



ENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES PARA SU APLICACIÓN COMO FUNGICIDAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Curso: 2014/15

Alumno: Diego Carrillo Freire

Tutores: María José Cocero

Soraya Rodríguez

Marta Salgado

Máster en Calidad, Desarrollo e Innovación de Alimentos
E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera (Palencia)

Índice

1. Resumen.....	1
2. Antecedentes.....	3
3. Objetivos.....	7
4. Material y métodos.....	8
4.1. Pretratamiento de los β -glucanos (1,3) (1,6).....	8
4.2. Preparación de las emulsiones.....	9
4.3. Método de Eliminación del disolvente.....	9
4.4. Caracterización	
4.4.1. Pureza de los β -glucanos.....	10
4.4.2. Tamaño de gota y tamaño de partícula.....	10
4.4.3. Microscopia.....	10
4.5. Efecto anti fúngico con técnicas de cultivo.....	10
5. Resultados y Discusión	12
6. Conclusiones.....	18
7. Bibliografía.....	19
8. Anexos.....	22

1. RESUMEN

La podredumbre gris, causado por *Botrytis cinerea*, ha sido considerada una enfermedad secundaria que no causaba pérdidas económicas. Por efecto de una epidemia de filoxera (insectos succionadores de savia) cobró importancia causando pérdidas económicas en Europa.

Se han realizado varios estudios para la obtención de compuestos más amigables al ambiente, el objetivo del presente trabajo es medir el efecto de la concentración del principio activo (resveratrol) encapsulado en diferentes matrices como lecitina de soja y β -glucanos de diferentes orígenes (levadura *Sacharomyces cerevisiae* y cebada), que conllevan a favorecer la penetración de este compuesto a través de la pared celular para impedir el crecimiento del hongo patógeno.

Para medir la distribución de tamaño de gota, el valor de $d(0,5)$ de las emulsiones a diferentes concentraciones de los compuestos encapsulantes (lecitina y β -glucano de *Sacharomyces cerevisiae* y β -glucano de cebada) así se obtiene que el menor valor para la emulsión y para la emulsión lecitina con acetato de etilo es $0.143 \mu\text{m}$ después de estabilizar en el agitador de alta velocidad a 70Hz por 4 minutos con un rango de tamaño de partícula entre 0.1 y 1000 μm

El análisis de los datos del crecimiento en placa de *Botrytis cinerea* nos indica que la emulsión con acetato de etilo y resveratrol encapsulado en betaglucano procedente de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* a concentración de 15 g/l. y la emulsión con lecitina y acetato de etilo a concentración de 20 g/L. existe una reducción significativa con relación al control. Hay que destacar que las emulsiones (con acetato) son eficaces porque existe diferencias significativas entre las concentraciones ensayadas, las emulsiones al eliminar el acetato si se observan diferencias y la más eficiente es β -glucano de cebada de 20g/L con una inhibición del crecimiento de 70%.

ABSTRACT

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, has been considered a secondary disease that caused economic losses. As a result of an epidemic of phylloxera (sap-sucking insects) acquired importance causing economic losses in Europe.

There have been several studies to obtain more environmentally friendly compounds, the aim of this study is to measure the effect of the concentration of the active substance (resveratrol) encapsulated in different matrices such as soya lecithin and β -glucans from different sources (yeast *Saccharomyces cerevisiae* and barley), leading to aid penetration of the compound through the cell wall to prevent the growth of pathogenic fungus.

To measure droplet size distribution, the value of $d(0.5)$ of emulsions at different concentrations of the encapsulating compounds (lecithin and β -glucan of *Saccharomyces cerevisiae* and barley β -glucan) is obtained so that the lower value for emulsification and lecithin with ethyl acetate emulsion is 0.143 μm after stabilize in high speed stirrer at 70Hz for 4 minutes with a size range between 0.1 and 1000 μm .

The analysis of growth data *Botrytis cinerea* plate indicates that the emulsion with ethyl acetate and resveratrol encapsulated in beta glucan from yeast *Saccharomyces* to the concentration of 15 g / l. and lecithin emulsion with ethyl acetate and concentration of 20 g / L. there is a significant reduction relative to control. Note that the emulsions (acetate) are effective because there are significant differences between the concentrations tested, the emulsions to remove ethyl if differences are observed and more efficient is barley β -glucan 20g / L with growth inhibition 70%.

2. ANTECEDENTES

Botrytis cinerea, es un hongo patógeno que causa el moho gris (Williamson et al., 2007), ampliamente distribuido en el mundo (Ellis, 1971), causan deterioro en los frutos provocando machas negras, es notable el deterioro de la flora natural de las plantas que favorecen el desarrollo y proliferación de *Botrytis* sobre restos de hojas necrosadas y en racimos maduros de vid (Bulit y Dubos, 1988; Latorre, 1986; Latorre y Vásquez, 1996). Adicionalmente, ocurren infecciones latentes, las que tienen importancia como fuente de inóculo para el posterior desarrollo de esta enfermedad, particularmente en la post cosecha de la uva de mesa (Latorre y Vásquez, 1996; Latorre et al., 2001).

En los vegetales, los más comúnmente afectados por la botritis, incluyen frijoles, melones y pepinos, berenjenas, cebollas, pimientos, fresas y uvas.

En la actualidad y por la creciente preocupación a la protección del medio ambiente es necesario innovar el desarrollo de nuevos fungicidas con sustancias de origen natural.

Como antecedentes al desarrollo de estos nuevos fungicidas citamos la actividad antifúngica de los aceites esenciales de productos naturales y extractos de plantas. Por ejemplo citamos el *Origanum vulgare* L., L.(orégano), *Monarda didyma* (bergamota silvestre) y de una formulación comercial de aceite de tomillo contra *B. cinérea* inhibiendo el crecimiento del patógeno a 200 mg / ml de aceite de tomillo. Otro ejemplo citamos que el crecimiento del micelio del patógeno se redujo significativamente en la mayor concentración de los aceites esenciales de *O. vulgare* y *M. didyma*. (Taborda L. 2014)

Otros estudios nos indican que los extractos naturales cuyo principio activo es el ácido pinolénico proveniente del aceite de piñón de cedro blanco (*Hiba arborvitae*) inhiben la germinación de *B. cinerea* (Hernández y Bautista 2007), este componente se lo extrae mediante lipasas y agua destilada (Patente española, Número de publicación: 2 265 865)

Los extractos de las especies arbóreas de origen indio *Azadirachta indica* (Neem), que se da en las costas de Ecuador, de igual forma *Melia azederach* (*Melia* o Paraíso) con

sus principios activos como los terpenoides, fenoles, aminoácidos no esenciales y alcaloides tienen un efecto inhibitorio en el hongo *Botrytis cinérea*. (Donoso, E. 1998).

Otra planta de interés fue la menta (*Mentha pulegium* L.), que causó inhibición moderada en el crecimiento del fitopatógeno (Bouchra et al., 2003).

El resveratrol, cuya estructura química se muestra en la Figura 1, es una fitoalexina, que se encuentra en altas cantidades en la piel de la uva (Casas et al, 2010; Zheng et al., 2011) que actúa como agente protector. Es un polifenol que ha sido estudiado como remedio natural por sus propiedades antioxidantes contra la obesidad y enfermedades cardiovasculares (Chun Fu et al., 2013). Posee efectos protectores debido a sus propiedades antioxidantes, por ello se busca técnicas que mejoren su absorción.

Se ha investigado el efecto que causa el resveratrol para la inhibición del crecimiento que al estar en contacto con el patógeno penetra la pared celular de la planta (Adrian y Jeandet, 2012).

Debido a estos hallazgos, el resveratrol ha sido seleccionado como prometedor antifúngico de origen natural. Sin embargo cuando se aplica externamente en la planta para luchar contra *B. cinérea*, el principio activo debe ser encapsulado en matrices poliméricas que actúa como un portador para que el compuesto activo inhiba el crecimiento, así como la protección contra la degradación térmica y oxidativa. (Salgado M, Soraya et.al (2015).

El presente trabajo pretende encapsular este principio activo en encapsulantes de origen natural que mejoren su absorción y evitar su degradación por reacciones de oxidación.

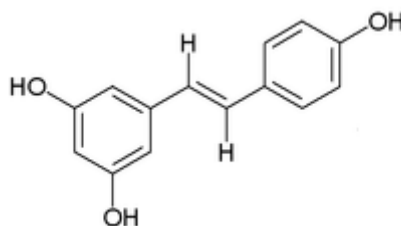


Fig 1. Estructura molecular del trans-resveratrol

El uso de agentes encapsulantes de β -glucanos purificados de la levadura *sacharomyces cerevisiae* después de un proceso de solubilización y β -glucanos de cebada y lecitina los mismos que mejoran la penetración de estas emulsiones en la pared celular de los hongos.

Los β -glucanos son polisacáridos que se encuentran en las paredes celulares de la avena y cebada. Las levaduras como la *sacharomyces cerevisiae* contiene fundamentalmente el (1-3)-(1-6) mientras que los cereales tienen (1-3)(1-4) en la distribución molecular (fig.2). Los β -glucanos han sido autorizados como ingrediente alimentario por la Comisión europea emitidos por la EFSA. (Ronda F., Rodríguez de la Calle M. y Pando V, 2012).

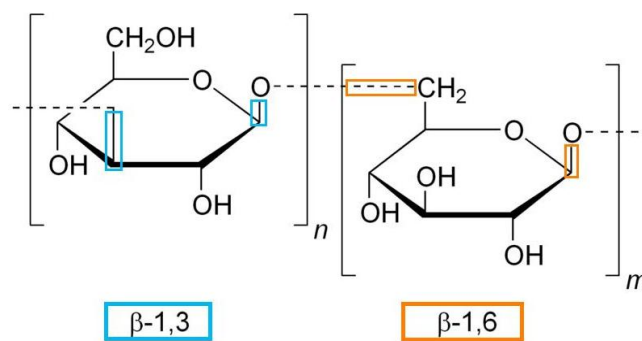


Fig. 2 Estructura molecular de β -glucanos

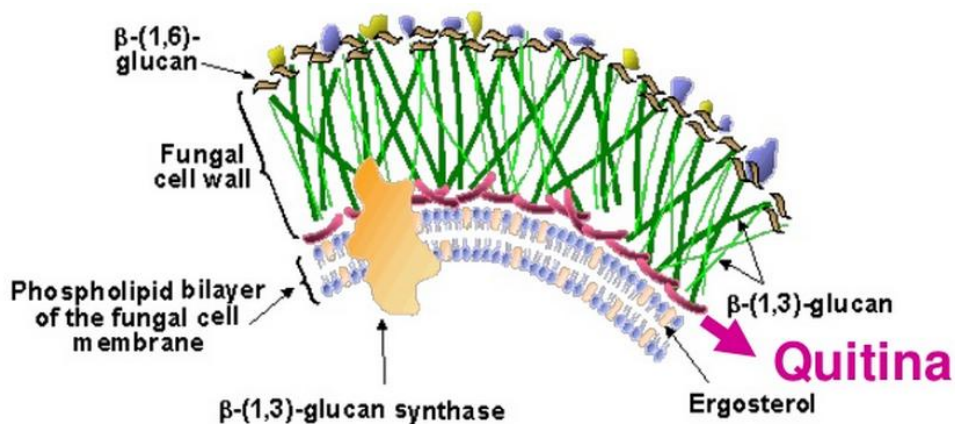


Fig. 3. Representación gráfica de la pared celular fúngica

En el presente estudio se propone optimizar una formulación que contenga resveratrol como principio activo formulado en matrices de β -glucano y lecitina en una forma líquida, ya que la disolución de las partículas es lenta y en frío tienden a aglomerarse. Por otro lado, se quiere comprobar si el uso de β -glucanos (1,3)-(1,6) es más efectivo que el (1,3)-(1,4) probado anteriormente, (Salgado M, Soraya et.al 2015).

3. OBJETIVOS

- Desarrollar una formulación antifúngica en estado líquido formado por partículas encapsuladas de resveratrol utilizando como soporte β -glucanos purificados de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, β -glucanos de cebada, lecitina y una mezcla de ambas a diferentes concentraciones.
- Evaluar el efecto de la concentración del compuesto sobre *Botrytis cinérea* a través de actividad antifúngica in-vitro.

4. MATERIAL Y METODOS

Para la realización de los ensayos se utilizó β -glucanos de levadura *Sacharomyces cerevisiae* insoluble donado por Naturae (Pradoluengo, Burgos), β glucanos de cebada con una pureza del 75% (Glucagel TM, Alkem Laboratories LTD, India), resveratrol con una pureza del 98% (Pure Bulk, EE.UU), lecitina de soja (Glama-sot, SOTYA, S.A.), acetato de etilo con una pureza del 99% (Panreac) y agar extracto de malta (Panreac).

4.1. Pretratamiento de los β -glucanos (1,3) (1,6)

La razón por la cual el β -glucano se somete a este tratamiento es que tenga la capacidad de disolverse en agua.

Los β -glucanos de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* se pesó 10 gramos.

Los reactivos que se añadieron está en una relación de $1,4 \times 10^{-3}$ g acetato/g sólido y $1,2 \times 10^{-2}$ mL ácido acético/g sólido. La relación sólido/agua es de 1/10 para obtener una concentración de 100 g/L.

Para el pretratamiento de los β -glucanos se aumentan la presión del dispositivo de acero inoxidable 304 AISI, cuyo volumen es 170ml, es equipado con un tubo lateral para el muestreo en el tiempo, la temperatura de operación es a 135°C durante 4,5 horas y una presión de 2 bar en el interior del reactor (ver fig. 4) Durante la reacción, se tomaron varias muestras cada 30 minutos y se los enfría a temperatura ambiente, con la finalidad que sean capaces de solubilizarlos en agua.



Fig 4. Esquema del equipo para solubilizar los β -glucanos

4.2. PREPARACION DE LAS EMULSIONES

Los encapsulantes empleados fueron lecitina, β -glucanos procedente de la levadura solubilizadas en el reactor de acero inoxidable y β -glucanos procedente de la cebada. Inicialmente fueron preparadas las disoluciones acuosas saturadas con acetato de etilo a diferentes concentraciones: 10g/L, 15 g/L y 20 g/L de surfactante. En todas las emulsiones se añade resveratrol (7.5g/L) disuelto en acetato de etilo.

La emulsión tiene la proporción aceite/agua: 1/9

La macro emulsión formada es inestable y se somete a dilución entre el acetato de etilo y el β -glucano a 70°C y la lecitina a 55°C, luego llevamos al agitador de alta velocidad (IKA Pilot Labor plant) durante 4 minutos a 70Hz para la formación de la micro emulsión (de Paz, et al., 2012) para que la emulsión sea estable.

4.3. METODO DE ELIMINACION DEL DISOLVENTE

Para extraer el acetato de etilo se introduce la emulsión en el rotavapor (Heidolph), a 60°C y una presión a vacío de 0.7-0.8 bar a 75 rpm por 1 hora

4.4. CARACTERIZACION

4.4.1. Pureza de los b-glucanos

Para la determinación de la pureza de (1,3)-(1,6) β -Glucanos se utiliza el kit β -glucanos de hongos y levaduras de la casa comercial Megazyme. La obtención de la cantidad de β -glucanos totales y α -glucanos, y por diferencia de los dos obtenemos la cantidad de β -glucanos originales y la comparación de estos con la muestra a determinar de los β -glucanos de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* después del tratamiento de solubilización

4.4.2. Tamaño de gota y tamaño de partícula

La caracterización de la granulometría y la distribución de tamaño de gotas de las emulsiones con acetato y las suspensiones sin acetato se midió por difracción láser (Mastersizer 2000 de Malvern). Las mediciones las realizan dos tipos de láser, rojo a 633 nm y azul a 466nm. La operación de análisis está en función del índice de refracción de la lecitina (1.63)

4.4.3. Microscopia

A través del Microscopio Leica DM4000B, luego de preparadas las emulsiones con acetato y las suspensiones sin acetato se analiza la forma de la partícula a diferentes zoom del revolver del equipo.

4.5. EFECTO ANTIFUNGICO CON TECNICAS DE CULTIVO

El cultivo in vitro de *Botrytis cinerea*, se realizó en placas con agar de extracto de malta, previamente esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos. En la preparación de las placas se añade al agar de extracto de malta una cantidad de emulsión o suspensión tal que la concentración de resveratrol fuera de 100ppm. Una vez preparadas las placas se realiza la siembra del hongo a partir de una placa madre de *B. cinerea* el cual se coloca en la superficie del agar una vez solidificado. Se cultivaron 5 réplicas para cada emulsión de las 3 concentraciones con acetato y sin acetato a 22°C por 7 días. Igualmente, se cultivaron una placa control y una placa

control de acetato de etilo, con una concentración de acetato de etilo equivalente a la utilizada en las emulsiones.

Pasado ese tiempo, se midió el diámetro de crecimiento del hongo y se comparan los efectos del uso de resveratrol encapsulándolo en las matrices de lecitina, β -glucanos de cebada y β -glucanos de *Sacharomyces cerevisiae* solubilizados en el reactor y la mezcla de estos con acetato y sin acetato de etilo respectivamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

Pureza de los β -Glucanos

Se deduce que las muestras solubilizadas a las condiciones de presión y temperatura el total de glucanos tratados es de 25,78%, este valor nos indica que ha sufrido una degradación de la cadena de β -glucano de la levadura al comparar el valor de 51% del kit comercial y 64% del β +glucano puro.

Tamaño de gotas de las emulsiones y suspensiones

Para el análisis del tamaño de gotas a través del equipo por difracción láser, observamos que a concentración de 20g/L con acetato nos indica que es mejor la distribución de la partícula de toda la emulsión y para las demás concentraciones observamos que no existen diferencias significativas entre las mismas.

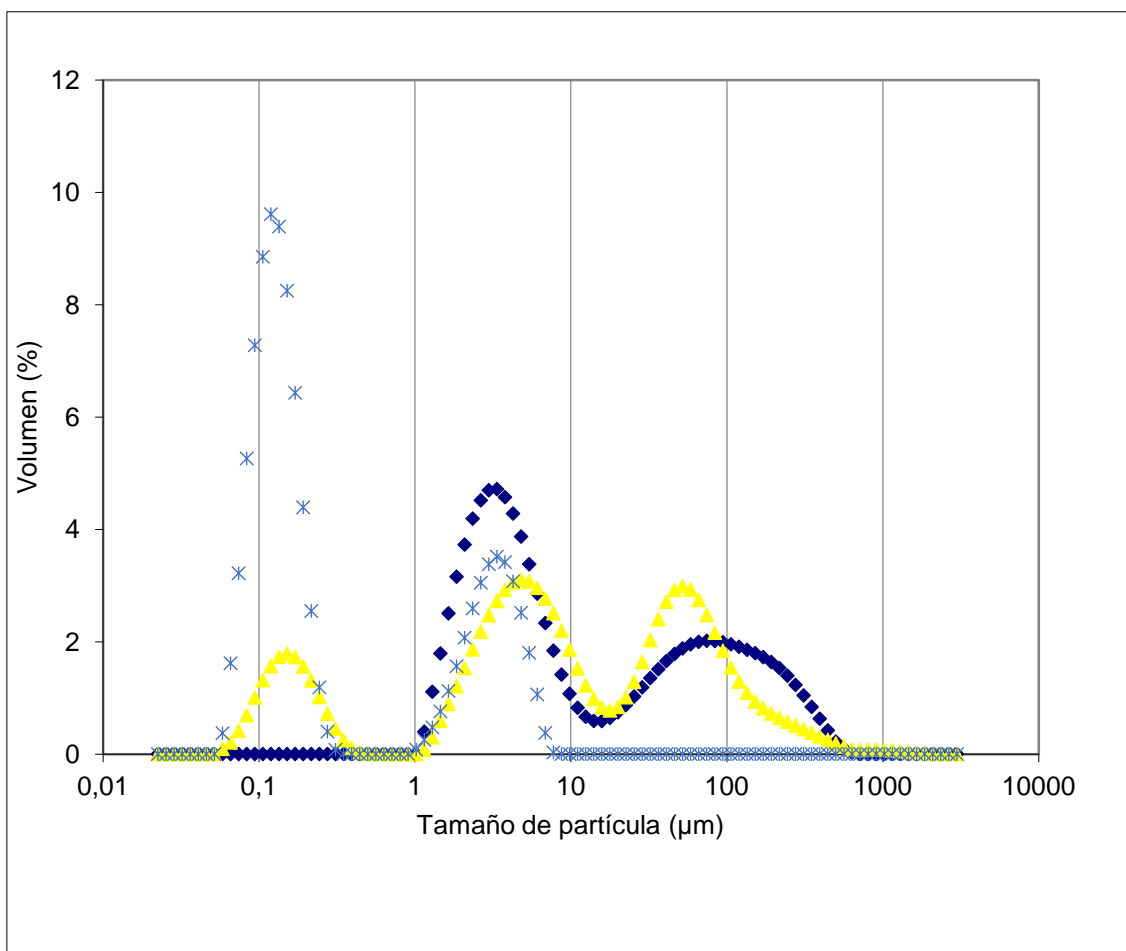


Fig. 5: Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando lecitina como surfactante a distintas concentraciones 15g/L (♦), 10 g/L (▲) y 20 g/L (*)

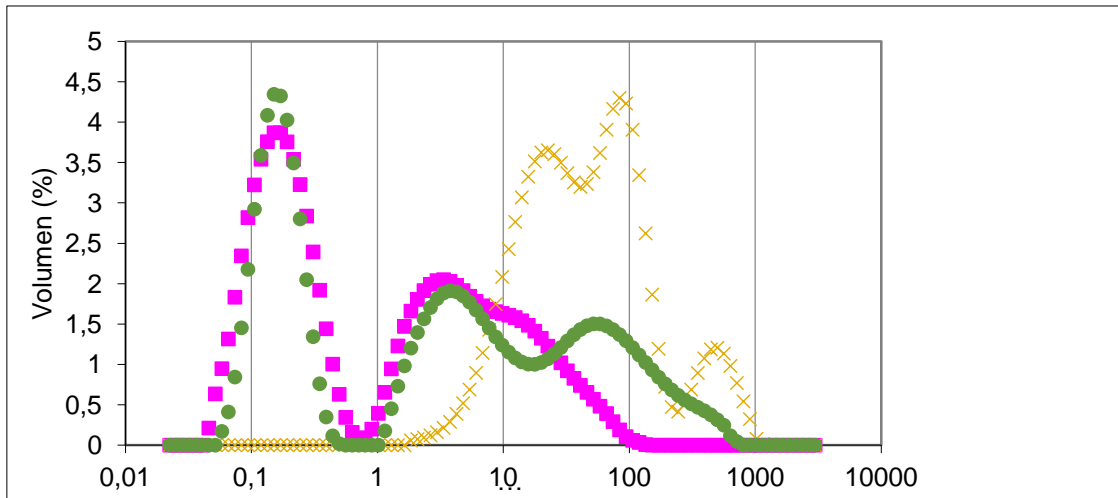


Fig. 6: Distribución de tamaño de gota de la suspensión de resveratrol usando lecitina como surfactante a distintas concentraciones 15g/L (▪), 10 g/L (x) y 20 g/L (•)

En este caso se observa que la suspensión a concentración de 15g/L y 20g/L no se aprecian diferencias significativas en el tamaño de la partícula, cabe destacar que se midió la gota al momento que se realizó su extracción en el rotavapor. Para la emulsión de 10g/L no presenta estabilidad en la formación de la gota y la distribución no fue uniforme.

TABLA 1. VALORES $d(0.5)$ DE LAS FORMULACIONES CON LECITINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

EMULSION	$d(0.5)$
lecitina con acetato (15g/L)	7,661
lecitina con acetato (10g/L)	6,17
lecitina con acetato (20g/L)	0,143
lecitina sin acetato (15g/L)	42,314
lecitina sin acetato (10g/L)	3,12
lecitina sin acetato (20g/L)	0,907

El análisis de los valores $d(0.5)$ de la tabla 1. indica que la emulsión de lecitina con acetato a concentración de 20g/l es mejor ya que cuanto más pequeña es la partícula es mejor la penetración del principio activo(resveratrol) en la pared celular del hongo, afectando su crecimiento.

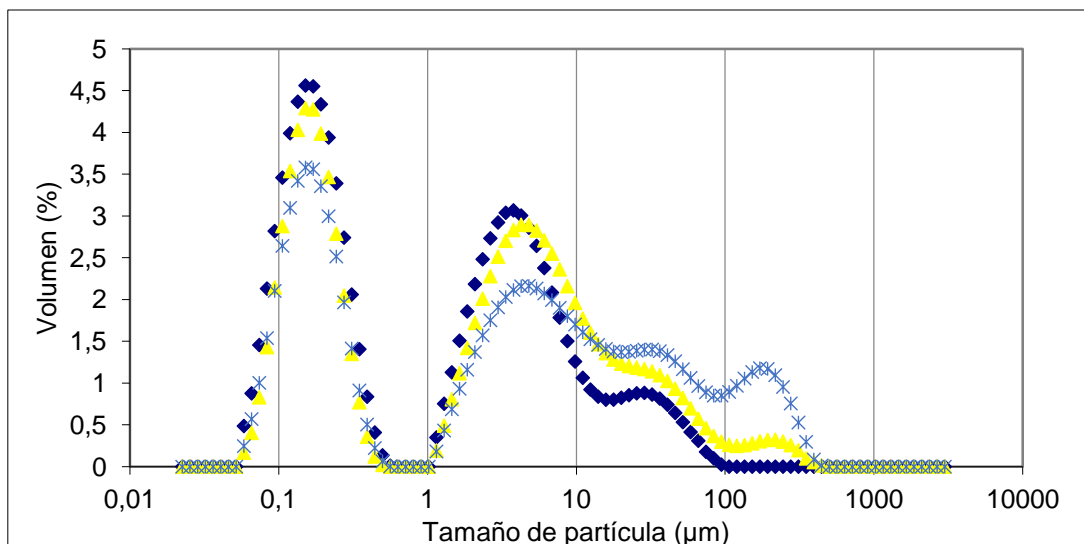


Fig. 7: Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando lecitina como surfactante en β -glucano con acetato a distintas concentraciones 15g/L (◆), 10 g/L (▲) y 20 g/L (*)

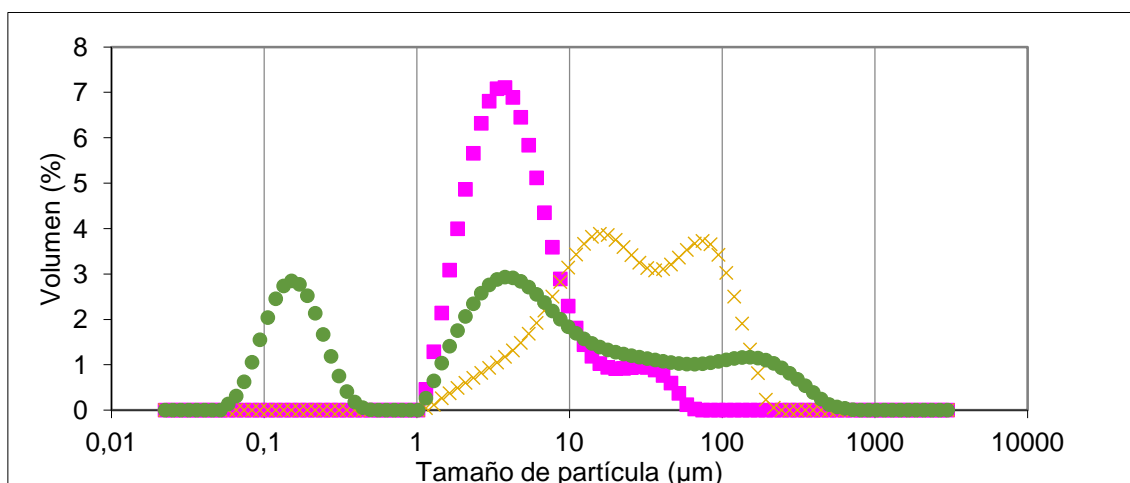


Fig. 8: Distribución de tamaño de gota de la suspensión de resveratrol usando lecitina como surfactante en β -glucano sin acetato a distintas concentraciones 15g/L (•), 10 g/L (x) y 20 g/L (•)

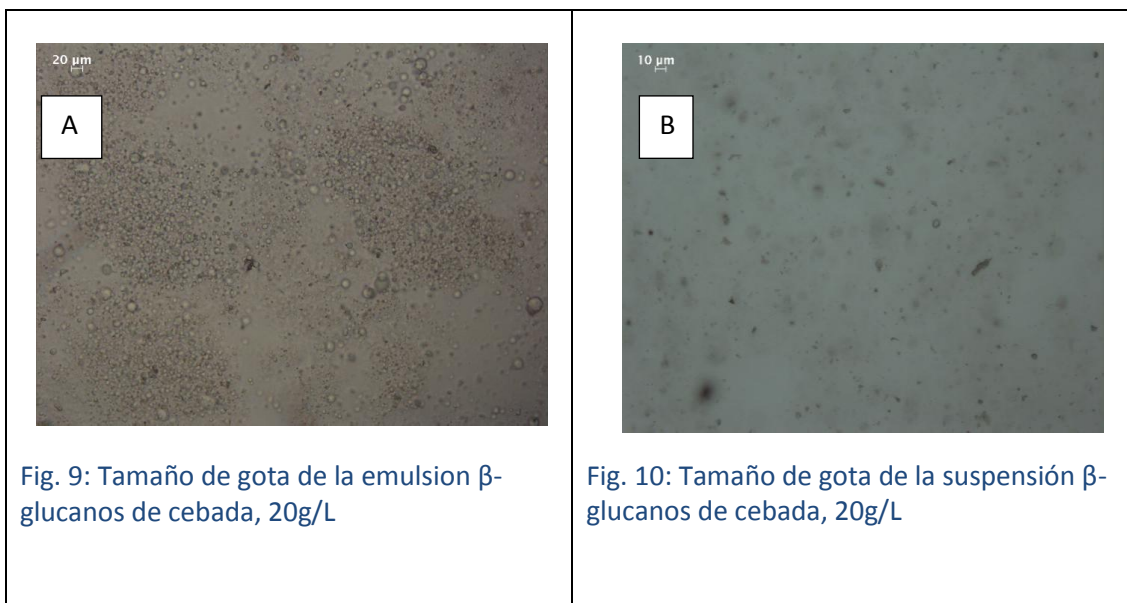
TABLA 2. VALORES $d(0.5)$ DE LAS FORMULACIONES CON LECITINA A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

FORMULACION	$d(0.5)$
β glucano de levadura+lecitina con acetato 20g/L	3,818
β glucano de levadura+lecitina-con acetato 10g/L	2,787
β glucanodelevadura+lecitina-con acetato 15g/L	1,434
β glucanodelevadura+lecitina-sin acetato 10g/L	22,947
β glucanodelevadura+lecitina sin acetato 20 g/L	4,455
naturae+lecitina sin acetato 15 g/L	3,868

El tamaño de la partícula se ve influenciado en la concentración de la suspensión y se deduce que disminuye en el caso de la mezcla de lecitina+ β -glucano de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* así para 15g/L presenta el mayor aumento de tamaño, y la distribución del tamaño de partícula es mejor en toda la suspensión.

Para la concentración de 10 g/L disminuye y para 20g/L se aprecia que la partícula es menor por razón de que a mayor concentración de la suspensión existe mayor influencia de la lecitina como matriz encapsulante. Estos valores se correlacionan con el valor de $d(0.5)$ que es igual a 1,434 con acetato y 3,868 sin acetato y nos indica que la partícula de la suspensión de β -glucano (1-3)(1-6) + lecitina con acetato es más estable la mezcla de sus componentes.

Imágenes del microscopio



Se aprecia que existe diferencias entre las gotas de la emulsion (fig. 9 A) y las partículas que se forman al evaporar el acetato (fig. 10 B). Se aprecia la diferencia del tamaño de la gota puesto que la emulsión contiene acetato de etilo y la suspensión no lo posee ya que fue destilado en el rotavapor y el resveratrol se cristaliza.

Efecto antifúngico

Crecimiento de *Botrytis Cinerea*

En las figuras se observa el crecimiento del hongo *Botrytis cinérea* y presentan diferencias significativas del control con acetato y sin acetato de etilo

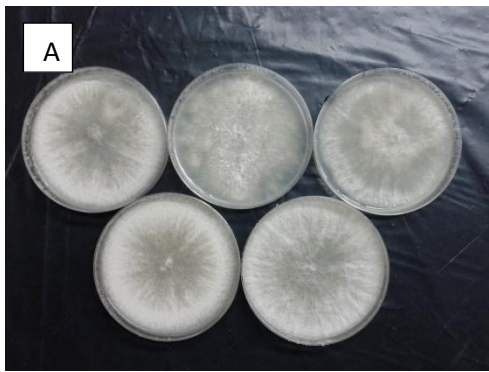


Figura 11. Placa de cultivo de medio agar Malta, control

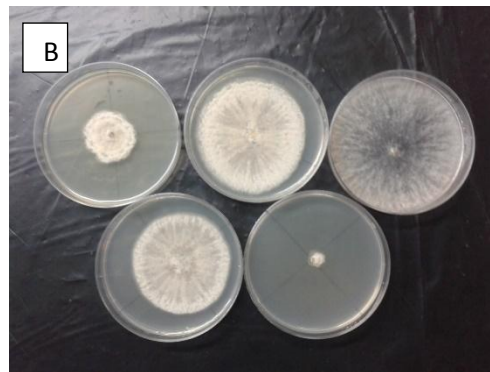


Figura 12. Placa de cultivo de medio agar Malta, control con acetato de etilo.

Consecuentemente al comparar las placas la inhibición es eficaz al utilizar la emulsión de β -glucanos de levadura con acetato de etilo (fig. 14 – D)

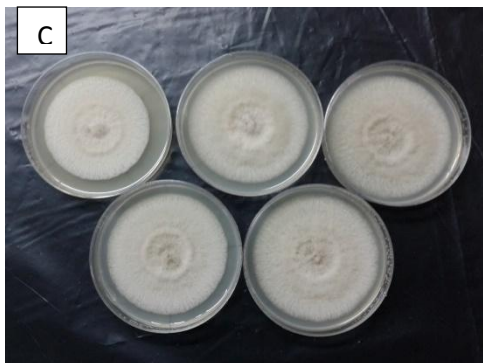


Figura 13. Placa de cultivo de medio agar Malta, suspensión β -glucanos de *sacharomyces cerevisiae*, 20 g/L

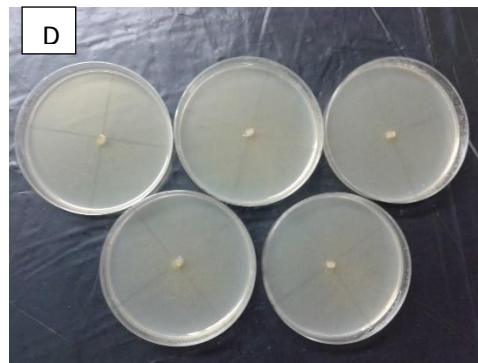


Figura 14. Placa de cultivo de medio agar Malta, emulsión β -glucanos de *sacharomyces cerevisiae*, 20 g/L.

6. CONCLUSIONES

Al optimizar la formulación de encapsulación de resveratrol en matrices de β -glucanos de la levadura *Sacharomyces cerevisiae* y β -glucanos de cebada se concluye que el mayor poder de penetración se evaluó en el crecimiento en placa de *Botrytis cinérea*, observando que la inhibición llega a su totalidad utilizando suspensiones a concentración de 20g/L de levadura. De igual forma se detecta que la emulsion de glucagel+lecitina de 20g/L la inhibición es significativa en comparación a la suspensión glucagel de 20g/L que es de 70% eficaz a la penetración y ataque al hongo. La emulsión con acetato de etilo a 20 g/L de concentración inhibe el 100% del crecimiento.

La formación de las partículas no se ve influenciada en el efecto antifúngico en función de los valores $d(0.5)$.

7. BIBLIOGRAFIA

- Benito-Román, O. Alonso, E (2011). Optimizacion of the β -Glucan Extraction Conditions from different waxy barley cultivars. *Journal of Cereal Science* 53(3), 271-276.
- Bouchra C, M Achouri, L M I Asan, M Hmamouchi (2003) Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: *Fr. J. Ethnopharmacol.* 89:165-169.
- Bult, J. & Dubos, B. (1988). *Botrytis bunch rot and blight*. In: R.C. Pearson and A.C. Goheen (Edts.). *Compendium of Grapes Diseases*. P.13-15. The AmericanPhytopathological Society. St. Paul, Mn.
- Casas, L., Mantell, C., Rodriguez, M., Ossa, E.J.M.d.l., Roldan, A., Ory, I.D., Caro, I., Blandino, A., (2010). Extraction of resveratrol from the pomace of Palomino fino grapes by supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 96 (2), 304–308.
- De Paz., Martin, Cocero, M. J., (2012). Formulation of β -carotene with soybean lecithin by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying. *Journal of Supercritical Fluids* 72, 125-133
- Ellis, M. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Wallingford, UK: CAB International.Ellis MB, Waller JM, (1974). *Sclerotinia fuckeliana* (conidial state: *Botrytis cinerea*). *CMI Description of pathogenic fungi and bacteria*, No. 341.
- Guorong, S., Liqun R., Huazhong, Y., Hua, X., Runa, J. (2008). Stabilization and Encapsulation of Photosensitive Resveratrol within Yeast Cell. *International Journal of Pharmaceutics* 349 (1-2), 83-93
- Hendler, SS., Rorvick, D. (2001) *Alpha-lipoic acid*. Eds, *PDR for Nutritional Supplements*. Medical Economics Company. Montvale, NJ.

- Hernández. A, Bautista. S, Velásquez, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícola. Revista Fitotecnica Mexicana, Abril-Junio, 2007. Vol. 30, numero 002.
- Latorre, B. & Vásquez, G. Situación de Botrytis cinerea latente en uva de mesa de la zona Central. Aconex (Chile) , 1996. 52:16-21.
- Latorre, B., Lillo, C., Rioja M. Eficacia de los tratamientos fungicidas para el control de Botrytis cinerea de la vid en función de la época de aplicación. Cien. Inv. Agr. (Chile) 2001. 28: 61-66.
- Memenza M. Control biológico in vitro de Botrytis cinerea (Pers) mediante el uso de hongos antagonistas, en vid (Vitis vinifera). Universidad Nacional Mayor. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis para optar el título profesional de Bioólogo con mención en Microbiología y Parasitología, 2009. Lima – Perú 75pp.
- Patent Application Publication (10) United States (12) Pub. No.: US 2008/0108114 A1 Cox et al. (43) Pub. Date: May 8, 2008
- Pearson, R. Compendium of Grape Disease. American Phytopathological Society Press. 1998. 13pp.
- Ronda F., Rodriguez de la Calle y Pando V. Enriquecimiento de pan sin gluten con β -glucanos extraídos del hongo pleurotus ostreatus. Trabajo Fin de Master, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera, Universidad de Valladolid.
- Ronda F., Rivero M. Extracción y reología de β -glucanos de cebada y elaboración de masas de pan sin gluten enriquecidas con los extractos. Trabajo Fin de Master, E.T.S. Ingenierías Agrarias, Campus de la Yutera, Universidad de Valladolid. 2012

- Salgado M , Soraya Rodríguez-Rojo, Fernando Manuel Alves-Santos , María Jose Cocero. Encapsulation of resveratrol on lecithin and b-glucans to enhance its action against Botrytis cinérea. Journal of Food Engineering 165 (2015) 13-21.
- Taborda, L. Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de Lippia origanoides HBK y Thymus vulgaris L. como alternativas de manejo de Botrytis cinerea en fresa, Universidad de La Salle-Colombia, 2014
- Sanchez N., Hydrothermal conversión of sucrose and its monosaccharides, D-glucose and D-fructose, into lactic acid. Trabajo de Fin de Master. Universidad de Valladolid, Junio 2014.

8. ANEXOS

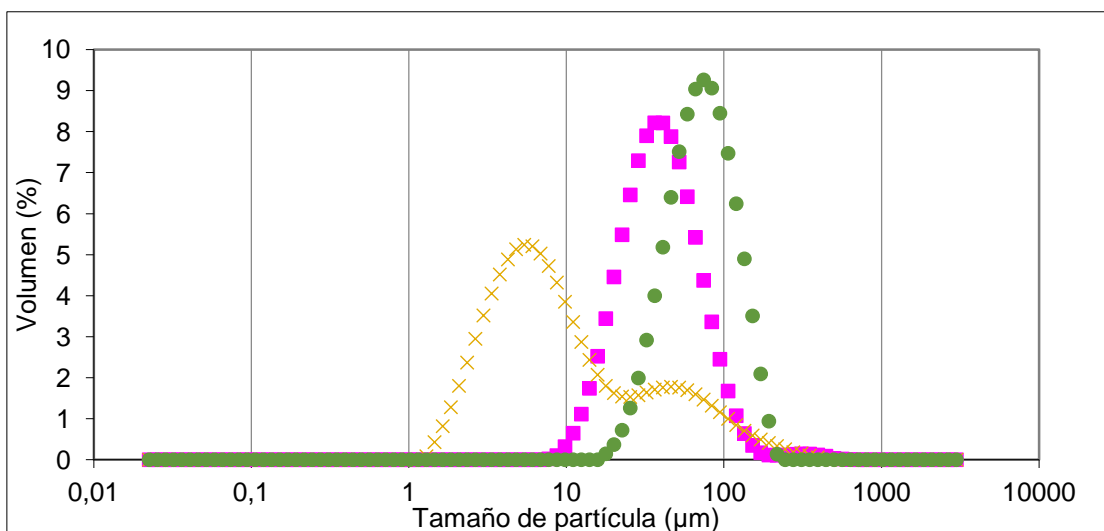


Fig. 15 : Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando lecitina como surfactante en β -glucano de cebada con acetato a distintas concentraciones 15g/L (-), 10 g/L (x) y 20 g/L (•)

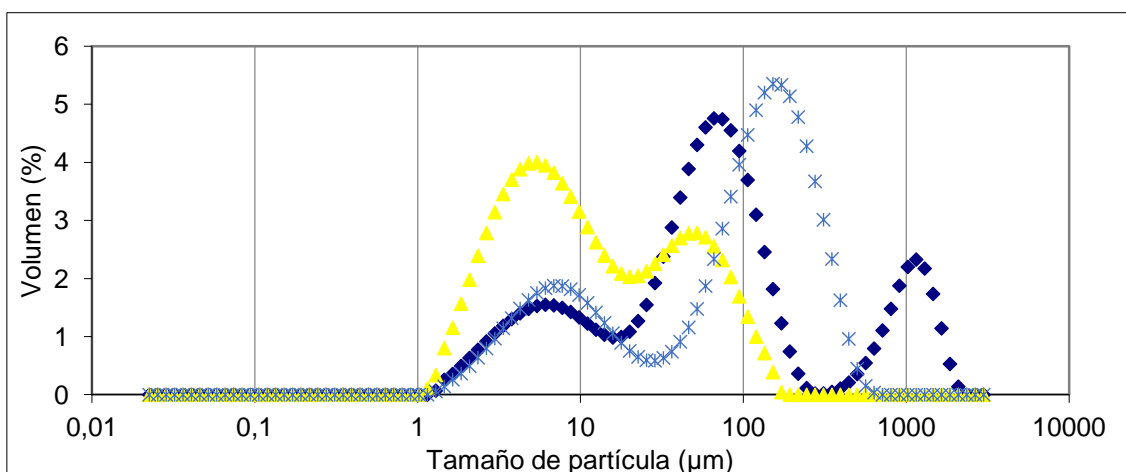


Fig. 16 : Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando lecitina como surfactante en β -glucano de levadura sin acetato a distintas concentraciones 15g/L (♦), 10 g/L (▲) y 20 g/L (*)

TABLA 2. VALORES $d(0.5)$ DE LAS FORMULACIONES CON β -GLUCANO (GLUCAGEL) A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

FORMULACION	$d(0.5)$
glucagel con acetato 20g/L	67,96
glucagel con acetato 15g/L	36,626
glucagel con acetato 10g/L	7,353
glucagel sin acetato 20g/L	99,183
glucagel sin acetato 15g/L	56,667
glucagel sin acetato 10g/L	9,352

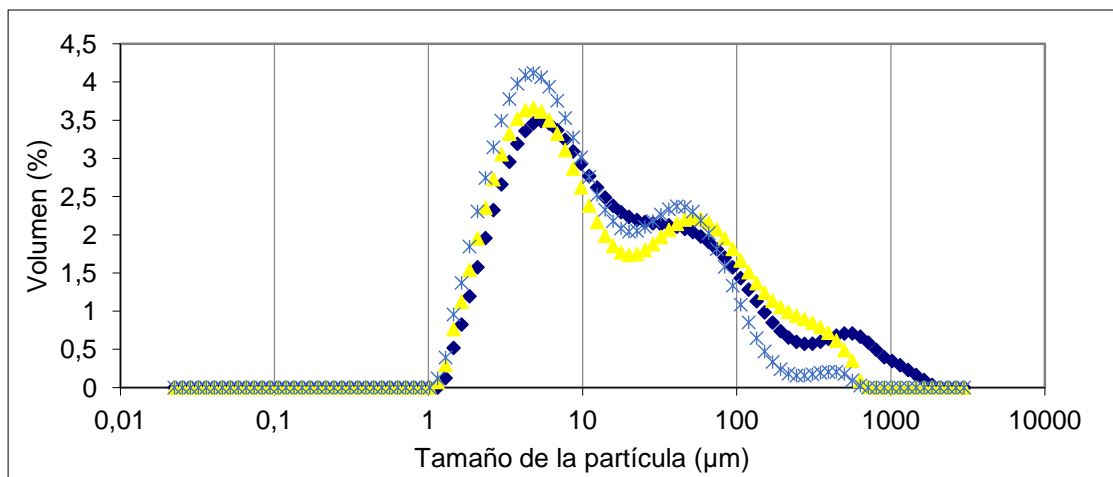


Fig. 17 : Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando betaglucano de cebada+lecitina como surfactante con acetato a distintas concentraciones 15g/L (◆), 10 g/L (▲) y 20 g/L (*)

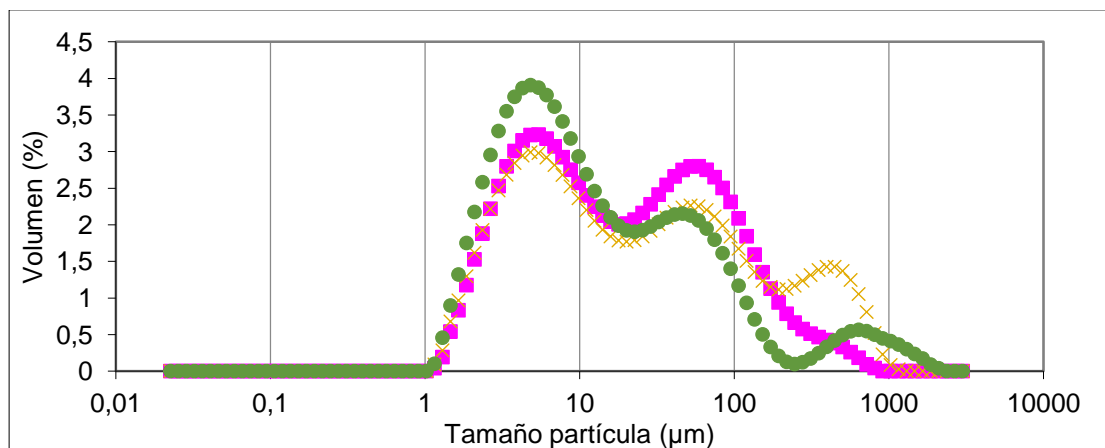


Fig. 18: Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando betaglucano de cebada+lecitina como surfactante con acetato a distintas concentraciones 15g/L (■), 10 g/L (x) y 20 g/L (•)

TABLA 3. VALORES d(0.5) DE LAS EMULSIONES CON β-GLUCANO+LECITINA SIN ACETATO A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

FORMULACION	d (0.5)
glucagel+lecitina con acetato 20g/L	8,428
glucagel+lecitina con acetato 15g/L	12,994
glucagel+lec con acetato 10g/L	11,39
glucagel+lecitina sin acetato 10g/L	18,969
glucagel+lecitina sin acetato 15g/L	16,167
glucagel+lecitina sin acetato 20g/L	9,288

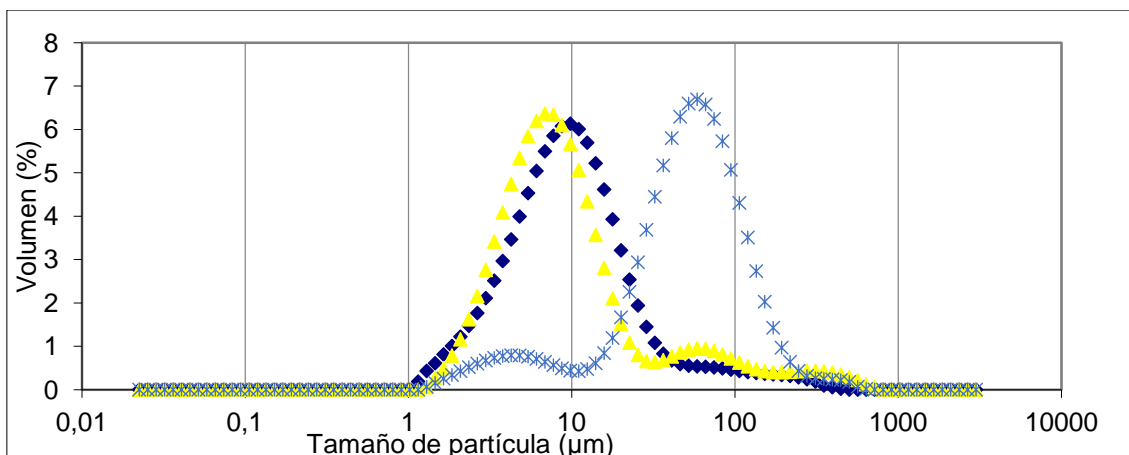


Fig. 19 : Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando betaglucano de levadura+lecitina como surfactante con acetato a distintas concentraciones 15g/L (◆), 10 g/L (▲) y 20 g/L (*)

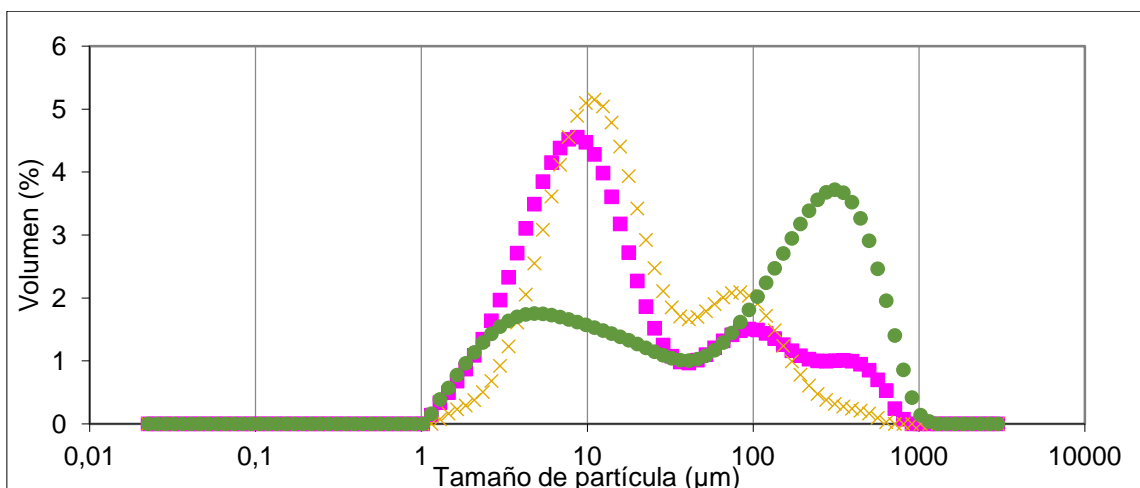


Fig. 20 : Distribución de tamaño de gota de la emulsión de resveratrol usando betaglucano de levadura+lecitina como surfactante con acetato a distintas concentraciones 15g/L (■), 10 g/L (x) y 20 g/L (●)

TABLA 4. VALORES d(0.5) DE LAS EMULSIONES CON β-GLUCANO SOLUBILIZADO A DIFERENTES CONCENTRACIONES.

FORMULACION	d (0.5)
naturae-con acetato 20g/L	50,216
naturae con acetato 15g/L	8,803
naturae con acetato 10g/L	7,507
naturae-sin acetato 20g/L	97,811
naturae sin acetato 10g/L	13,696
naturae sin acetato 15g/L	10,952

Crecimiento de Botrytis Cinerea

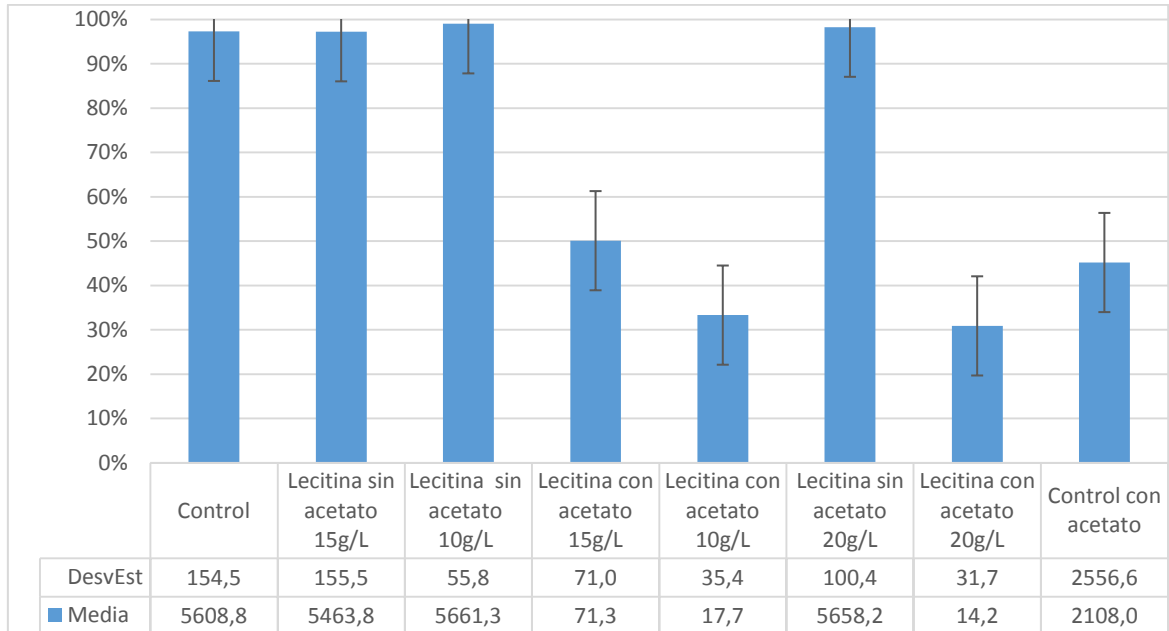


Fig. 21 CRECIMIENTO DE BOTRYTIS C. 22°C - 7 días DE INCUBACION

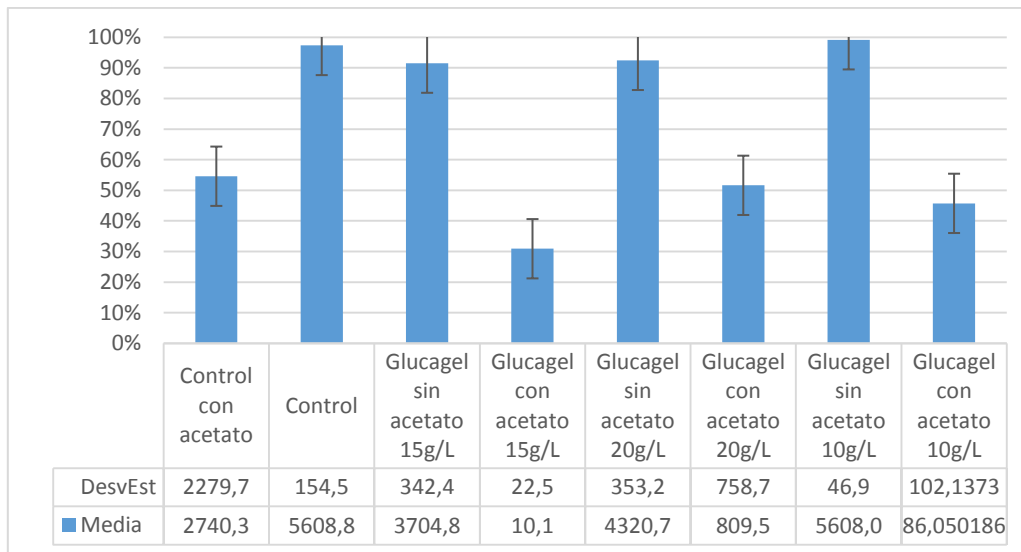


Fig. 22. CRECIMIENTO DE BOTRYTIS C. 22°C - 7 días DE INCUBACION

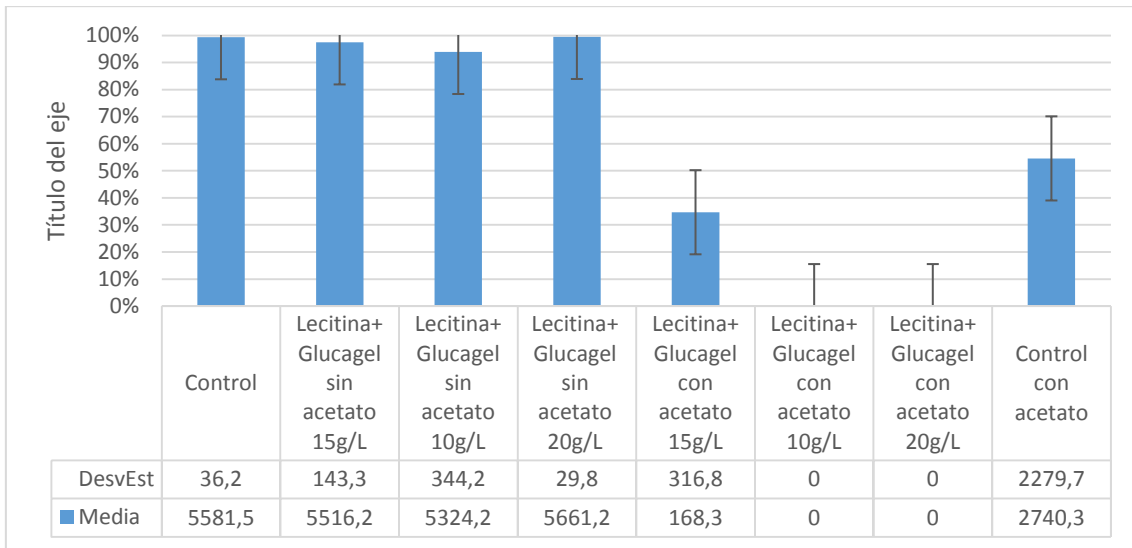


Fig. 23 CRECIMIENTO DE BOTRYTIS C. 22°C - 7 días DE INCUBACION

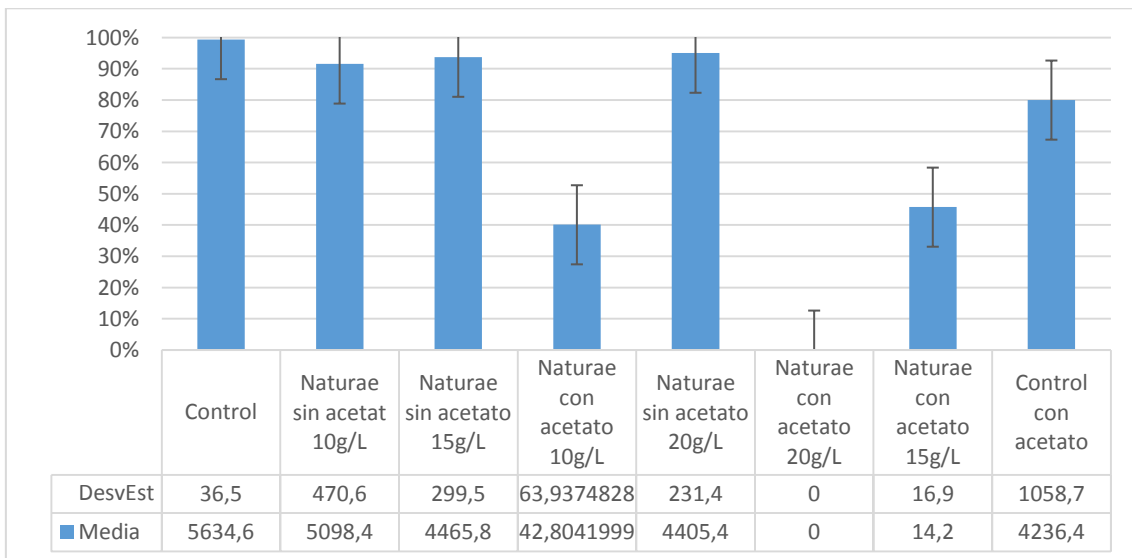


Fig. 24. CRECIMIENTO DE BOTRYTIS C. 22°C - 7 días DE INCUBACION

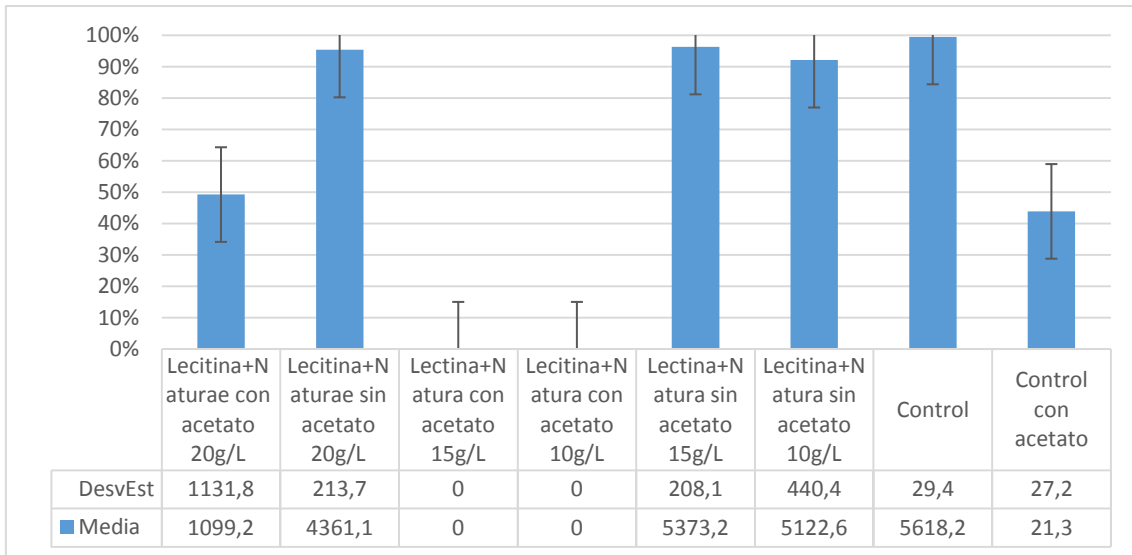


Fig. 25. CRECIMIENTO DE BOTRYTIS C. 22°C - 7 días DE INCUBACION