileno estériles, mantenidas a 4°C y procesadas dentro de las 24 h posteriores a su recolección.

Se implementó el método de diluciones seriadas y la técnica de extensión en placa descrita por Cappuccino & Sherman (2017), se preparando diluciones decimales (10^{-1} a 10^{-5}) a partir de 10 g de suelo homogeneizado en 90 mL de agua destilada estéril. Se tomaron alícuotas de 100 μ L de las diluciones 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} las cuales fueron sembradas por triplicado en placas con medio PDA (Potato Dextrose Agar, Difco™) al 3.9% suplementado con cloranfenicol (50 mg·L⁻¹) para inhibir el crecimiento bacteriano. Las placas se incubaron a 28°C durante 3-5 días con observaciones diarias del crecimiento.

Las colonias con características morfológicas típicas de *Trichoderma* (crecimiento rápido que cubre la placa en 3-4 días, micelio inicialmente blanco con posterior desarrollo de conidiación verde a verde-azulada, bordes bien definidos y crecimiento radial) según las descripciones taxonómicas (Bissett (1991) y Samuels (2006) fueron seleccionadas para purificación mediante cultivos monospóricos según la metodología descrita por Leslie & Summerell (2006). Para esto, se prepararon suspensiones de esporas en agua destilada estéril, posteriormente se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-6} , y 50 μ L de la última dilución fueron sembrados en agar deshidratado (BD, Bacto™) al 2%. Después de 24 h de incubación a 28°C, las esporas germinadas aisladas fueron identificadas bajo microscopio estereoscópico (40X) y transferidas individualmente a placas con PDA. Los cultivos monospóricos obtenidos fueron incubados a 28°C durante 5-7 días hasta obtener crecimiento adecuado y posteriormente preservados mediante el método (Castellani, 1968).

La caracterización morfológica se realizó mediante microcultivos según Riddell (1950) Giraldo et al. (2015). Se registraron características macroscópicas y microscópicas según lo descrito por Bissett (1991), Samuels (1996) y Druzhinina et al. (2005).

Aislamiento y Caracterización de Cepa de *Moniliophthora roreri*

Se implementó la metodología de aislamiento indirecto descrita por Alfenas & Mafia (2016) con adaptaciones específicas para *M. roreri*. Se recolectaron mazorcas de cacao con síntomas característicos de moniliasis (manchas oleosas que evolucionan a color chocolate, presencia de micelio blanco y deformación del fruto) de plantaciones en la provincia de Orellana, las cuales, fueron transportadas en bolsas de papel Kraft hasta el laboratorio para su procesamiento.

En el laboratorio de Ciencias Básicas de Microbiología de la ESPOCH-Sede Orellana, las muestras fueron procesadas dentro de las 48 h posteriores a la recolección para preservar la viabilidad del patógeno. Las mazorcas fueron lavadas con agua corriente, desinfectadas superficialmente con etanol al 70% y secadas en cámara de flujo laminar. Los tejidos infectados se cortaron en fragmentos de 3-5 mm tomados específicamente de la zona de transición entre tejido sano y enfermo, donde se concentra la actividad del patógeno. Los fragmentos fueron desinfectados secuencialmente con alcohol al 70% durante 1 minuto e hipoclorito de sodio al 0.1% durante 2 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril para eliminar residuos de desinfectantes. Posteriormente, se sembraron 4 fragmentos por placa en medio PDA suplementado con cloranfenicol ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) para inhibir el crecimiento bacteriano, incubándose a 28°C durante 2-7 días en condiciones de oscuridad para favorecer el desarrollo del patógeno.

Los cultivos puros se obtuvieron mediante cultivos monospóricos según Leslie & Summerell (2006). Se prepararon suspensiones de esporas de colonias esporuladas (10-14 días) en agua destilada estéril, posteriormente la concentración se ajustó a $10^3 \text{ esporas} \cdot \text{mL}^{-1}$ mediante conteo en cámara de Neubauer. Las esporas germinadas aisladas fueron transferidas individualmente a PDA utilizando microscopio estereoscópico (40X).

La caracterización morfológica se realizó mediante microcultivos según Riddell (1950) y Giraldo et al. (2015), se registrando características macroscópicas y microscópicas según lo descrito por Evans et al. (1978) y Bailey et al. (2018). La preservación se realizó mediante el método (Castellani, 1968). La tasa de crecimiento radial se determinó midiendo diariamente el diámetro colonial en dos direcciones perpendiculares durante 3 días a 28°C.

Biosíntesis de Nanopartículas de Cobre

Preparación del Material Biológico

La biosíntesis se inició con el establecimiento de cultivos de *Trichoderma* spp. en medio Agar Papa Dextrosa a 28 °C durante 5-7 días hasta observar esporulación uniforme y abundante (Ahluwalia et al., 2014). Se prepararon suspensiones estandarizadas de conidios ajustadas a 1×10^6 conidios·mL⁻¹ mediante conteo en cámara de Neubauer para asegurar reproducibilidad experimental (Guilger-Casagrande & Lima, 2019).

Los cultivos en medio líquido se establecieron inoculando 100 mL de Caldo Papa Dextrosa estéril (pH inicial $5,6 \pm 0,2$) con 1 mL de la suspensión estandarizada en matraces Erlenmeyer de 250 mL. La incubación se realizó a 28°C con agitación orbital de 150 rpm durante 120 h para maximizar la producción de enzimas reductasas y metabolitos bioactivos necesarios para la síntesis efectiva de nanopartículas (Saravanakumar et al., 2019).

Obtención de Filtrados Extracelulares

La separación de la biomasa fúngica se realizó mediante filtración primaria con papel Whatman No. 1, seguida de lavado triple con agua destilada estéril. Para la extracción de metabolitos extracelulares, la biomasa lavada (10 g peso húmedo) se suspendió en 100 mL de agua destilada estéril ajustada a pH 7,0 en matraces Erlenmeyer de 250 mL. La suspensión se mantuvo a 28°C con agitación orbital de 150 rpm durante 48 h en oscuridad completa.

La purificación del filtrado extracelular siguió un protocolo secuencial consistente en filtración a través de membranas de 0,45 µm seguida de centrifugación a 10 000 rpm durante 15 min a 4°C para eliminar residuos celulares y particulados.

Proceso de Síntesis de Nanopartículas

La síntesis de nanopartículas se implementó utilizando parámetros establecidos en investigaciones previas (Consolo et al., 2020; Salvadori et al., 2014). Se preparó una solución de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a concentración 5 mM en agua destilada estéril. El proceso de síntesis se desarrolló combinando 50 mL del filtrado extracelular concentrado con volumen igual de la solución de sulfato de cobre en matraces Erlenmeyer de 250 mL. El pH de la mezcla de reacción fue ajustado a $7,0 \pm 0,2$ utilizando buffer fosfato 0,1 M para mantener estabilidad durante el proceso de síntesis.

Las condiciones de incubación consistieron en 28°C con agitación suave de 100 rpm durante 48 h en oscuridad completa, condiciones que maximizan la actividad de las enzimas reductasas dependientes de NADH identificadas por Vahabi & Dorcheh (2014) como agentes clave en la reducción de iones metálicos. El progreso de la reacción se monitoreó mediante observación del cambio cromático característico desde azul claro inicial hacia tonalidades verde-marrón que indica la formación de nanopartículas de cobre metálico.

Purificación y Almacenamiento

Las nanopartículas sintetizadas fueron separadas del medio de reacción mediante centrifugación a 15 000 rpm durante 20 min a 4°C . El precipitado obtenido fue sometido a tres ciclos secuenciales de lavado con agua destilada estéril, incorporando sonicación suave de 5 min entre ciclos para prevenir agregación permanente. La efectividad del lavado fue verificada mediante medición de conductividad del sobrenadante, considerándose completa cuando se alcanzaron valores inferiores a $10 \mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$.

La resuspensión final se realizó en 10 mL de agua destilada estéril, seguida de filtración a través de membranas de $0,22 \mu\text{m}$ para asegurar esterilidad microbiológica. El almacenamiento se realizó a 4°C en frascos ámbar, manteniendo las nanopartículas estables para análisis posteriores (Consolo et al., 2020).

Caracterización de Nanopartículas

Espectroscopía UV-visible. La caracterización de nanopartículas de cobre biosintetizadas se realizó mediante espectroscopía UV-visible utilizando un espectrofotómetro HACH modelo DR1900, siguiendo los principios metodológicos de Shard et al. (2020) para caracterización óptica de nanomateriales metálicos. Las mediciones espectrales se ejecutaron mediante lecturas directas de las suspensiones coloidales finales utilizando las celdas estándar de cuarzo del equipo, sin dilución previa de las muestras.

Las mediciones se realizaron tomando lecturas en longitudes de onda específicas dentro del rango 340-800 nm. Se utilizó agua destilada como blanco de referencia para establecer la línea base instrumental antes de cada serie de mediciones.

El análisis espectroscópico se enfocó en la detección de picos de absorción característicos mediante lecturas directas de las muestras biosintetizadas después de completar el proceso de síntesis de 48 h. La confirmación de la formación de nanopartículas se basó en la aparición de picos de absorción característicos reportados en literatura para nanopartículas de cobre biosintetizadas (Patel et al., 2016); (Abdelhai et al., 2024).

Evaluación del Potencial Antifúngico *in vitro*

Inhibición del Crecimiento Micelial

La metodología para evaluar la inhibición del crecimiento micelial de *M. roreri* frente a nanopartículas biosintetizadas se basó en la técnica de medio enmendado, siguiendo el protocolo básico descrito por Lovato Echeverria et al. (2017), pero con adaptaciones específicas. Se incorporó 1 mL de la suspensión de nanopartículas biosintetizadas en 17 mL de medio de cultivo PDA esteril, manteniendo una proporción constante para todos los tratamientos.

Se incluyeron los siguientes controles:

Control negativo: Medio PDA sin adición de nanopartículas

Control positivo químico: Medio PDA con fungicida comercial PHYTON (sulfato de cobre pentahidratado 21,36%, equivalente a 5,5% de cobre metálico) a dosis de 10 ppm)

Control de precursor: Medio PDA con solución de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 5 mM), la misma utilizada para la biosíntesis de nanopartículas.

Se inocularon discos de micelio de 5 mm de diámetro en el centro de cada placa, incubando a 28-30°C en oscuridad durante 6 días. El crecimiento radial del micelio se midió cada 24 h en dos direcciones perpendiculares. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) mediante la fórmula:

Se usó la relación matemática para calcular el porcentaje de inhibición según Lovato Echeverria et al. (2017).

$$\text{PIC (\%)} = \frac{D_c - D_t}{D_c} * 100 \quad (2.1)$$

Donde:

PIC = Porcentaje de inhibición del crecimiento

D_c = Diámetro de la colonia en el control (mm)

D_t = Diámetro de la colonia en el tratamiento (mm)

Adicionalmente, se calculó la tasa de crecimiento diario ($\text{mm} \cdot \text{día}^{-1}$) para cada tratamiento.

Análisis Estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar (DCA) con un factor único, evaluando el efecto de cinco tratamientos antifúngicos: nanopartículas de cobre biosintetizadas por las cepas BO-07 y YN-06, sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), fungicida comercial PHYTON y control negativo sobre el crecimiento micelial de *M. royeri*. Cada tratamiento contó con tres repeticiones, evaluadas durante cinco días consecutivos, generando un total de 15 observaciones por tratamiento.

Previo al análisis de varianza, se verificaron los supuestos estadísticos mediante las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk), homogeneidad de varianzas (Levene) e independencia de residuales (Durbin-Watson). Los datos fueron sometidos a ANOVA para determinar diferencias entre tratamientos y la comparación múltiple de medias se realizó mediante la prueba de Tukey HSD ($p \leq 0,5$). Se calcularon estadísticas descriptivas incluyendo medidas de tendencia central, dispersión y distribución para caracterizar el comportamiento de cada tratamiento. Para el

procesamiento y análisis de los datos se utilizó el lenguaje de programación R 4.4.2 con librería de análisis estadísticos y gráficos "agricolae", "ggplot2" y "tidyverse".

Consideraciones Éticas y Legales

El presente trabajo se desarrolló bajo estricto cumplimiento de la normativa de bioseguridad para el manejo de microorganismos en laboratorio. Todos los procedimientos con *M. roreri* se realizaron en condiciones controladas para evitar su dispersión al ambiente. Los residuos biológicos fueron tratados según los protocolos de inactivación establecidos para patógenos de plantas.

Capítulo 3

Resultados y Análisis

El presente capítulo describe los resultados obtenidos mediante la metodología implementada para evaluar el potencial antifúngico de nanopartículas de cobre biosintetizadas por *Trichoderma* contra *Moniliophthora roreri*. Esta investigación estableció las bases metodológicas para evaluar tanto la factibilidad de las nanopartículas como su potencial antifúngico in vitro.

Aislamiento y Caracterización de Microorganismos

Aislamiento de Cepas de Trichoderma spp.

Se aislaron dos cepas de *Trichoderma* spp. a partir de muestras de suelo rizosférico de plantaciones de cacao en la provincia de Orellana, específicamente del cantón Francisco de Orellana. Las cepas fueron codificadas como YN-06 (comunidad Nueva Providencia) y BO-07 (comunidad La Belleza), ambas recolectadas en marzo de 2025 (Tabla 3.1).

Tabla 3.1

Cepas de Trichoderma obtenidas con sus códigos y localidades de origen

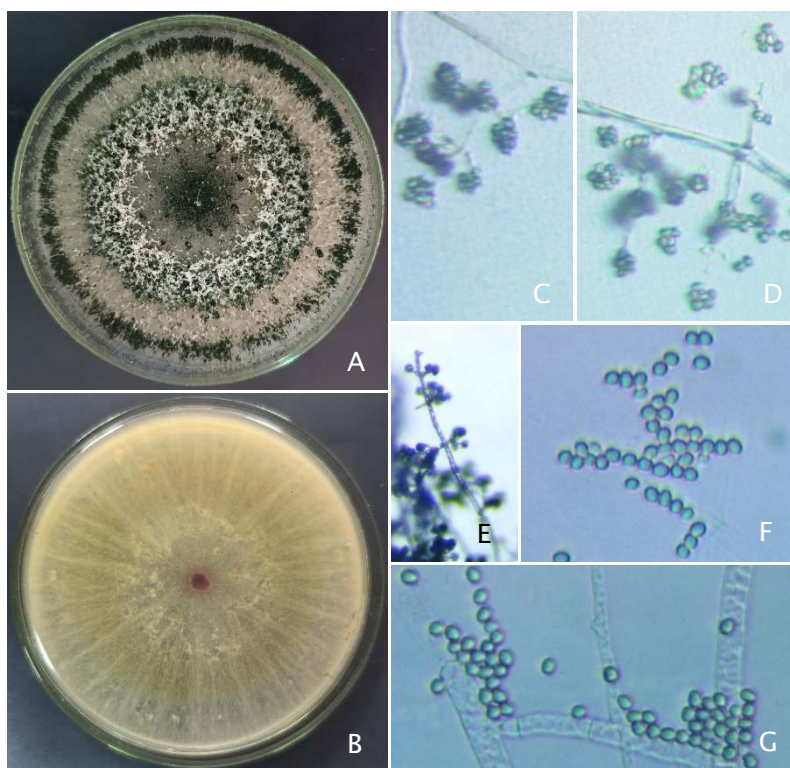
Cepas de <i>Trichoderma</i>					
No.	Fecha de muestreo	Provincia	Cantón	Comunidad	Código
1	mar-25	Orellana	Francisco de Orellana	Nueva providencia	YN-06
2	mar-25	Orellana	Francisco de Orellana	La Belleza	BO-07

Caracterización Fenotípica de Trichoderma spp.

Características Culturales. Las colonias aisladas presentaron las características morfológicas distintivas del género *Trichoderma*: crecimiento rápido que cubrió completamente las placas de Petri (90 mm) entre 3-4 días, micelio inicialmente blanco que posteriormente desarrolló tonalidades verdes a verde-azuladas por la esporulación, bordes bien definidos (Figura 3.1 y 3.2, A y B). Estas características macroscópicas son consistentes con las descripciones por Bissett (1991) y Samuels (1996).

Figura 3.1

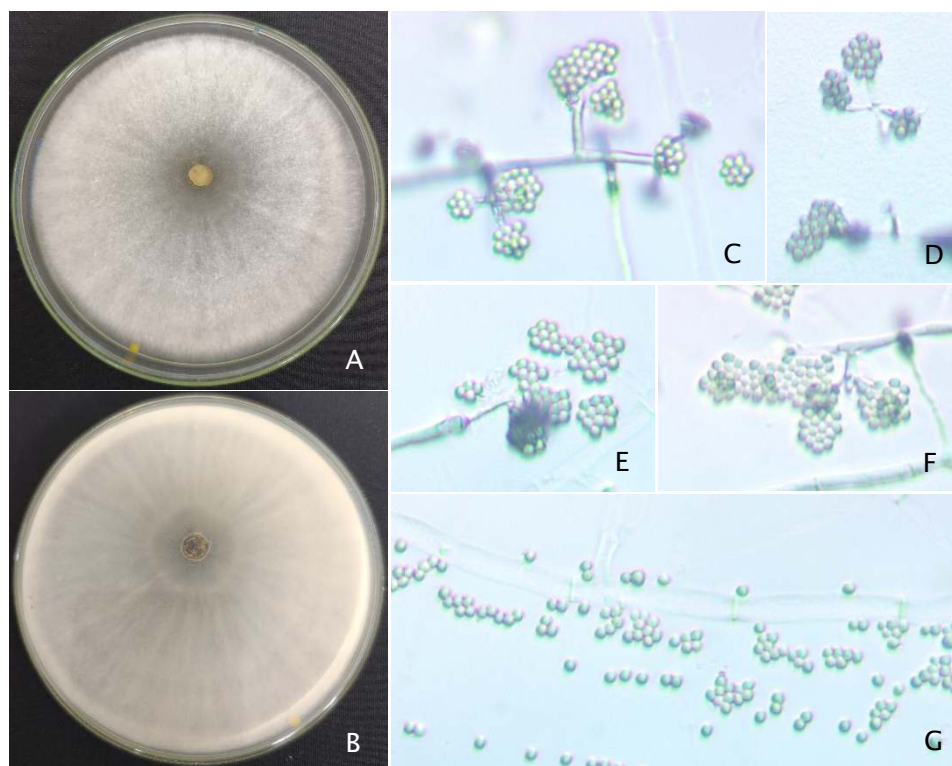
Características culturales y morfológicas de cepa de Trichoderma spp. (BO-07)



Nota. A-B. Características fenotípicas en PDA (8 días, 28°C): crecimiento radial con micelio blanco-cremoso central y conidiación verde periférica típica de *Trichoderma*. *C-E.* Conidióforos con ramificación dendrítica característica. *F-G.* Conidios maduros elipsoides con coloración verde a parda.

Figura 3.2

Características culturales y morfológicas de cepa de Trichoderma spp. (YN-06)

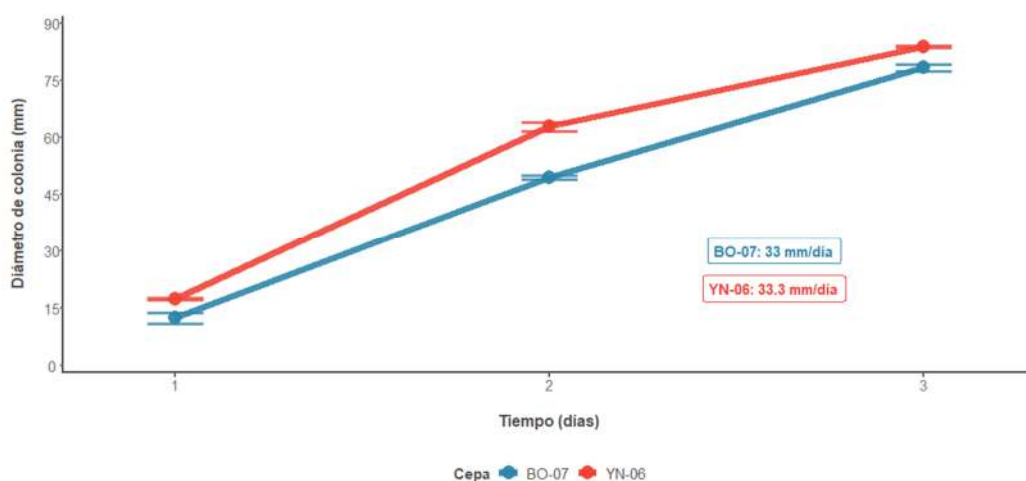


Nota. A-B. Características culturales en PDA (4 días, 28°C): crecimiento micelial rápido con micelio blanco típico de *Trichoderma*. C-F. Conidióforos con ramificación dendrítica característica. G. Conidios maduros con variabilidad morfológica típica del género.

Características Microscópicas. El análisis microscópico reveló estructuras reproductivas características del género *Trichoderma*. Los conidióforos presentaron el patrón dendrítico típico con ramificación repetitiva a múltiples niveles (Figura 3.1, C y D; Figura 3.2, C-F), los conidios fueron unicelulares, de forma predominantemente elipsoide a obovoidea, y coloración verde a parda (Figura 3.1, F y G; Figura 3.2, G), resultados que concuerdan con las descripciones de Bissett (1991), Chaverri & Samuels (2003).

Figura 3.3

Tasa de crecimiento micelial de cepas de Trichoderma spp.



Nota. TCM = (Diámetro final - Diámetro inicial) / Tiempo transcurrido.

Tasa de Crecimiento Micelial. Las cepas evaluadas presentaron tasas de crecimiento micelial elevadas y prácticamente equivalentes: YN-06 registró 33,28 mm-día⁻¹ y BO-07 alcanzó 33,03 mm-día⁻¹. Ambas cepas superaron ampliamente los criterios de Bissett (1991) para especies de crecimiento rápido, alcanzando diámetros superiores a 7,8 cm en solo 3 días a 28°C, clasificándose como cepas de crecimiento rápido (Figura 3.3).

Aislamiento de Moniliophthora roreri

El aislamiento de *M. roreri* se realizó a partir de mazorcas de cacao con síntomas característicos de moniliasis recolectadas en plantaciones de la provincia de Orellana. Los fragmentos de tejido desinfestados superficialmente desarrollaron crecimiento fúngico después de 3-5 días de incubación a 28°C en medio PDA suplementado con cloranfenicol. Se obtuvo un aislado puro que fue codificado y preservado según los protocolos establecidos.

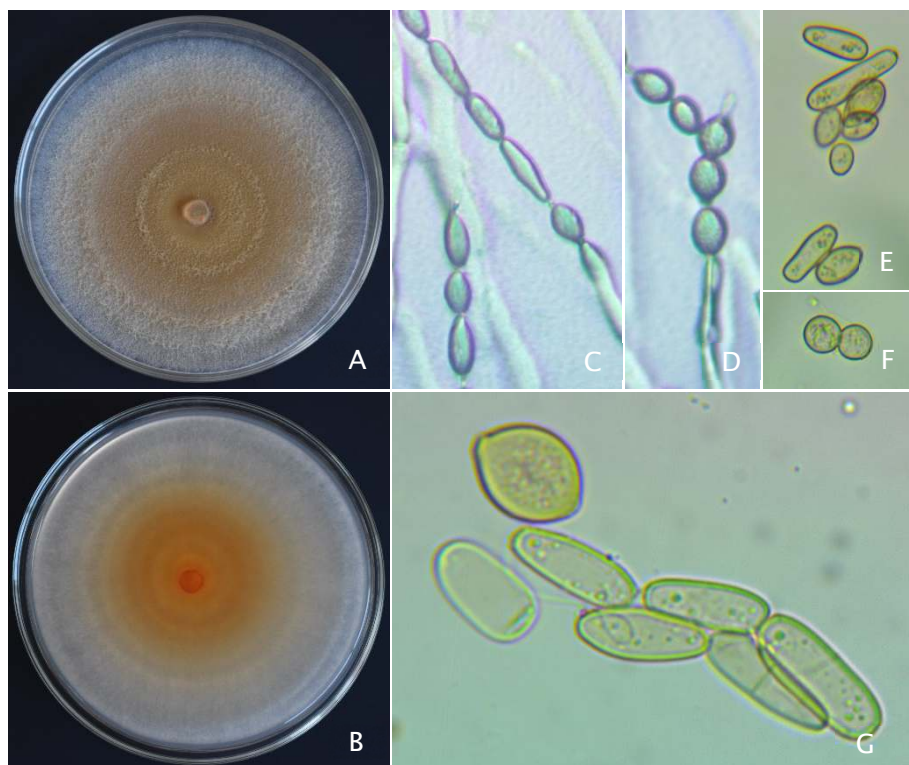
Caracterización Fenotípica de Moniliophthora roreri

Características Culturales. Las colonias presentaron desarrollo radial típico con micelio blanco-cremoso y zonación concéntrica sutil (Figura 3.4, A), consistente con las descripciones de Bailey et al. (2018). El reverso de la colonia mostró una progresión cromática características desde

tonalidades crema hasta marrón-anaranjado intenso en el centro (Figura 3.4, B), rasgos diagnóstica de *M. roreri*. Estos resultados coinciden con los reportados por Cuervo-Parra et al. (2011), quienes describieron un crecimiento inicial color blanco que progresa salmón-crema y posteriormente marrón oscuro.

Figura 3.4

Características morfológicas de Moniliophthora roreri

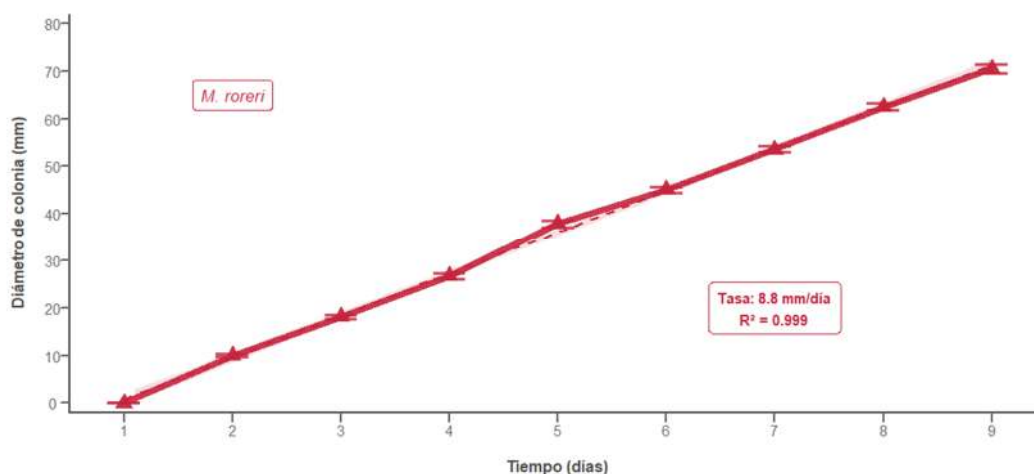


Nota. A-B. Características fenotípicas en PDA (12 días, 28-30°C): crecimiento radial con micelio blanco-cremoso y zonación concéntrica; reverso con progresión cromática crema-marrón. C-D. Cadenas basipetales de esporas características. E-G. Esporas maduras globosas, subglobosas y elipsoidales.

Características Microscópicas. La observación microscópica confirmó las características diagnósticas descritas por Evans et al. (1978). Se observó la formación característica de cadenas basipetales de esporas, evidencia crucial de la conidiogénesis que distingue a *Moniliophthora*. Las esporas maduras exhibieron la variabilidad morfológica característica: predominantemente globosas a subglobosas y elipsoidales, confirmando la identidad de *M. roreri*.

Figura 3.5

Tasa de Crecimiento micelial de Moniliophthora roreri



Nota. Cultivo en medio PDA a 28-30°C (n=3).

Tasa de Crecimiento Micelial. El análisis del crecimiento micelial reveló un patrón de crecimiento lineal constante de $8,74 \text{ mm} \cdot \text{día}^{-1}$ a 28°C en medio PDA, alcanzando el patógeno 70,5 mm de diámetro después de 9 días (Figura 3.5). Estos resultados concuerdan con los reportados por Cuervo-Parra et al. (2011), quienes observaron diámetros 70-77 mm en 7 días para cepas de *M. roreri* cultivadas en PDA a 25°C.

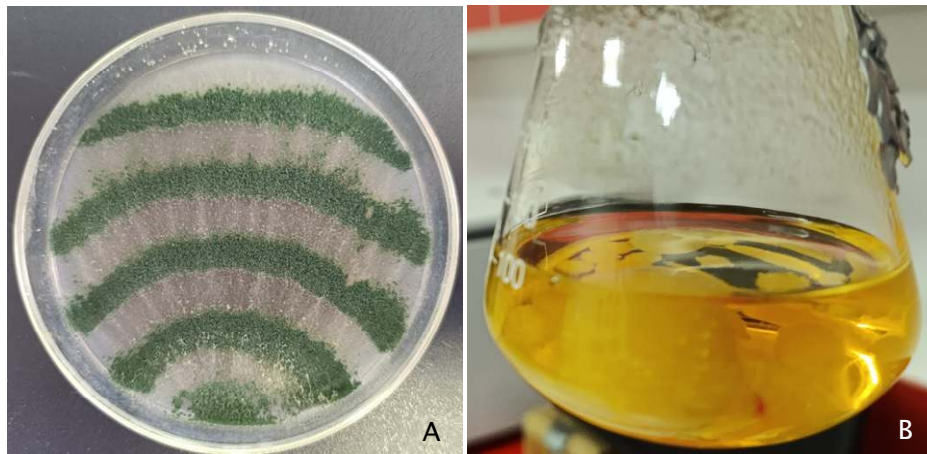
Biosíntesis y Caracterización de Nanopartículas de Cobre

Biosíntesis de Nanopartículas Mediante Trichoderma

Los cultivos de *Trichoderma* spp. desarrollaron esporulación abundante y uniforme después de 10 días de incubación en PDA a 28°C (Figura 3.6, A). Las suspensiones estandarizadas alcanzaron concentraciones de 1×10^6 conidios $\cdot \text{mL}^{-1}$.

Figura 3.6

Producción de esporas y biomasa fúngica de Trichoderma para biosíntesis de nanopartículas de cobre



Nota. **A.** Cepa BO-07 con esporulación abundante. **B.** Crecimiento de micelio en medio de cultivo (PDB).

Los cultivos en Caldo Papa Dextrosa mostraron crecimiento micelial vigoroso después de 120 h de incubación, desarrollando una biomasa densa de coloración blanco-cremosa (Figura 3.6, B). El pH del medio disminuyó de $5,6 \pm 0,2$ inicial a $4,2 \pm 0,3$ final. Se obtuvo un rendimiento promedio de $8,5 \pm 1,2$ g de biomasa húmeda por cada 100 mL de medio de cultivo.

Figura 3.7

Filtrados extracelulares y nanopartículas de cobre biosintetizadas por cepas de Trichoderma



Nota. A. Filtrado extracelular de la cepa YN-06. B. Nanopartículas biosintetizadas por cepa YN-06. C. Filtrado extracelular de la cepa BO-07. D. Nanopartículas biosintetizadas por cepa BO-07.

La biomasa fúngica (10 g peso húmedo) produjo filtrado extracelular transparente con coloración amarillenta (Figura 3.7, A y C). La adición del sulfato de cobre (5 mM) al filtrado extracelular indujo un cambio cromático verde-marrón después de 24 h de reacción (Figura 3.7, B y D), consistente Consolo et al. (2020), quienes utilizando *Trichoderma harzianum* y sulfato de cobre (1 mM) reportaron que durante las primeras 24 h de reacción, la intensidad cromática aumentó gradualmente hacia tonalidades verde-marrón.

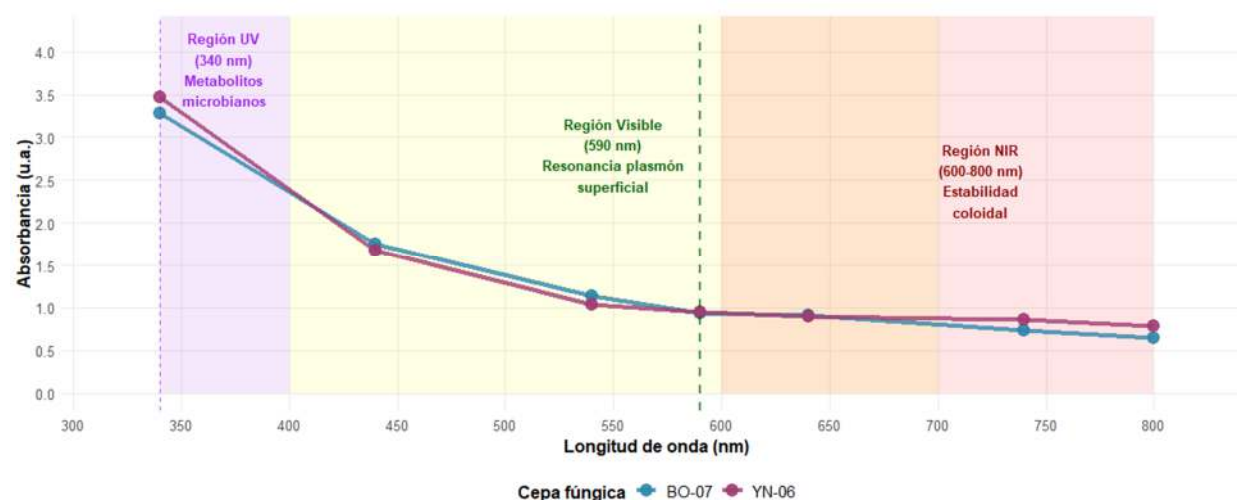
La reacción se completó después de 48 h, evidenciada por la estabilización del color marrón-verdoso característico, coincidiendo con Consolo et al. (2020) quienes confirmaron que la reacción se completó después de 48 h, ratificando la reducción de Cu^{2+} a Cu^0 y formación de nanopartículas metálicas. Este patrón confirmó la reducción completa de Cu^{2+} a Cu^0 y la formación exitosa de nanopartículas de cobre metálico.

Caracterización de Nanopartículas Mediante Espectroscopía UV-visible

La caracterización espectroscópica confirmó la formación de nanopartículas de cobre mediante la detección de bandas de absorción características en el espectro electromagnético.

Figura 3.8

Análisis espectroscópico UV-VIS de nanopartículas de cobre biosintetizadas



Nota. Espectro UV-Vis (340-800 nm) de CuNPs biosintetizadas por las cepas BO-07 (azul) y YN-06 (violeta). Absorción característica a 590 nm (0,94-0,95 u.a.) confirma la formación de CuNPs.

El análisis espectroscópico reveló absorción característicos a 590 nm para ambas cepas de *Trichoderma* (BO-07 y YN-06), confirmando la formación de CuNPs mediante resonancia de plasmón superficial (Figura 3.8). Los valores de absorbancia obtenidos (0,94-0,95) coinciden con la región visible del espectro donde ocurre la resonancia plasmónica del cobre metálico.

Estos resultados son consistentes con estudios previos: Abdelhai et al. (2024) reportaron 575 nm con absorbancia de 1,2 usando *Stevia rebaudiana* y Patel et al. (2016) obtuvieron 586 nm con valores de 0,5-0,7 usando *Ocimum sanctum*. Nuestros valores (590 nm, 0,94-0,95) se posicionan intermedios entre ambos estudios, validando la formación exitosa de CuNPs con eficiencia biosintética comparable a *Stevia* y superior a *Ocimum*. Las variaciones en longitud de

onda (575-590 nm) reflejan diferencias en tamaño y morfología específicas del sistema biosintético empleado.

Sin embargo, siendo este un estudio de carácter exploratorio, es fundamental reconocer que la espectroscopía UV-Visible, aunque proporciona evidencia de la formación de nanopartículas, representa únicamente una técnica de caracterización primaria dentro del conjunto de análisis esenciales requeridos para la caracterización integral de nanomateriales. La caracterización completa de nanopartículas metálicas biosintetizadas requiere un enfoque multitécnico donde cada método analítico proporciona información específica e irremplazable sobre diferentes propiedades del material (Hassan et al., 2023).

La difracción de rayos X constituye una técnica esencial para determinar inequívocamente la composición de fase y estructura cristalina del material sintetizado, diferenciando entre cobre metálico puro (Cu^0), óxido cuproso (Cu_2O), óxido cúprico (CuO), o mezclas de fases. Esta información resulta crítica porque cada fase cristalina exhibe propiedades antifúngicas y mecanismos de acción completamente diferentes (Saravanakumar et al., 2019). Adicionalmente, mediante la aplicación de la ecuación de Scherrer a los patrones de difracción, es posible calcular el tamaño promedio de cristalito, parámetro fundamental para correlacionar estructura con actividad biológica.

La microscopía electrónica de transmisión representa otra técnica esencial que proporciona información morfológica directa y distribución real de tamaños de las nanopartículas biosintetizadas. Esta técnica permite visualizar la forma exacta de las partículas, evaluar su grado de agregación y monodispersidad, así como confirmar si el tamaño inferido de las mediciones espectroscópicas corresponde con la realidad física del material (Elamawi et al., 2018). La morfología de las nanopartículas influye directamente en su interacción con las estructuras fúngicas y, por tanto, en su eficacia antifúngica.

La espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier constituye una herramienta esencial para identificar los grupos funcionales de los metabolitos secundarios de *Trichoderma* que participan en los procesos de reducción de iones metálicos y estabilización de las

nanopartículas formadas. Esta información es fundamental para comprender el mecanismo de biosíntesis y optimizar las condiciones de síntesis (Hassan et al., 2023). Los estudios referenciados demuestran que grupos funcionales específicos como amidas, carbonilos y compuestos aromáticos presentes en extractos microbianos desempeñan roles cruciales en la formación y estabilización de nanopartículas metálicas.

La dispersión dinámica de luz proporciona información esencial sobre el comportamiento de las nanopartículas en suspensión acuosa, determinando el tamaño hidrodinámico y el índice de polidispersidad del sistema. Estos parámetros son fundamentales para predecir la estabilidad del material en condiciones de aplicación práctica (Elamawi et al., 2018). Las mediciones de potencial zeta complementan esta información evaluando la estabilidad electrostática del sistema coloidal, factor determinante para la agregación o dispersión de las nanopartículas durante almacenamiento y uso.

Cada una de estas técnicas analíticas proporciona información única e irremplazable sobre aspectos específicos de las nanopartículas biosintetizadas. La ausencia de cualquiera de estos análisis resulta en una caracterización incompleta que limita la comprensión integral del material y su potencial aplicación antifúngica.

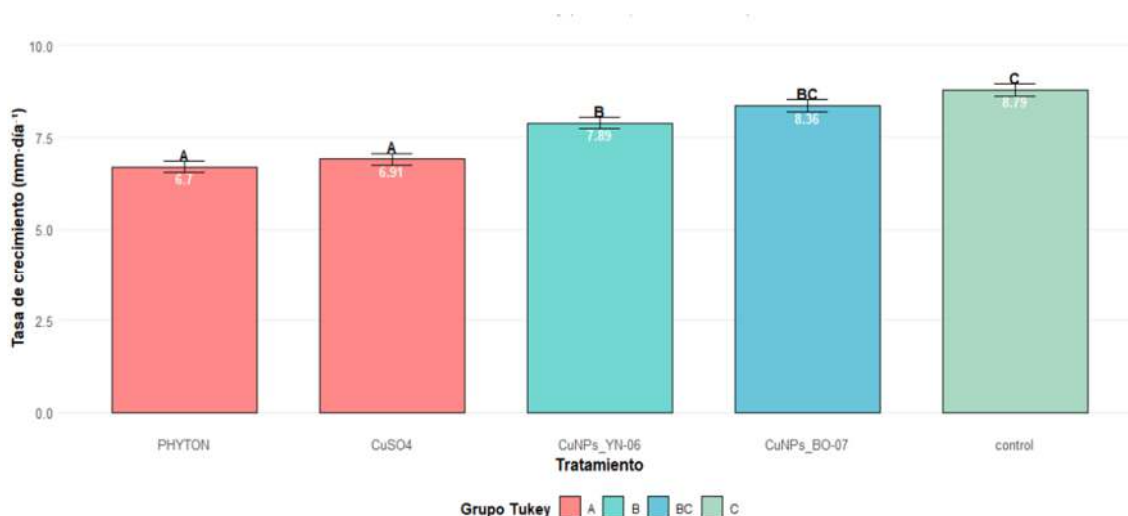
Evaluación de la Actividad Antifúngica *in vitro*

Análisis de la Tasa de Crecimiento Micelial

Los resultados del ensayo de la tasa de crecimiento micelial revelaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0,05$). El análisis de varianza (ANOVA) demostró que el factor tratamiento tuvo un efecto altamente significativo ($F = 31,77$; $p < 0,0001$) sobre la tasa de crecimiento micelial de *M. roreri*, con un coeficiente de variación del 3,62%, indicando una alta precisión experimental.

Figura 3.9

Tasa de crecimiento micelial de M. royeri bajo diferentes por tratamientos



Nota. PHYTON y CuSO₄ (grupo A) mostraron mayor efectividad antifúngica que las nanopartículas CuNPs_YN-06 y CuNPs_BO-07 (grupo B), todos superiores al control (grupo C) según la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

El análisis comparativo mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$; DMS = 0,75138) permitió identificar tres grupos estadísticamente diferenciados. Los tratamientos PHYTON y CuSO₄ formaron el grupo A, caracterizado por presentar las menores tasas de crecimiento micelial (6,70 mm·día⁻¹ y 6,91 mm·día⁻¹, respectivamente). Esta similitud estadística entre el fungicida comercial y el precursor de cobre sugiere que gran parte del efecto antifúngico observado puede atribuirse directamente a la actividad del ion cobre en forma libre.

Los tratamientos con nanopartículas de cobre biosintetizadas (CuNPs_YN-06 y CuNPs_BO-07) presentaron tasas de crecimiento intermedias, clasificándose en el grupo B con valores de 7,89 mm·día⁻¹ y 8,38 mm·día⁻¹, respectivamente. Estos resultados indican que las nanopartículas biosintetizadas mantienen una actividad antifúngica considerable, aunque menor que la del precursor de cobre libre.

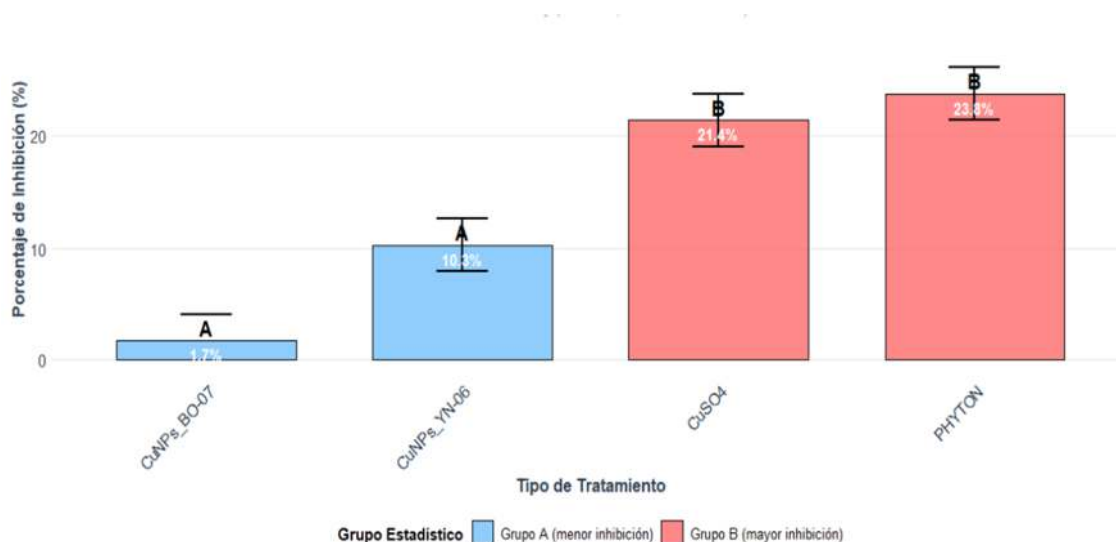
El control mostró la mayor tasa de crecimiento micelial ($8,79 \text{ mm-día}^{-1}$), clasificándose en el grupo C, lo que confirma que todos los tratamientos evaluados ejercieron algún grado de inhibición sobre el crecimiento del patógeno.

Análisis del Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial

El análisis del porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) proporcionó una perspectiva complementaria y más directa sobre la efectividad antifúngica de los tratamientos evaluados. Los resultados mostraron un panorama estadístico altamente significativo ($F = 14,94$; $p = 0,0012$), con un coeficiente de variación del 27,04%, el cual, aunque mayor que el observado en las tasas de crecimiento, permanece dentro de rangos aceptables para este tipo de estudios.

Figura 3.10

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de M. roreri tratamiento



Nota. CuSO₄ (21,39%) y PHYTON (23,78%) formaron el grupo B con mayor inhibición, mientras que CuNPs_YN-06 (10,28%) y CuNPs_BO-07 (1,67%) se clasificaron en el grupo A con menor efectividad según Tukey ($p < 0,05$).

La prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$; DMS = 10,61865) reveló una clara diferenciación entre los tratamientos, estableciendo dos grupos principales de efectividad. Los tratamientos más efectivos, CuSO₄ y PHYTON, se agruparon en el grupo B con porcentajes de inhibición del 21,39%

y 23,78% respectivamente. Estos valores demuestran que tanto el precursor de cobre como el fungicida comercial ejercen un efecto inhibitorio considerable sobre el crecimiento micelial de *M. royeri*, reduciendo el crecimiento del patógeno comparado con el control.

Es particularmente notable que ambos tratamientos con base de cobre alcanzaron niveles de inhibición estadísticamente equivalentes, lo que refuerza la hipótesis de que el mecanismo de acción principal involucra directamente al ion cobre. Esta similitud en la efectividad sugiere que el sulfato de cobre pentahidratado utilizado como precursor mantiene un potencial antifúngico equiparable al del fungicida comercial PHYTON, lo que tiene implicaciones importantes para el desarrollo de formulaciones alternativas más económicas.

Por otro lado, las nanopartículas biosintetizadas CuNPs_BO-07 y CuNPs_YN-06 formaron el grupo A, caracterizado por porcentajes de inhibición significativamente menores: 1,67% y 10,28% respectivamente. Estos resultados revelan una diferencia notable en la efectividad antifúngica entre las dos formulaciones de nanopartículas, donde CuNPs_YN-06 mostró un efecto inhibitorio moderado, mientras que CuNPs_BO-07 presentó una actividad mínima.

La evaluación conjunta de ambos parámetros (tasa de crecimiento y porcentaje de inhibición) permite una comprensión más profunda de los mecanismos de acción antifúngica. Mientras que la tasa de crecimiento proporciona información sobre la velocidad de desarrollo del patógeno, el porcentaje de inhibición ofrece una medida directa de la efectividad relativa de cada tratamiento.

La aparente discrepancia entre los dos parámetros para las nanopartículas biosintetizadas resulta particularmente instructiva. En el análisis de tasas de crecimiento, ambas formulaciones de nanopartículas se clasificaron en el mismo grupo estadístico (B), sugiriendo efectos similares sobre la velocidad de crecimiento. Sin embargo, el análisis de porcentajes de inhibición reveló diferencias más marcadas entre CuNPs_YN-06 y CuNPs_BO-07, indicando que el efecto inhibitorio final puede ser más sensible a las características específicas de cada formulación.

Esta diferenciación sugiere que las nanopartículas CuNPs_YN-06 poseen características que las hacen más efectivas para inhibir el crecimiento micelial, posiblemente relacionadas con

propiedades fisicoquímicas como tamaño de partícula, superficie específica. La menor efectividad de CuNPs_BO-07 podría estar relacionada con diferencias en la estabilidad de las nanopartículas, la velocidad de liberación del ion cobre, o interacciones con componentes del medio de cultivo.

Los estudios de Consolo et al. (2020) y Sanguiñedo et al. (2023) emplearon metodologías diferentes para evaluar la actividad antifúngica de nanopartículas de cobre, lo que proporciona una perspectiva valiosa sobre la variabilidad de enfoques experimentales en este campo de investigación.

Consolo et al. (2020) utilizaron una metodología de medio enmendado similar a la empleada en este estudio, incorporando nanopartículas directamente en el medio de cultivo PDA a concentraciones de 5, 10 y 20 ppm. Su evaluación se centró en el crecimiento radial del micelio durante 7 días a temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Esta metodología permitió observar efectos inhibitorios significativos y dependientes de la dosis, demostrando que tanto las nanopartículas de plata como las de CuO redujeron significativamente el crecimiento micelial de *Alternaria alternata* y *Pyricularia oryzae*.

En contraste, Sanguiñedo et al. (2023) emplearon un enfoque metodológico dual que incluía tanto la técnica de microdilución para hongos esporulados como la evaluación en medio sólido para especies no esporuladas. Para *Fusarium graminearum* y *Pyricularia oryzae*, utilizaron la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) en medio RPMI con suspensiones de esporas (1×10^4 esporas·mL⁻¹), mientras que para *Sclerotium oryzae* y *Rhizoctonia oryzae-sativae* emplearon plugs de micelio en medio PDA enmendado.

Los resultados de Sanguiñedo et al. (2023) mostraron que las nanopartículas de CuO tuvieron una CMI de 6.3 μM contra *Pyricularia oryzae*, mientras que no mostraron inhibición contra *Fusarium graminearum* a las concentraciones evaluadas. En el ensayo de crecimiento micelial, observaron 22% de inhibición de *Rhizoctonia oryzae-sativae* y 5% de inhibición de *Sclerotium oryzae* utilizando 50 μM de CuONPs.

Comparando los resultados de Sanguiñedo et al. (2023) con los hallados en este estudio de 10.28% de inhibición con CuNPs_YN-06 y 1.67% con CuNPs_BO-07, es evidente que existen

diferencias significativas en la efectividad antifúngica. Estas variaciones pueden atribuirse a múltiples factores metodológicos que merecen análisis detallado.

Factores Metodológicos que Influyen en la Actividad Antifúngica

La diferencia en los resultados obtenidos entre estudios puede explicarse por varios factores metodológicos críticos. Primero, las condiciones de síntesis de las nanopartículas influyen directamente en sus propiedades fisicoquímicas y, por ende, en su actividad biológica. Consolo et al. (2020) sintetizaron nanopartículas de CuO con morfología fibrosa y elongada, mientras que Sanguineto et al. (2023) obtuvieron nanopartículas predominantemente esféricas. Estas diferencias morfológicas pueden resultar en variaciones en la superficie específica, la capacidad de penetración celular y los mecanismos de liberación de iones metálicos.

Segundo, las condiciones de incubación y evaluación también difieren entre estudios. En este estudio se empleó temperaturas de 28-30°C durante 6 días, mientras que Consolo et al. (2020) utilizaron 24±2°C durante 7 días, y Sanguineto et al. (2023) emplearon 28°C durante periodos variables según el ensayo específico. Estas diferencias térmicas pueden influir tanto en la actividad metabólica del patógeno como en la cinética de liberación de iones desde las nanopartículas.

Un aspecto crítico que emerge de la comparación metodológica es la importancia de la caracterización completa de las nanopartículas evaluadas. Los estudios revisados muestran que nanopartículas nominalmente similares (nanopartículas de cobre u óxido de cobre) pueden exhibir propiedades muy diferentes dependiendo del método de síntesis, el organismo productor y las condiciones de reacción.

En este estudio, donde el sulfato de cobre libre mostró mayor actividad que las nanopartículas biosintetizadas, contrastan con algunos hallazgos de Sanguineto et al. (2023), quienes reportaron que las nanopartículas fueron más efectivas que las sales precursoras. Esta divergencia sugiere que la efectividad relativa puede depender tanto del patógeno objetivo como de las características específicas de las nanopartículas evaluadas.

La variabilidad metodológica observada entre estudios resalta la necesidad de desarrollar protocolos estandarizados para la evaluación de nanopartículas antifúngicas. Estos protocolos deberían incluir parámetros claramente definidos para la síntesis, purificación, caracterización y evaluación biológica de las nanopartículas.

Protocolo Estandarizado para la Biosíntesis y Evaluación Antifúngica de Nanopartículas de Cobre

El protocolo desarrollado combina tres metodologías reconocidas para crear un proceso confiable de biosíntesis de nanopartículas de cobre usando hongos *Trichoderma* nativos. La estructura sigue el formato modular de Protocols.io, organizando el trabajo en cinco etapas conectadas que otros investigadores pueden adaptar fácilmente. Cada etapa incluye controles de calidad específicos basados en estándares ISO 17025, con mediciones precisas y márgenes de error claramente definidos para asegurar que los resultados sean reproducibles en cualquier laboratorio.

La síntesis se optimizó usando técnicas estadísticas de Diseño de Experimentos, probando sistemáticamente diferentes combinaciones de pH, temperatura y concentración de cobre para encontrar las condiciones que producen las mejores nanopartículas. Este enfoque redujo significativamente el número de experimentos necesarios comparado con métodos tradicionales de prueba y error. El protocolo documenta cada paso con suficiente detalle para permitir que otros laboratorios repliquen exactamente el proceso, desde la preparación inicial de los hongos hasta la caracterización final de las nanopartículas.

Esta metodología integrada convierte un proceso experimental básico en un sistema robusto que puede aplicarse industrialmente y adaptarse para sintetizar otros tipos de nanopartículas metálicas, estableciendo un modelo para futuras investigaciones en nanotecnología verde aplicada al control de enfermedades de plantas.

Figura 3.11

Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con *Trichoderma* spp.: preparación del material biológico

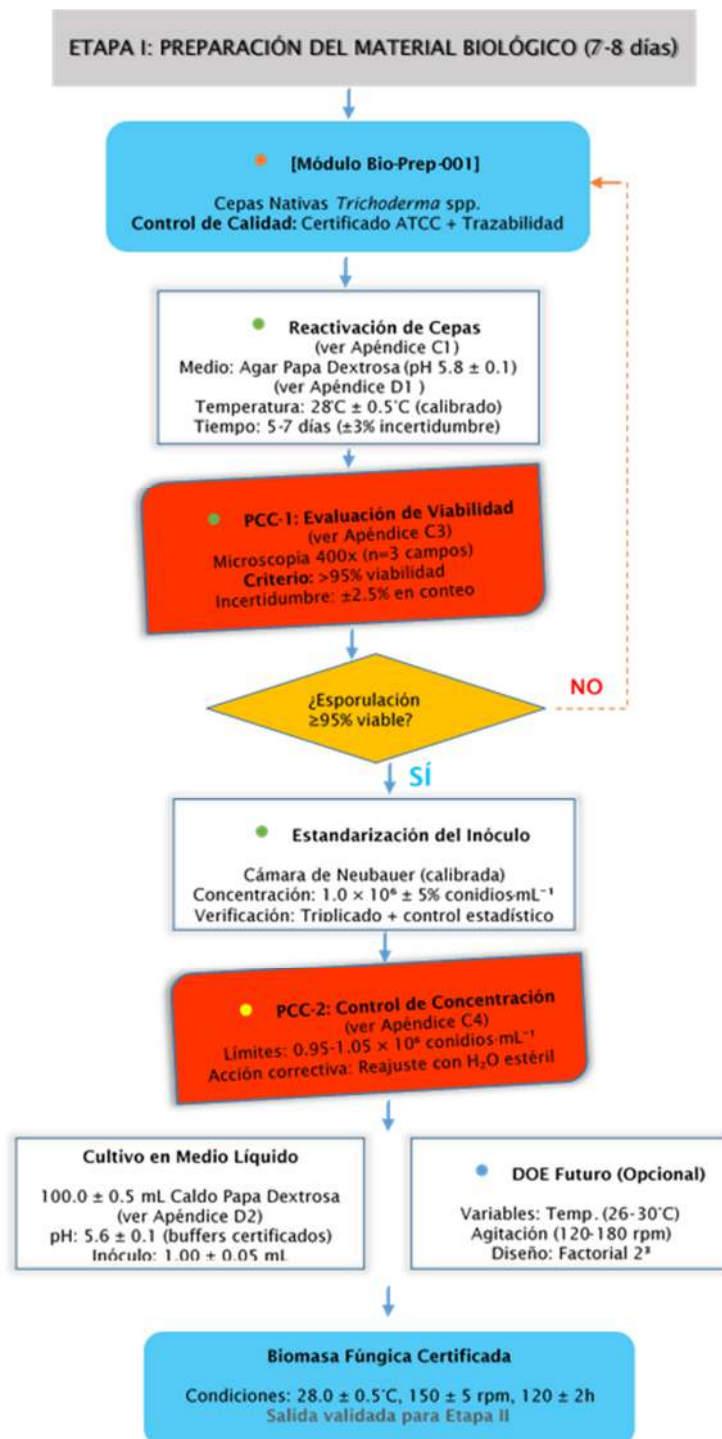


Figura 3.12

Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con *Trichoderma* spp.: obtención de filtrados extracelulares

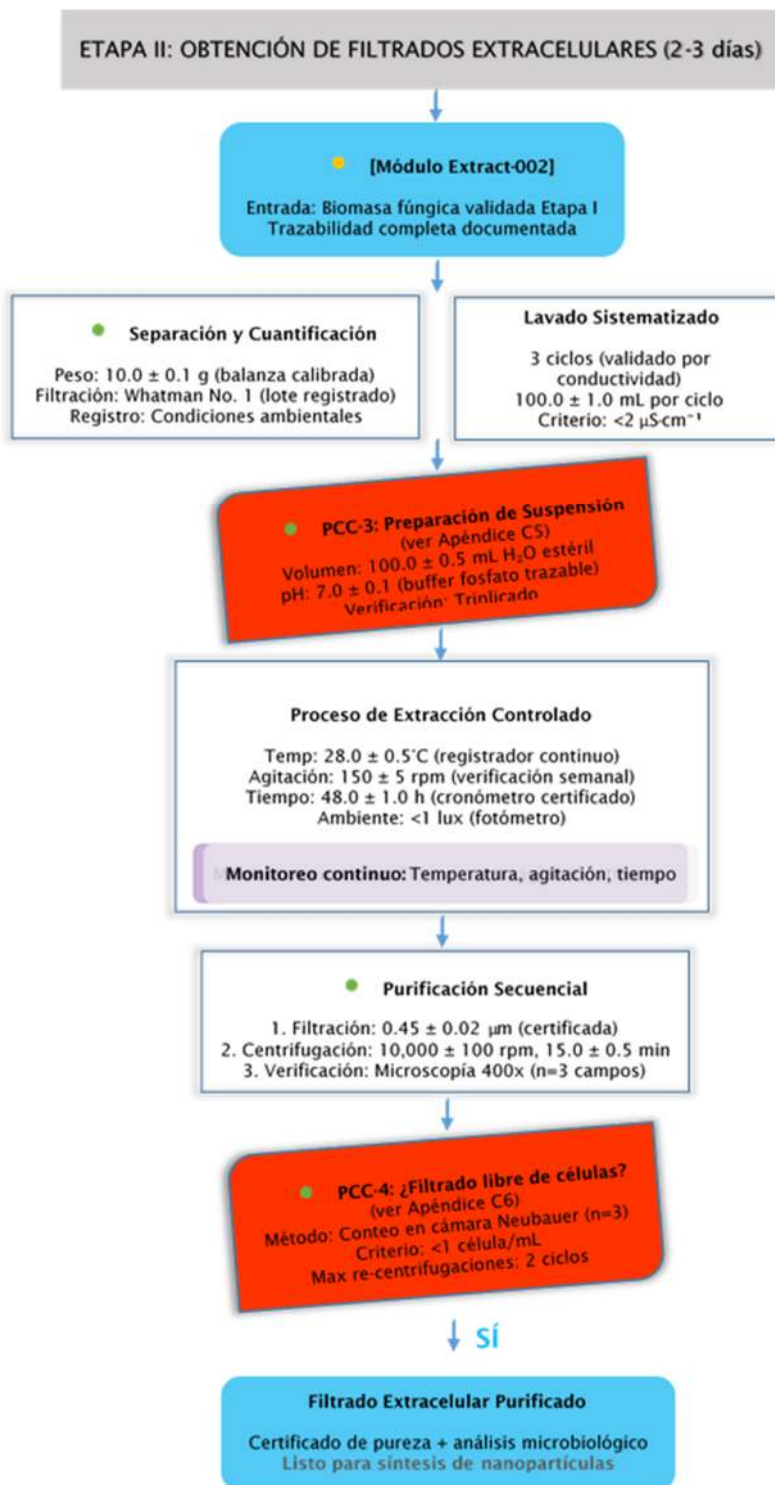


Figura 3.13

Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con Trichoderma spp.: síntesis de nanopartículas

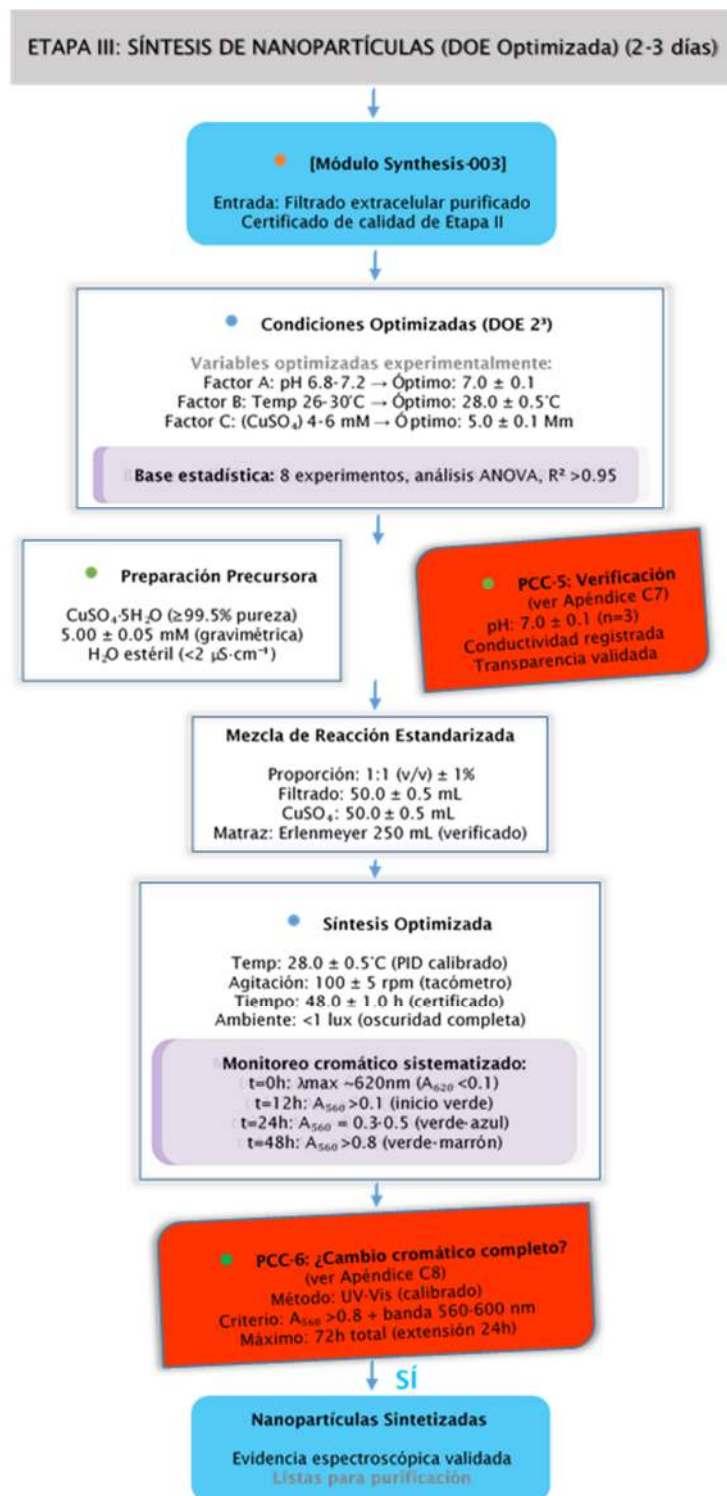


Figura 3.14

Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con Trichoderma spp.: purificación y almacenamiento

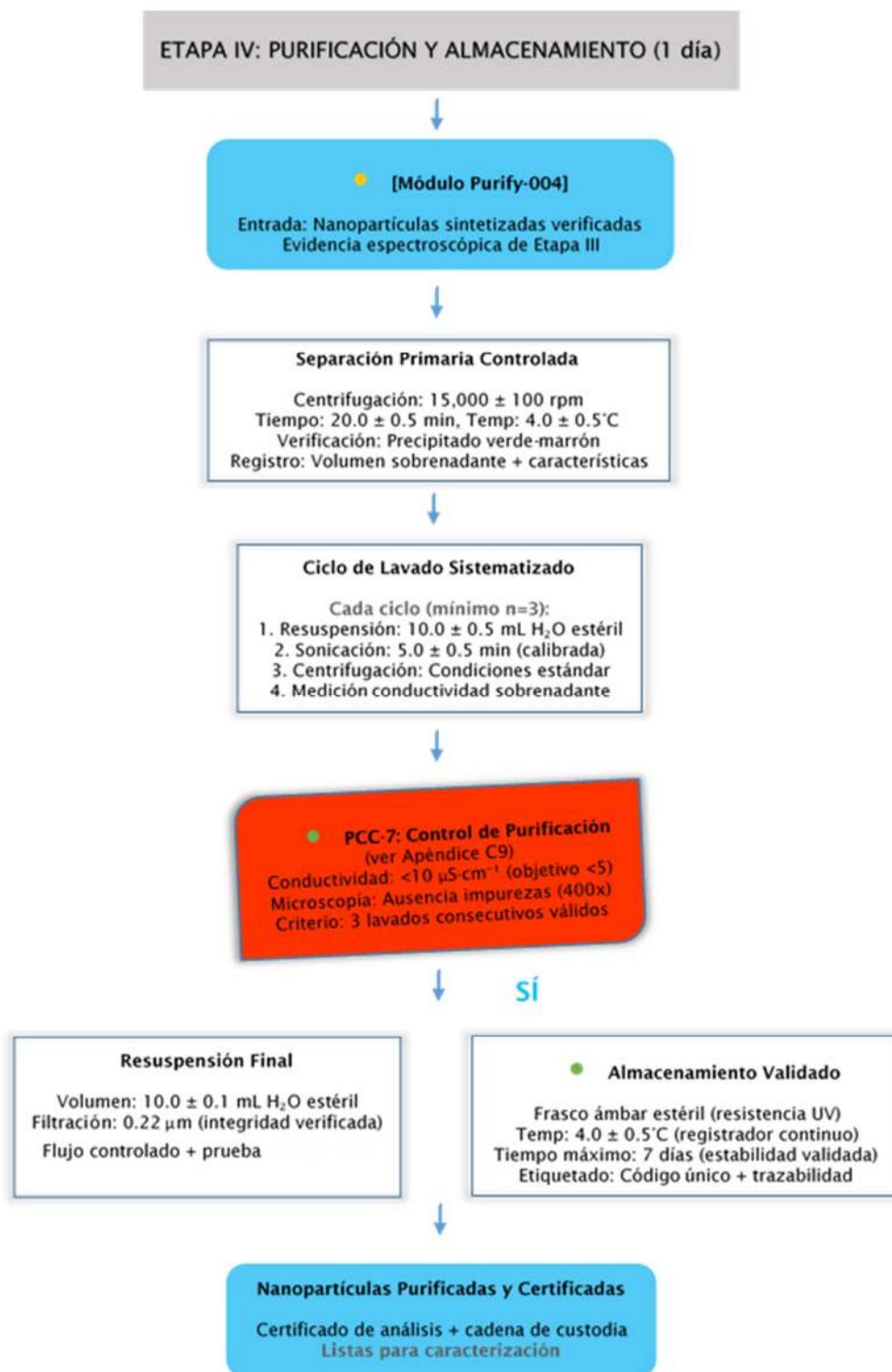
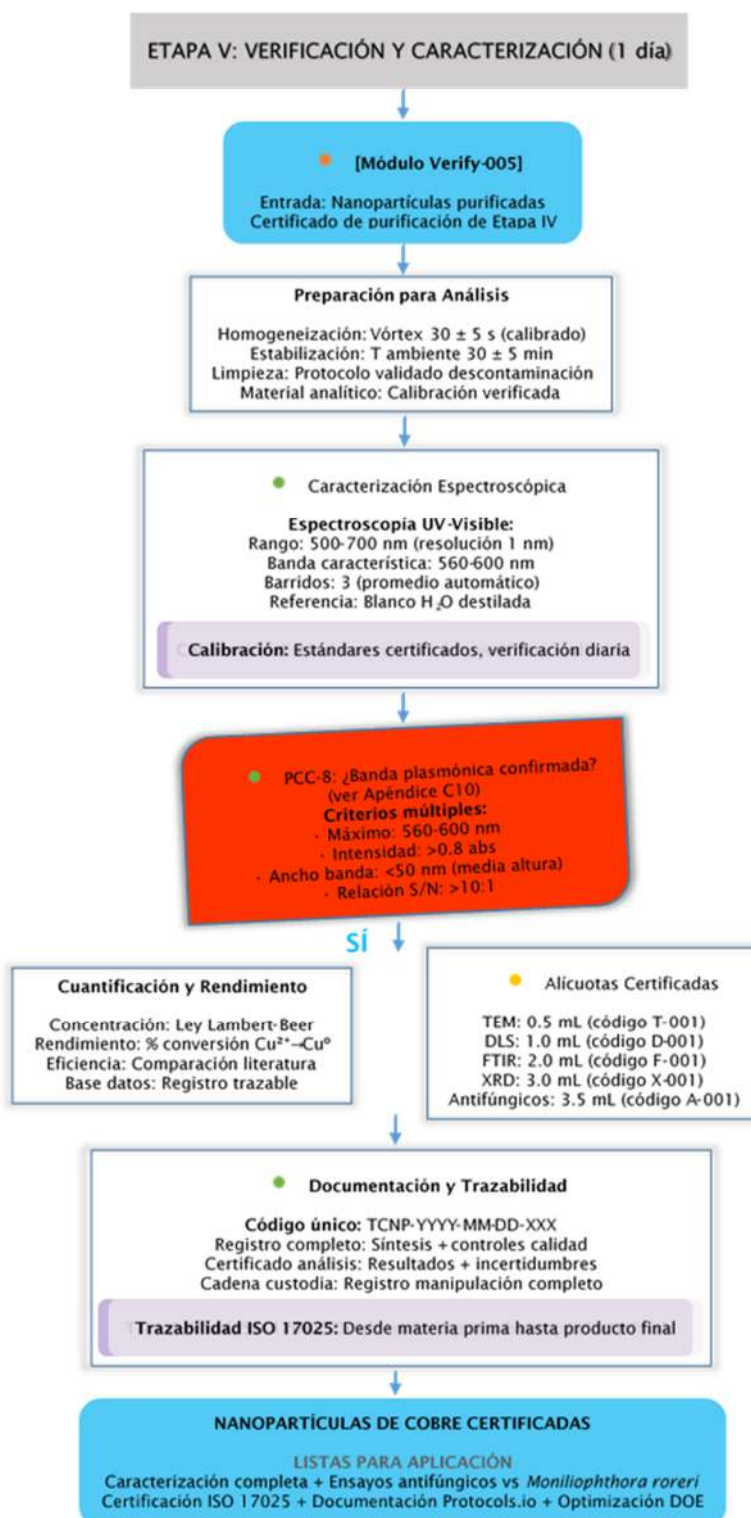


Figura 3.15

Protocolo de biosíntesis de nanopartículas de cobre con *Trichoderma* spp.: verificación preliminar



Capítulo 4

Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

- Se aislaron dos cepas de *Trichoderma* spp. (YN-06 y BO-07) de suelos rizosféricos de cacao en Orellana y una cepa de *Moniliophthora roreri* de mazorcas infectadas. Las cepas de *Trichoderma* exhibieron crecimiento rápido (33,28 y 33,03 mm·día⁻¹), micelio blanco-verde, conidióforos dendríticos y conidios elipsoides. *M. roreri* mostró crecimiento radial (8,74 mm·día⁻¹), micelio blanco-cremoso con zonación concéntrica y cadenas basipetales de esporas globosas, confirmando la identificación fenotípica de los aislados.
- Se biosintetizaron nanopartículas de cobre utilizando metabolitos extracelulares de *Trichoderma*, confirmado por el cambio cromático amarillento a verde-marrón en 24-48 horas con CuSO₄ (5 mM) y espectroscopía UV-Visible con picos de absorción a 590 nm (absorbancia 0,94-0,95), correspondientes a la resonancia de plasmón superficial del cobre metálico nanoestructurado.
- Se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de las nanopartículas de cobre contra *Moniliophthora roreri*, obteniendo inhibición del crecimiento micelial de 10,28% (CuNPs_YN-06) y 1,67% (CuNPs_BO-07), inferior al CuSO₄ (21,39%) y fungicida comercial (PHYTON) (23,78%).
- Se desarrolló un protocolo estandarizado de cinco etapas para la biosíntesis y evaluación antifúngica de nanopartículas de cobre (13-16 días), incorporando puntos de control crítico y controles de calidad.

Recomendaciones

- Completar la caracterización fisicoquímica de las nanopartículas mediante microscopía electrónica (SEM/TEM), dispersión dinámica de luz (DLS), potencial zeta y difracción de rayos X (XRD) para correlacionar propiedades estructurales con actividad biológica.
- Desarrollar métodos de cuantificación precisa de nanopartículas mediante técnicas espectrofotométricas estandarizadas, estableciendo curvas de calibración para estudios dosis-respuesta rigurosos.
- Optimizar condiciones de biosíntesis evaluando variaciones de pH, temperatura, tiempo de reacción para maximizar eficiencia de síntesis y actividad antimicrobiana.
- Evaluar estrategias de control combinadas incluyendo modificación de nanopartículas con agentes penetrantes, encapsulación en sistemas de liberación controlada y combinación con fungicidas convencionales.
- Desarrollar estudios de estabilidad temporal, biocompatibilidad e impacto ambiental de las nanopartículas biosintetizadas para determinar viabilidad de aplicación comercial en el manejo integrado de la moniliasis.

Referencias

- Abdelhai, M. F., Shabaan, R. H., Kamal, N. M., Elemery, E. A., Abd-Elhalim, B. T., & Hassan, E. A. (2024). Copper nanoparticles biosynthesis by *Stevia rebaudiana* extract: biocompatibility and antimicrobial application. *AMB Express*, 14(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13568-024-01707-2/TABLES/4>
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Sisodia, R., Shakil, N. A., & Walia, S. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles by *Trichoderma harzianum* and their bio-efficacy evaluation against *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumonia*. *Industrial Crops and Products*, 55, 202–206. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2014.01.026>
- Alfenas, A. C., & Mafia, R. G. (2016). *Métodos em Fitopatología* (2a edición).
- Alghuthaymi, M. A., Abd-Elsalam, K. A., Abodalam, H. M., Ahmed, F. K., Ravichandran, M., Kalia, A., & Rai, M. (2022). Trichoderma: An Eco-Friendly Source of Nanomaterials for Sustainable Agroecosystems. In *Journal of Fungi* (Vol. 8, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof8040367>
- Bailey, B. A., Evans, H. C., Phillips-Mora, W., Ali, S. S., & Meinhardt, L. W. (2018). Moniliophthora roreri, causal agent of cacao frosty pod rot. *Molecular Plant Pathology*, 19(7), 1580–1594. <https://doi.org/10.1111/mpp.12648>
- Banco Central del Ecuador. (2025). *Balanza Comercial por Productos Enero - Abril 2025*. https://contenido.bce.fin.ec/documentos/informacioneconomica/SectorExterno/ix_ComercioExterior.html
- Bissett, J. (1991). *A revision of the genus Trichoderma. II. Infrageneric classification* (Vol. 19). www.nrcresearchpress.com
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (2017). *Microbiology: A Laboratory Manual* (11th Edition). Pearson Education. https://tga.blv.ifmt.edu.br/media/filer_public
- Castellani, A. (1968). Long term maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. *Commentarii*, 2(17), 1–8.

- Chaverri, P., & Samuels, G. J. (2003). *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores.
- Consolo, V. F., Torres-Nicolini, A., & Alvarez, V. A. (2020). Mycosinthesized Ag, CuO and ZnO nanoparticles from a promising *Trichoderma harzianum* strain and their antifungal potential against important phytopathogens. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77294-6>
- Correa Álvarez, J., Castro Martínez, S., & Coy, J. (2014). *Estado de la moniliasis del cacao causada por Moniliophthora roreri en Colombia*.
- Cuervo-Parra, J. A., Sánchez-López, V., Ramírez-Suero, M., & Ramírez-Lepe, M. (2011). Morphological and Molecular Characterization of *Moniliophthora roreri* Causal Agent of Frosty Pod Rot of Cocoa Tree in Tabasco, Mexico. *Plant Pathology Journal*, 10(3), 122–127. <https://doi.org/10.3923/ppj.2011.122.127>
- Decloquement, J., Ramos-Sobrinho, R., Elias, S. G., Britto, D. S., Puig, A. S., Reis, A., da Silva, R. A. F., Honorato-Júnior, J., Luz, E. D. M. N., Pinho, D. B., & Marelli, J. P. (2021). *Phytophthora theobromicola* sp. nov.: A New Species Causing Black Pod Disease on Cacao in Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.537399>
- Díaz-Valderrama, J. R., Zambrano, R., Cedeño-Amador, S., Córdova-Bermejo, U., Casas, G. G., García-Zurita, N., Sánchez-Arévalo, J. A. J., Arévalo-Gardini, E., Dávila, D., Ruiz, J., Pinchi-Dávila, X., Quispe-Chacón, Z. R., Chia-Wong, J. A., Hurtado-Gonzales, O. P., Rodríguez-Callañaupa, C. A., Maldonado-Fuentes, C., Pérez-Callizaya, E., Leiva-Espinoza, S., Oliva-Cruz, M., ... Aime, M. C. (2022). Diversity in the invasive cacao pathogen *Moniliophthora roreri* is shaped by agriculture. *Plant Pathology*, 71(8), 1721–1734. <https://doi.org/10.1111/ppa.13603>
- Druzhinina, I. S., Kopchinskiy, A. G., Komo, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C. P. (2005). An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fungal Genetics and Biology*, 42(10), 813–828. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.007>

- Elamawi, R. M., Al-Harbi, R. E., & Hendi, A. A. (2018). Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Trichoderma longibrachiatum* and their effect on phytopathogenic fungi. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0028-1>
- Evans, H. C., Stalpers, J. A., Samson, R. A., & Benny, G. L. (1978). On the taxonomy of *Monilia roreri*, an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America. *Canadian Journal of Botany*, 56(20), 2528–2532. <https://doi.org/10.1139/b78-305>
- Giraldo, A., Gené, J., Sutton, D. A., Madrid, H., de Hoog, G. S., Cano, J., Decock, C., Crous, P. W., & Guarro, J. (2015). Phylogeny of *Sarocladium* (Hypocreales). *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34, 10–24. <https://doi.org/10.3767/003158515X685364>
- Guilger-Casagrande, M., & Lima, R. de. (2019). Synthesis of Silver Nanoparticles Mediated by Fungi: A Review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 486092. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00287/XML>
- Hassan, E., Gahlan, A. A., & Gouda, G. A. (2023). Biosynthesis approach of copper nanoparticles, physicochemical characterization, cefixime wastewater treatment, and antibacterial activities. *BMC Chemistry*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s13065-023-00982-7>
- Jaimes, Y., & Aranzazu, F. (2010). *Manejo de las enfermedades del cacao (Theobroma cacao L) en Colombia, con énfasis en monilia (Moniliophthora roreri)*. Corporacion Colombiana de Investigacion Agropecuaria - Corpoica. <https://doi.org/10.21930/978-958-740-034-2>
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. In *Microorganisms* (Vol. 10, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (Blackwell Publishing, Ed.; Bullock, Suzanne). Oxford. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Lovato Echeverria, A. D., Gutiérrez, S. A., & Carmona, M. A. (2017). In vitro susceptibility of *Trichoconiella padwickii* to various active ingredients used as fungicides in the cultivation of

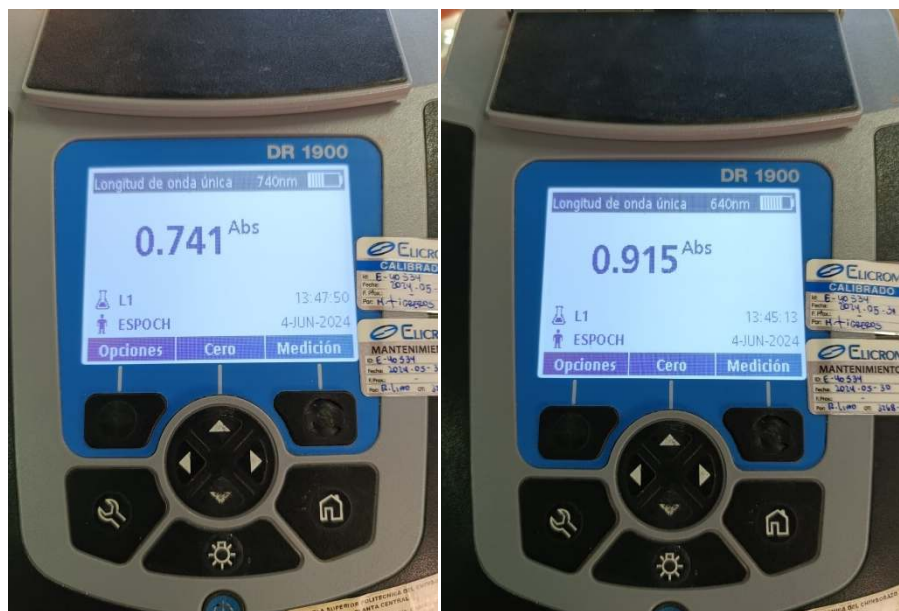
- rice. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(1), 70–74.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2016.11.002>
- Meinhardt, L. W., Costa, G. G. L., Thomazella, D. P. T., Teixeira, P. J. P. L., Carazzolle, M. F., Schuster, S. C., Carlson, J. E., Gultinan, M. J., Mieczkowski, P., Farmer, A., Ramaraj, T., Crozier, J., Davis, R. E., Shao, J., Melnick, R. L., Pereira, G. A. G., & Bailey, B. A. (2014). Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: Mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. *BMC Genomics*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-164>
- Meyer, M. C., Mazaro, S. M., & Da Silva, J. C. (2022). *Trichoderma: su uso en la agricultura* (Y. C. Colmenárez & C. L. Vásquez Freytez, Trans.; 1ª edición). Embrapa.
- Montilla Pacheco, A. de J., Mora Pisco, C. I., Durán Vasco, M. E., & Pastrán Calles, F. R. (2024). Contribución al estudio de la geografía climática del Ecuador continental. *CIENCIA UNEMI*, 17(44), 237–248. <https://doi.org/10.29076/issn.2528-7737vol17iss44.2024pp237-248p>
- Paredes Andrade, N., Monteros-Altamirano, Á., Lima Tandazo, L., Caicedo Vargas, C., Bastidas Muñoz, S., Tinoco Jaramillo, L., Fernández Anchundia, F., Vargas Tierras, Y., Pico Rosado, J., Subía García, C., Burbano Cachiguango, A., Chanaluz Choloquina, A., Sotomayor Akopyan, D., Díaz Martínez, A., Intriago Intriago, J., Chancosa, C., Andrade, A., & Enríquez, G. (2022). *MANUAL DEL CULTIVO DE CACAO SOSTENIBLE PARA LA AMAZONÍA ECUATORIANA*.
- Patel, B. H., Channiwala, M. Z., Chaudhari, S. B., & Mandot, A. A. (2016). Biosynthesis of copper nanoparticles; Its characterization and efficacy against human pathogenic bacterium. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 4(2), 2163–2169.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.03.046>
- Phillips-Mora, W., Aime, M. C., & Wilkinson, M. J. (2007). Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. *Plant Pathology*, 56(6), 911–922. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01646.x>

- Pico, J. T., Paredes, N. J., Subía, C. R., Suárez, C., Díaz, A. E., Chimbo, P. P., & Caicedo, C. E. (2019). *Dinámica Espacial de Esporas de Moniliophthora roreri (Cif & Par) en el Cultivo de Cacao (Theobroma cacao L.) en La Joya de Los Sachas*. 46–48.
- Ram, A. (1989). *BIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF MONILIASIS (MONILIOPHTHORA RQRERI) OF CACAO*. University of London.
- Ramírez-Valdespino, C. A., & Orrantia-Borunda, E. (2021). Trichoderma and Nanotechnology in Sustainable Agriculture: A Review. In *Frontiers in Fungal Biology* (Vol. 2). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.764675>
- Riddell, R. W. (1950). Permanent Stained Mycological Preparations Obtained by Slide Culture. *Mycologia*, 42(2), 265–270. <http://www.jstor.org/stable/3755439>
- Salvadori, M. R., Ando, R. A., Oller Do Nascimento, C. A., & Corrêa, B. (2014). Intracellular Biosynthesis and Removal of Copper Nanoparticles by Dead Biomass of Yeast Isolated from the Wastewater of a Mine in the Brazilian Amazonia. *PLOS ONE*, 9(1), e87968. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0087968>
- Samuels, G. J. (1996). Trichoderma: A review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research*, 100(8), 923–935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
- Samuels, G. J. (2006). Trichoderma: Systematics, the sexual state, and ecology. *Phytopathology*, 96(2), 195–206. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0195>
- Sanguinèdo, P., Faccio, R., Abreo, E., & Alborés, S. (2023). Biogenic Silver and Copper Nanoparticles: Potential Antifungal Agents in Rice and Wheat Crops. *Chemistry (Switzerland)*, 5(4), 2104–2119. <https://doi.org/10.3390/chemistry5040143>
- Saravanakumar, K., Shanmugam, S., Varukattu, N. B., MubarakAli, D., Kathiresan, K., & Wang, M. H. (2019). Biosynthesis and characterization of copper oxide nanoparticles from indigenous fungi and its effect of photothermolysis on human lung carcinoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 190, 103–109. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.11.017>

- Shard, A. G., Schofield, R. C., & Minelli, C. (2020). Ultraviolet-visible spectrophotometry. *Characterization of Nanoparticles: Measurement Processes for Nanoparticles*, 185–196. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00012-2>
- Solis Hidalgo, K., Peñaherrera Villafuerte, S., Vera Coello, D., Yáñez Altuna, J. M., & Ortega López, L. D. (2021). *LAS ENFERMEDADES DEL CACAO Y LAS BUENAS PRÁCTICAS AGRONÓMICAS PARA SU MANEJO*. www.iniap.gob.ec
- Tomah, A. A., Zhang, Z., Alamer, I. S. A., Khattak, A. A., Ahmed, T., Hu, M., Wang, D., Xu, L., Li, B., & Wang, Y. (2023). The Potential of Trichoderma-Mediated Nanotechnology Application in Sustainable Development Scopes. In *Nanomaterials* (Vol. 13, Issue 17). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/nano13172475>
- Vahabi, K., & Dorcheh, S. K. (2014). Biosynthesis of Silver Nano-Particles by Trichoderma and Its Medical Applications. In *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 393–404). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59576-8.00029-1>

Apéndice A

Análisis espectrofotométrico UV-visible de nanopartículas de cobre a diferentes longitudes de onda



Apéndice B

Evaluación de la actividad antifúngica de nanopartículas de cobre contra *Moniliophthora roreri*

Apéndice C

Formularios de Registro

C 1. Registro de condiciones ambientales:

Código: Form-AMB-001

Versión: 01

Fecha:

Técnico:

MEDICIONES INICIALES:

Temperatura:°C Humedad:%

Presión atmosférica: hPa

Luminosidad:lux

Verificación final:

- ☐ Condiciones dentro de especificación
- ☐ Desviaciones registradas y justificadas
- ☐ Equipo funcionando correctamente

Firma del técnico:

Revisado por: Fecha:

C 2. Reactivación de cepas fúngicas

Código: Form-REACT-001

Versión: 01

Fecha inicio: Fecha fin:

Información cepa:

Código cepa:

Origen:

Fecha de último subcultivo:

Condición almacenamiento:

Proceso de reactivación:

Medio utilizado: PDA (Agar Papa Dextrosa)

pH inicial: pH ajustado: 5.8 ± 0.1 Temperatura incubación: $28.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$

Tiempo incubación:días

Observaciones diarias:

Día 1:

Día 2:

Día 3:

Día 4:

Día 5:

Evaluación final:Crecimiento: ☐ Excelente ☐ Bueno ☐ Regular ☐ DeficienteContaminación: ☐ Ausente ☐ Presente (describir):

Viabilidad estimada:%

Decisión:☐ Aprobado para uso☐ Requiere nuevo subcultivo☐ Descartar cepa

Técnico responsable: Firma:

Supervisado por: Fecha:

C 3. Punto crítico de control - viabilidad celular

Código: PCC-001-REG

Versión: 01

Proceso: Evaluación viabilidad

Fecha:

Parámetros críticos:

- Límite mínimo viabilidad: 95%
- Límite máximo agregación: 20%
- Método: Microscopía 400x

Mediciones:

Campo 1: Células viables / Total

Campo 2: Células viables / Total

Campo 3: Células viables / Total

Cálculos:

Viabilidad promedio:%

Agregación observada:%

Desviación estándar:%

Evaluación:☐ CONFORME - Continuar proceso☐ NO CONFORME - Acción correctiva requerida**Acción correctiva (si aplica):**

Descripción:

Tiempo implementación:

Responsable:

Verificación:

Analista: Firma:

Supervisor: Fecha verificación:

C 4. Punto crítico de control - concentración inóculo

Código: PCC-002-REG

Versión: 1.0

Proceso: Estandarización inóculo

Fecha:

Parámetros críticos:

- Concentración objetivo: 1.0×10^6 conidios/mL
- Límites aceptables: $0.95-1.05 \times 10^6$ conidios/mL
- Método: Conteo cámara Neubauer
- Equipo: Microscopio Eq-008 + Cámara Eq-012

Preparación muestra:

- Dilución inicial: 1:10 en agua estéril
- Volumen aplicado: 10 μ L por cuadrante
- Tiempo sedimentación: 3 min
- Magnificación: 400x

Conteo sistemático:

Cuadrante 1: conidios

Cuadrante 2: conidios

Cuadrante 3: conidios

Cuadrante 4: conidios

Cuadrante 5: conidios

Cálculos:

Promedio de cuadrantes: conidios

Factor dilución: 10

Factor cámara: 10^4 Concentración = Promedio $\times 10 \times 10^4 =$ conidios/mL**Evaluación:**Concentración obtenida: $\times 10^6$ conidios/mLDesviación estándar: $\times 10^6$

Coefficiente variación: %

☐ CONFORME ($0.95-1.05 \times 10^6$) - Continuar proceso

☐ NO CONFORME - Requiere ajuste

Acción correctiva (si no conforme):

Si concentración ALTA: Agregar mL agua estéril

Si concentración BAJA: Concentrar por centrifugación

Tiempo máximo corrección: 2 h

Re-cuento obligatorio post-corrección

Verificación post-corrección:

Nueva concentración: $\times 10^6$ conidios/mL

☐ Conforme ☐ Requiere nueva corrección

Analista: Firma:

Supervisor: Fecha verificación:

C 5. Punto crítico de control - pureza suspensión

Código: PCC-003-REG

Versión: 1.0

Proceso: Preparación suspensión de biomasa

Fecha:

Parámetros críticos:

- Límite máximo: $2.0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
- Objetivo óptimo: $<1.5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
- Método: Conductimetría directa
- Equipo: Conductímetro Eq-005 (calibrado diario)

Preparación medición:

- Muestra: 50 mL sobrenadante final lavado
- Temperatura: °C (registrar para corrección)
- Tiempo estabilización: 2 min
- Agitación previa: Suave (evitar burbujas)

Mediciones:Lectura 1: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ Lectura 2: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ Lectura 3: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ Promedio: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ Desviación estándar: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ **Corrección temperatura (si $\neq 25^\circ\text{C}$):**Conductividad corregida: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

Factor corrección aplicado:

Evaluación:

- ☐ CONFORME ($<2.0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) - Continuar proceso
- ☐ NO CONFORME ($\geq 2.0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) - Acción correctiva

Acción correctiva (si no conforme):

Tipo corrección: ☐ Lavado adicional ☐ Re-centrifugación

Volumen agua lavado: mL

Tiempo centrifugación: min a rpm

Tiempo implementación: (máximo 1 h)

Verificación post-corrección:

Nueva conductividad: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

☐ Conforme ☐ Requiere lavado adicional

Número total lavados:

Observaciones:

Aspecto visual biomasa:

Color sobrenadante:

Presencia espuma: ☐ Sí ☐ No

Técnico responsable: Firma:

Supervisado por: Fecha:

C 6. Punto crítico de control - ausencia células filtrado

Código: PCC-004-REG

Versión: 1.0

Proceso: Verificación filtrado extracelular

Fecha:

Parámetros críticos:

- Límite máximo: 1 célula/mL
- Método: Conteo microscópico directo
- Equipo: Microscopio Eq-008 + Cámara Neubauer Eq-012
- Magnificación: 400x

Preparación muestra:

- Volumen filtrado analizar: 1.0 mL
- Homogeneización: Vórtex 10 s suave
- Tiempo sedimentación: 2 min
- Aplicación cámara: 10 µL sin dilución

Conteo microscópico:

Búsqueda sistemática: 25 cuadrantes centrales

Células/fragmentos identificados:

Cuadrante A1-A5: células

Cuadrante B1-B5: células

Cuadrante C1-C5: células

Cuadrante D1-D5: células

Cuadrante E1-E5: células

Identificación morfológica:

- ☐ Conidios Trichoderma
- ☐ Hifas fragmentadas
- ☐ Células levaduriformes
- ☐ Material particulado
- ☐ Contaminantes bacterianos

Cálculo concentración:

Total células contadas:

Volumen contado: 0.1 µL (25 cuadrantes)

Concentración = $(\text{Total}/0.1) \times 1000 = \dots\dots\dots$ células/mL

Evaluación:

- ☐ CONFORME (<1 célula/mL) - Continuar proceso
- ☐ NO CONFORME (≥ 1 célula/mL) - Acción correctiva

Verificación turbidez:

Absorbancia 600 nm:, (límite <0.01)

☐ Conforme absorbancia ☐ No conforme

Acción correctiva (si no conforme):

Tipo corrección: ☐ Re-centrifugación ☐ Re-filtración

Condiciones centrifugación: rpm × min

Tipo filtro: µm

Tiempo máximo corrección: 4 horas

Ciclo corrección:

☐ Primer ciclo ☐ Segundo ciclo ☐ Máximo alcanzado

Si persiste no conformidad: Descartar lote

Verificación post-corrección:

Nuevas células/mL:

Nueva absorbancia 600nm:

☐ Conforme ☐ Descarte necesario

Analista: Firma:

Supervisor: Fecha:

C 7. Punto crítico de control - verificación precursor

Código: PCC-005-REG

Versión: 1.0

Proceso: Preparación solución CuSO_4 Fecha:**Parámetros críticos:**

- pH objetivo: 7.0 ± 0.1
- Concentración: $5.00 \pm 0.05 \text{ mM CuSO}_4$
- Transparencia: $A_{600} < 0.05$
- Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$

Preparación solución:

- Reactivo: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Lote:
- Masa pesada: g (teórica: $1.2475 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)
- Volumen final: mL
- Agua calidad: Grado reactivo $< 2 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

Verificaciones físico-químicas:**1. Medición pH:**Calibración pHmetro: ☐ Verificada (3 puntos)

Lectura 1: pH

Lectura 2: pH

Lectura 3: pH

Promedio: pH

Desviación: pH

2. Conductividad:Conductímetro Eq-005: ☐ Calibrado diarioConductividad medida: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ Conductividad teórica: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (referencia)

Diferencia: %

3. Transparencia:

Espectrofotómetro: ☐ Calibrado (blanco H₂O)

Absorbancia 600 nm:

Criterio: <0.05 (ausencia partículas)

4. Temperatura:

Temperatura muestra: °C

☐ Dentro rango 23-27°C

Evaluación integral:

☐ pH CONFORME (6.9-7.1)

☐ Conductividad COHERENTE (±10% teórica)

☐ Transparencia CONFORME (<0.05)

☐ Temperatura ADECUADA (23-27°C)

Decisión:

☐ CONFORME - Proceder síntesis

☐ NO CONFORME - Acción correctiva

Acción correctiva (si no conforme):

pH fuera rango: ☐ Ajustar con HCl/NaOH 0.1M

Conductividad anómala: ☐ Verificar concentración

Turbidez presente: ☐ Filtrar 0.45 µm

Temperatura inadecuada: ☐ Acondicionar

Ajuste pH (si requerido):

pH inicial:

Reactivo adicionado: (HCl/NaOH)

Volumen agregado: µL

pH final:

Verificación post-corrección:

Nuevo pH:

Nueva conductividad: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

Nueva absorbancia:

☐ Todos parámetros conformes**Tiempo utilización:**

Preparado: h: min

Uso máximo: 8 h post-preparación

Almacenamiento: Frasco ámbar, temperatura ambiente

Técnico responsable: Firma:

Supervisado por: Fecha:

C 8. Punto crítico de control - cambio cromático síntesis

Código: PCC-006-REG

Versión: 1.0

Proceso: Monitoreo síntesis nanopartículas

Fecha:

Parámetros críticos:

- Absorbancia mínima: >0.8 a 560 nm
- Banda característica: 560-600 nm
- Tiempo máximo: 72 h
- Relación señal/ruido: >10:1

Condiciones síntesis:

- Código lote: TCNP-.....-.....
- Temperatura: °C (objetivo $28 \pm 0.5^\circ\text{C}$)
- Agitación: rpm (objetivo 100 ± 5 rpm)
- Oscuridad: ☐ Mantenido (<1 lux)
- Volumen reacción: mL

Monitoreo espectroscópico:**Tiempo 0 h (línea base):**

Absorbancia 560 nm: (<0.1 esperado)

Absorbancia 620 nm: (<0.1 esperado)

Color visual: (azul claro inicial)

Tiempo 12 h:

Absorbancia 560 nm:

Color observado: (inicio verde)

☐ Cambio detectado ☐ Sin cambio visible**Tiempo 24 h:**

Absorbancia 560 nm:

Absorbancia 620 nm:

Color observado: (verde-azul)

☐ Progreso normal ☐ Cambio lento

Tiempo 36 h:

Absorbancia 560 nm:

Color observado: (verde intenso)

Tiempo 48 h (crítico):

Absorbancia 560 nm:

Ancho banda (FWHM): nm

Máximo banda: nm (560-600 nm esperado)

Color final: (verde-marrón)

Evaluación 48 h:

- ☐ CONFORME ($A_{560} > 0.8$) - Proceso completado
- ☐ FRONTERIZO (A_{560} 0.6-0.8) - Extender tiempo
- ☐ NO CONFORME ($A_{560} < 0.6$) - Investigar problema

Extensión tiempo (si fronterizo):

TIEMPO 60 h:

Absorbancia 560 nm:

Incremento desde 48 h:

Tiempo 72 h (límite máximo):

Absorbancia 560 nm:

- ☐ Objetivo alcanzado (> 0.8)
- ☐ Proceso fallido (< 0.8)

Caracterización banda plasmónica:

Barrido espectral: 400-800 nm

Máximo principal: nm

Absorbancia máxima:

Ancho banda media altura: nm

Bandas secundarias: ☐ Ausentes ☐ Presentes

Relación señal/ruido:

Señal (A máximo):

Ruido (σ línea base):

S/N =

☐ Adecuada ($>10:1$) ☐ Insuficiente

Decisión final:

☐ SÍNTESIS EXITOSA - Proceder purificación

☐ SÍNTESIS INCOMPLETA - Extender 24 h más

☐ SÍNTESIS FALLIDA - Descartar lote

Causas posibles falla (si aplica):

☐ Temperatura inadecuada

☐ Agitación insuficiente

☐ Exposición luz

☐ Filtrado inactivo

☐ Precursor degradado

☐ Contaminación

Analista: Firma:

Supervisor: Fecha:

C 9. Punto crítico de control - purificación nanopartículas

Código: PCC-007-REG

Versión: 1.0

Proceso: Purificación y lavado NPs Fecha:

Parámetros críticos:

- Conductividad máxima: $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
- Objetivo óptimo: $<5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
- Mínimo de lavados: 3 consecutivos conformes
- Método: Conductimetría + microscopía

Secuencia lavados:

Lavado 1:

Volumen resuspensión: mL H₂O estéril

Sonicación: min (5.0 ± 0.5 min)

Centrifugación: rpm × min

Conductividad sobrenadante: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

☐ Conforme (<10) ☐ No conforme (≥ 10)

Lavado 2:

Volumen resuspensión: mL H₂O estéril

Sonicación: min

Centrifugación: rpm × min

Conductividad sobrenadante: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

☐ Conforme (<10) ☐ No conforme (≥ 10)

Lavado 3:

Volumen resuspensión: mL H₂O estéril

Conductividad sobrenadante: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

☐ Conforme (<10) ☐ No conforme (≥ 10)

Evaluación secuencia:

Número lavados conformes consecutivos:

☐ CRITERIO CUMPLIDO (≥ 3 consecutivos)

☐ REQUIERE LAVADOS ADICIONALES

Lavados adicionales (si requeridos):

Lavado 4:

Conductividad: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

☐ Conforme ☐ No conforme

Lavado 5:

Conductividad: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

☐ Conforme ☐ No conforme

LAVADO 6 (MÁXIMO):

Conductividad: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$

☐ Conforme ☐ Problema purificación

Verificación microscópica:

Magnificación: 400x (Microscopio Eq-008)

Muestra: Resuspensión final diluida 1:10

Observaciones campos:

Campo 1: ☐ Limpio ☐ Impurezas presentes

Campo 2: ☐ Limpio ☐ Impurezas presentes

Campo 3: ☐ Limpio ☐ Impurezas presentes

Tipos impurezas identificadas:

☐ Restos celulares

☐ Cristales sales

☐ Material orgánico

☐ Partículas extrañas

☐ Agregados excesivos

Evaluación final purificación:

☐ PURIFICACIÓN EXITOSA

- Conductividad: $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ (<10)
- Microscopía: Limpia
- Lavados totales:

☐ PURIFICACIÓN INSUFICIENTE

- Problema identificado:
- Acción tomada:

Características precipitado final:

Color: (verde-marrón esperado)

Consistencia: ☐ Polvo fino ☐ Agregado

Volumen aparente: mL

Resuspensión: ☐ Fácil ☐ Difícil

Tiempo total proceso:

Inicio purificación: h: min

Fin purificación: h: min

Tiempo total: h

☐ Dentro límite (<8h) ☐ Excedido

Técnico responsable: Firma:

Supervisado por: Fecha:

C 10. Punto crítico de control - banda plasmónica

Código: PCC-008-REG

Versión: 1.0

Proceso: Caracterización espectroscópica final

Fecha:

Parámetros críticos:

- Rango λ_{max} : 560-600 nm
- Intensidad mínima: >0.8 Abs
- Ancho banda: <50 nm (FWHM)
- Relación S/N: >10:1
- Repetibilidad: $n \geq 3$ mediciones

Preparación muestra:

Código muestra: TCNP-.....-.....-AN

Homogeneización: ☐ Vórtex 30 ± 5 s

Estabilización: ☐ 30 ± 5 min temperatura ambiente

Dilución: ☐ No requerida ☐ Factor:

Condiciones análisis:

- Espectrofotómetro: Eq-011 ☐ Calibrado
- Rango barrido: 400-800 nm
- Resolución: 1 nm
- Velocidad de barrido: Media
- Referencia: H₂O destilada
- Cubeta: Cuarzo 1 cm

Mediciones repetidas:

Medición 1:

λ_{max} observado:nm

Absorbancia máxima:

Ancho banda (FWHM): nm

Hora medición:

Medición 2:

λ_{max} observado: nm

Absorbancia máxima:

Ancho banda (FWHM): nm

Hora medición:

Medición 3:

λ_{max} observado: nm

Absorbancia máxima:

Ancho banda (FWHM): nm

Hora medición:

Estadísticas:

λ_{max} promedio: $\pm$ nm

Absorbancia promedio: $\pm$

FWHM promedio: $\pm$ nm

CV λ_{max} : % (<2.0% esperado)

CV Absorbancia: % (<5.0% esperado)

Evaluación criterios:

1. Posición banda:

☐ CONFORME (560-600 nm)

☐ NO CONFORME: nm

2. Intensidad:

☐ CONFORME (>0.8 Abs)

☐ NO CONFORME: Abs

3. Ancho banda:

☐ CONFORME (<50 nm FWHM)

☐ NO CONFORME: nm

4. Relación señal/ruido:

Señal (Abs máxima):

Ruido (σ 700-800 nm):

S/N =

☐ CONFORME (>10:1)

☐ NO CONFORME:

5. Reproducibilidad:

☐ CONFORME (CV <5%)

☐ NO CONFORME: CV %

Características espectrales adicionales:

Bandas secundarias:

☐ Ausentes (ideal)

☐ Presentes: nm (..... Abs)

Línea base:

☐ Estable y plana

☐ Deriva significativa

☐ Ruido excesivo

Forma banda:

☐ Gaussiana simétrica

☐ Asimétrica

☐ Múltiples máximos

Decisión final:

☐ CARACTERIZACIÓN EXITOSA - Producto aprobado

Todos criterios conformes

☐ CARACTERIZACIÓN MARGINAL - Revisión necesaria

Criterios específicos:

☐ CARACTERIZACIÓN FALLIDA - Producto rechazado

Problemas identificados:

CONCENTRACIÓN ESTIMADA:

Método: Ley Lambert-Beer

Coeficiente extinción: $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$

Concentración Cu: $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$

☐ Dentro rango esperado ($1\text{-}5\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)

Analista especialista: Firma:

Revisado por: Fecha:

Apéndice D

Especificaciones de medios de cultivos

D 1. Especificación técnica - Agar Papa Dextrosa (PDA)

Código: ESP-MED-001

Versión: 2.1

PDA deshidratado: BD Difco™ 213400

Preparación estándar comercial:

1. Suspender 39.0 g PDA Difco™ en 1000 mL agua destilada
2. Mezclar hasta disolución completa (agitación magnética)
3. Calentar hasta ebullición para disolver agar completamente
4. Ajustar pH a 5.6 ± 0.1 si necesario (raramente requerido)
5. Esterilizar en autoclave $121^{\circ}\text{C}/15$ min
6. Enfriar a $45\text{-}50^{\circ}\text{C}$ antes de verter placas
7. Almacenar placas invertidas máximo 4 semanas a 4°C

Controles calidad PDA:

- pH final: 5.6 ± 0.1 (pHmetro calibrado)
- Esterilidad: Incubación 48h/ 37°C sin crecimiento
- Consistencia agar: Firme sin exudación ni sinéresis
- Color: Amarillo claro característico
- Transparencia: Ligeramente opalescente
- Soporte crecimiento: >95% germinación *Trichoderma*
- Tiempo gelificación: 8-12 min a temperatura ambiente
- Fuerza gel: Adecuada para manipulación rutinaria

Almacenamiento PDA:

- Placas preparadas: $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ máximo 4 semanas
- Protección luz: Bolsas oscuras o papel aluminio
- Humedad controlada: Bolsas selladas con cierre hermético
- Orientación: Agar hacia arriba para evitar condensación

- Etiquetado: Fecha preparación, lote medio, lote agar, vencimiento
- Verificación: Inspección semanal estado físico

D 2. Especificación técnica - caldo papa dextrosa (PDB)

Código: ESP-MED-002

Versión: 2.1

Especificaciones PDB DIFCO™ (254920):

- Extracto de papa: 4.0 g·L⁻¹ (equivalente)
- Dextrosa: 20.0 g·L⁻¹
- pH final: 5.6±0.2
- Humedad: <5%
- Solubilidad: Completa en agua destilada
- Color seco: Beige claro
- Color reconstituido: Amarillo pálido
- Claridad: Puede presentar ligera turbidez

Preparación estándar PDB comercial:

1. Suspender 24.0 g PDB Difco™ en 1000 mL agua destilada
2. Mezclar hasta disolución completa (agitación magnética)
3. Ajustar pH a 5.6±0.1 si necesario (raramente requerido)
4. Distribuir en frascos según volumen requerido
5. Esterilizar en autoclave 121°C/15 min
6. Enfriar y almacenar máximo 1 semana a 4°C

Controles calidad PDB:

- pH final: 5.6±0.1 (pHmetro calibrado)
- Esterilidad: Ausencia crecimiento 48h/37°C
- Claridad: Límpido a ligeramente turbio
- Soporte crecimiento: >90% viabilidad testigo
- Color: Amarillo claro sin precipitados
- Estabilidad: Sin cambios pH durante almacenamiento

Almacenamiento PDB:

- Temperatura: $4\pm 2^{\circ}\text{C}$
- Luz: Protegido (frascos ámbar o papel aluminio)
- Tiempo máximo: 7 días (medio líquido)
- Contenedor: Vidrio borosilicato estéril
- Agitación: Homogeneizar suavemente antes uso
- Verificación: Inspección visual diaria