

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Actividad insecticida de extractos de *Pycnoporus
cinnabarinus* sobre *Spodoptera frugiperda* y *Diatraea
magnifactella***

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BIOL. SILVIA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

ASESOR: DRA. ELBA CRISTINA VILLEGAS VILLARREAL

CUERNAVACA, MORELOS

JUNIO, 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CEIB
CENTRO DE INVESTIGACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Estructura, Función e Ingeniería de Proteínas del centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la asesoría de la Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca No. 596204.

DEDICATORIA

A mi mamá Tomy, por su apoyo incondicional, por su confianza en cada proyecto que emprendo, por enseñarme que todo es posible con tenacidad, por su infinito amor ; te admiro de sobremanera eres mi ejemplo a seguir y te amaré por siempre.

A mi hijo Jesús Fabián por mirarme con esos ojos llenos de amor día tras día, por ser el motor que me impulsa a seguir adelante, a ti Fabián por ser el mejor papá.

A toda mi familia, por estar siempre conmigo y aterrizarme cuando vuelo sin control.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Elba Cristina Villegas Villarreal por abrirme las puertas de su laboratorio LEFIP, mi segundo hogar, en donde he pasado muchos de los mejores momentos de mi vida, le doy las gracias por compartir conmigo parte de sus conocimientos, por su paciencia, pero sobre todo por confiar en mí.

A todo mi comité evaluador, por sus aportaciones a este proyecto, comentarios, correcciones y por animarme en todo momento.

Le agradezco infinitamente a la maestra Laura Lina, como siempre apoyándome incondicionalmente, ahora en esta etapa.

A mis compañeros de laboratorio y amigos por su alegría y apoyo, por esos momentos de felicidad por sus enseñanzas: Dr. Alexis, Mariel, Ely, Héctor, Sepori, Liz, José, Fer, Naye, Moni , Dani, Anita, Diana, Yuriko, Leslie, Jesús, Johana, Celia, Blanca, Peter, Ángel.

A mis amigos y personitas clave en mi vida Mariant, Marco, Víctor, Paty, Rodo, Toño, Sitlali, Omi, Mau, Karen, Bere, Ivonne, Alejandra, Sughey, Pita.

Un especial agradecimiento a la bióloga Fernanda y a Víctor Martínez por guiarme en todos los trámites de manera correcta.

COMISIÓN REVISORA

Dra. Elba Cristina Villegas Villarreal
Tutor principal

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo
Asesor

Dra. Verónica Obregón Barboza
Asesor

Dra. Maura Téllez Téllez
Asesor

M en C Ma. De Lourdes Acosta Urdapilleta
Asesor

Les agradezco infinitamente las correcciones, las enseñanzas, el haberme guiado durante este proceso.

ÍNDICE GENERAL

	Pag.
ÍNDICE GENERAL.....	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Género <i>Pycnoporus</i>	2
1.2 Pigmentos fúngicos producidos por <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	4
2. ANTECEDENTES	6
2.1 Cultivo de hongos.....	6
2.2 Síntesis del ácido 3-hidroxiantranílico y cinabarínico por <i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	9
2.3 Importancia de las enzimas lacasas en la síntesis de los pigmentos de <i>Pycnoporus</i>	11
2.4 Cultivo de <i>Pycnoporus</i> para la producción de enzimas como fenol oxidasas e hidrolasas, ácido 3- hidroxiantranílico (3-HAA), cinabarina y ácido cinabarínico.	12
2.5 Actividad insecticida de <i>Pycnoporus</i>	16
2.6 <i>Diatraea magnifactella</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i>	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS	20
5.1 Objetivo general.....	20
5.2 Objetivos particulares	20
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1 Estrategia experimental general	21
6.2 Obtención de los sobrenadantes	22
6.2.1 Organismos	22
6.2.2 Medios de Cultivo	22
6.2.3 Cultivo en caja Petri.....	22
6.2.4 Cultivo solido en espuma de poliuretano (Puf) como soporte inerte en matraz	23
6.2.5 Cultivo en reactor tanque agitado	23
6.2.6 Cultivo en reactor airlift	23
6.2.7 Obtención de los sobrenadantes	24
6.2.8 Análisis de cromatografía en capa fina	24
6.2.9 Determinación de la concentración del AC y 3-HAA por HPLC	25
6.3 Bioensayos de la actividad insecticida	27
6.3.1 Bioensayo de microinyección.....	27
6.3.1.1 Bioensayo para determinar la LD ₅₀ del 3-HAA en <i>Spodoptera frugiperda</i>	28

6.3.1.2 Evaluación de la respuesta crónica	28
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
7.1 Obtención de los extractos	29
7.2. Identificación de pigmentos.....	29
7.2.3 Determinación pigmentos por HPLC.....	32
7.2.3.3 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-74 en cultivo sólido Puf	34
7.2.3.4 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-53 en cultivo sólido Puf	35
7.2.3.5 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-53 del cultivo en STR .	36
7.2.3.6 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-53 del cultivo en AL ...	37
7.3.1. Evaluación de la actividad insecticida por microinyección	38
7.3.3 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de la toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-74 en <i>Spodoptera frugiperda</i>	40
7.3.4 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-53 en <i>Spodoptera frugiperda</i>	41
7.3.5 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-53 en STR evaluada en <i>Spodoptera frugiperda</i>	42
7.3.6 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-53 en AL evaluada en <i>Spodoptera frugiperda</i>	43
7.3.7 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección del ácido 3-HAA comercial en <i>Spodoptera frugiperda</i>	44
7.4 Efecto sinérgico del Ac. Cinabaránico y 3-hidroxiantranílico en las muestras con mayor mortalidad.....	45
7.5 Evaluación de la respuesta crónica	46
8. CONCLUSIONES	48
9. LITERATURA CITADA.....	49
Anexos.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. <i>Distribución de subespecies de Pycnopus</i>	3
Figura 2. Carpóforo de <i>Pycnopus cinnabarinus</i>	4
Figura 3. Estructura Base fenoxazina con numeración de radicales.	5
Figura 4. Sistemas de fermentación	8
Figura 5. Biosíntesis del ácido cinabarínico.	10
Figura 6. Comparación de la estructura de los pigmentos de <i>Pycnopus cinnabarinus</i> y la actinomicina D.	10
Figura 7. Ciclos de vida de <i>Diatraea magnifactella</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i>	18
Figura 8. Cromatograma en él que se observa el pico correspondiente al ácido cinabarínico (AC) con tiempo de retención en el minuto 23, indicado con una flecha.	25
Figura 9. Cromatograma en él que se observa el pico correspondiente al ácido cinabarínico Ac. 3-HAA con tiempo de retención en el minuto 3, indicado con una flecha.	26
Figura 10. Inyección de larvas.	27
Figura 11. <i>Porcentaje de mortalidad de larvas de Spodoptera frugiperda tratadas con extractos de la cepa HEMIM-53</i>	41
Figura 12. TLC de extractos de cuerpo fructífero cepas 51, 53 y 71 de <i>Pycnopus cinnabarinus</i> , a) A simple vista y b) con luz UV a 253nm.	31
Figura 13. Registro visual de 15 días de la respuesta crónica de la cepa HEMIM-53 en <i>Diatraea magnifactella</i>	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Pigmentos reportados por Días y Urban, 2009.	5
Tabla 2. Factores que interfieren en el metabolismo del hongo	9
Tabla 3. Producción de ácido cinabárínico y enzimas en medios líquidos(matraz)	13
Tabla 4 Cultivo de <i>Pycnoporus</i> en reactores	14
Tabla 5 Cultivo sólido	15
Tabla 6 Bioensayos para evaluar los extractos obtenidos diariamente	28
Tabla 7 Efecto sinérgico del Ac. Cinabárínico y Ac. 3-HAA en las muestras con mayor mortalidad	46

ÍNDICE DE GRÁFICAS

		Pág.
Gráfica 1.	Curva estándar del ácido cinabárínico, 2) Curva estándar del ácido 3-HAA elaborada por Guadarrama, 2016.	32
Gráfica 2.	Curva estándar del ácido 3-HAA.	32
Gráfica 3.	Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabárínico de la cepa HEMIM-51 en cultivo sólido Puf	33
Gráfica 4.	Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabárínico de la cepa HEMIM-74 en sobrenadantes del cultivo sólido Puf	34
Gráfica 5.	Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabárínico cepa HEMIM-53 en cultivo sólido Puf	35
Gráfica 6.	Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabárínico cepa HEMIM-53 del cultivo en reactor tanque agitado	36
Gráfica 7.	Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabárínico cepa HEMIM-53 cultivada en reactor Air Lift	37
Gráfica 8.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con extractos de la cepa HEMIM-51	38
Gráfica 9.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Diatraea magnifactella</i> tratadas con extractos de la cepa HEMIM-51	39
Gráfica 10.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con extractos de la cepa HEMIM-74	40
Gráfica 11.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Diatraea magnifactella</i> tratadas con extractos de la cepa 51.	38
Gráfica 12.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> con extractos de la cepa HEMIM-53 cultivada en STR	42
Gráfica 13.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> con extractos de la cepa HEMIM-53 cultivada en AL	43
Gráfica 14.	Porcentaje de mortalidad de larvas de <i>Spodoptera frugiperda</i> tratadas con cinco concentraciones diferentes de ácido 3-hidroxiantranílico	44
Gráfica 15.	Cálculo de LD ₅₀ con el programa Probit	45

Abreviaturas

3-HAA	Ácido 3-hidroxiantranflico(por sus siglas en ingles)
AC	Ácido cinabarínico.
AL	Air Lift
ATCC	Colección americana de cultivos tipo.
HEMIM	Herbario micológico de Morelos.
HIT	Harina integral de trigo.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia.
MIC	Concentración mínima inhibitoria.
MMT	Medio modificado de Téllez-Téllez <i>et al</i> , 2008.
MT	Medio de Téllez-Téllez <i>et al.</i> , 2008.
PDA	Agar papa-dextrosa.
Rf	Frente de retención.
STR	Reactor tanque agitado
TLC	Cromatografía en placa fina.
UV	Ultravioleta.
Vvm	Volumen de aire por volumen de líquido en un minuto.
Rpm	Revoluciones por minuto.

RESUMEN

Los hongos basidiomicetes son interesantes para muchos grupos de investigación y compañías biotecnológicas ya que tienen la capacidad de producir varias enzimas como hidrolasas y oxidasas, entre éstas últimas destacan las lacasas con aplicaciones industriales como el blanqueamiento de la pulpa para el papel, tratar los desechos en la industria de las aceitunas, y de hidrocarburos derivados del petróleo. Entre los basidiomicetos destaca el género *Pycnoporus* ya que produce metabolitos, así como fenoxazina consideradas como flavonoides o pigmentos. con actividad biológica que abarcan desde agentes antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, con interesantes posibilidades de biosíntesis, lo que ha hecho conveniente investigar a estos organismos. Sin embargo existen pocos estudios respecto a la actividad insecticida de ésta especie, por lo que en este trabajo se investigó el efecto insecticida de los sobrenadantes de tres cepas del basidiomicete *Pycnoporus cinnabarinus* cepas HEMIM-51,53 y 74 cultivado en fermentación sólida usando espuma de poliuretano(Puf) como soporte inerte, y de la cepa HEMIM-53 cultivada en Puf, reactor Airlift y reactor tanque agitado; el efecto fue evaluado mediante microinyección en el pronotum de larvas de *Spodoptera frugiperda* o gusano cogollero del maíz y *Diatraea magnifactella* del tercer instar. Posterior a la inyección se mantuvieron las larvas en una dieta meridica y en observación durante 96 horas, registrando efectos como parálisis rígida y muerte determinándose el efecto insecticida de los extractos. Además, se calculó una LD₅₀ de Ac. 3-HAA de 22.54 µg/g de larva. El sobrenadante más eficiente fue el obtenido de la cepa HEMIM-51 cultivada en fermentación sólida en Puf ya que alcanzó una mortalidad del 86%.

1. INTRODUCCIÓN

El estudio de las interacciones sinérgicas, antagónicas, o de comensalismo, etc., han hecho posible la identificación y caracterización de una gran cantidad de metabolitos secundarios que presentan un amplio espectro de actividades biológicas tanto en bacterias como en hongos (Brizuela *et al.*, 1998). Dichos compuestos se producen mediante diferentes rutas metabólicas debido a diversos mecanismos en el caso de actividades antifúngicas, antivirales, citostáticas y reguladores del crecimiento. Sin embargo, se han reportado diversos tipos, además de las antes mencionadas como los antibióticos e insecticidas en caso de mecanismos de defensa (Guhong *et al.*, 2007).

En el manejo integral de plagas existe una oportunidad de aplicar compuestos con propiedades insecticidas de origen natural en lugar de compuestos químicos que sean específicos para cada tipo de insecto, inhibiendo su crecimiento e, interfiriendo en el desarrollo de su ciclo biológico, finalmente causando su muerte. Algunos hongos basidiomicetos no son consumidos por insectos como *Lepista cliticibe* o *Cantharellus*, aun tratándose de hongos comestibles para los humanos, lo que ha llamado la atención entre los investigadores que han aislado compuestos insecticidas de ellos como: amatoxinas, falotoxinas, ácido ibotenico, lectinas, así como hemolisinas, a las cuales se les atribuyen propiedades insecticidas (Wang *et al.*, 2002).

Dentro de los hongos basidiomicetes se encuentra el género *Pycnoporus* que producen varios metabolitos de interés biotecnológico, además de enzimas hidrolasas y oxidasas, así como pigmentos con actividad insecticida (Díaz *et al.*, 2010). En nuestro grupo de investigación se ha demostrado que los extractos de cuerpos fructíferos, así como los sobrenadantes del crecimiento en cultivo líquido en matraz y reactores entre varias cepas del género *Pycnoporus* presentan actividad insecticida, siendo la cepa más interesante por dicha propiedad *Pycnoporus cinnabarinus* HEMIM-51.

1.1 Género *Pycnopus*

Este género pertenece al *phylum* Basidiomycota, al orden Poliporales, y a la familia *Polyporaceae*; los hongos de este género son conocidos por ser fuertemente ligninolíticos y por su eficiencia para degradar madera. *Pycnopus* se ha usado para evaluar barnices de recubrimiento y madera para la construcción de barcos (Trouvalet *et al.*, 2007). Forman un grupo cosmopolita de cuatro especies clasificados de acuerdo con sus características morfológicas: *Pycnopus sanguineus*, *Pycnopus coccineus*, *Pycnopus puniceus* y *Pycnopus cinnabarinus* (Lomascolo *et al.*, 2011). Se encuentran distribuidos en regiones tropicales y subtropicales en áreas como el hemisferio norte, en África, India y América.

En el año 2011, se llevó a cabo un estudio respecto a la relación filogeográfica que guardaban 36 cepas de *Pycnopus* obtenidas de diferentes partes del mundo. Utilizando técnicas moleculares se logró la más reciente clasificación por medio de marcadores de ADN ribosomal con fragmentos ITS-5.8S - ITS2, posteriormente basado en una región parcial del gen de la β tubulina y finalmente en la secuencia parcial del gen de las lacasas (lacc1, 2, y 3). Con lo que se obtuvo la clasificación de 6 subespecies: *Pycnopus sanguineus sensu stricto* neotrópico, *Pycnopus cf. sanguineus* paleotrópico, *Pycnopus coccineus sensu stricto* Oceanía, *Pycnopus cinnabarinus* Europa, *Pycnopus cf. coccineus* Asia oriental y *Pycnopus puniceus* (Lesage-Messen *et al.*, 2011), en la figura 1, se muestra un mapa con la distribución de las subespecies antes mencionadas.

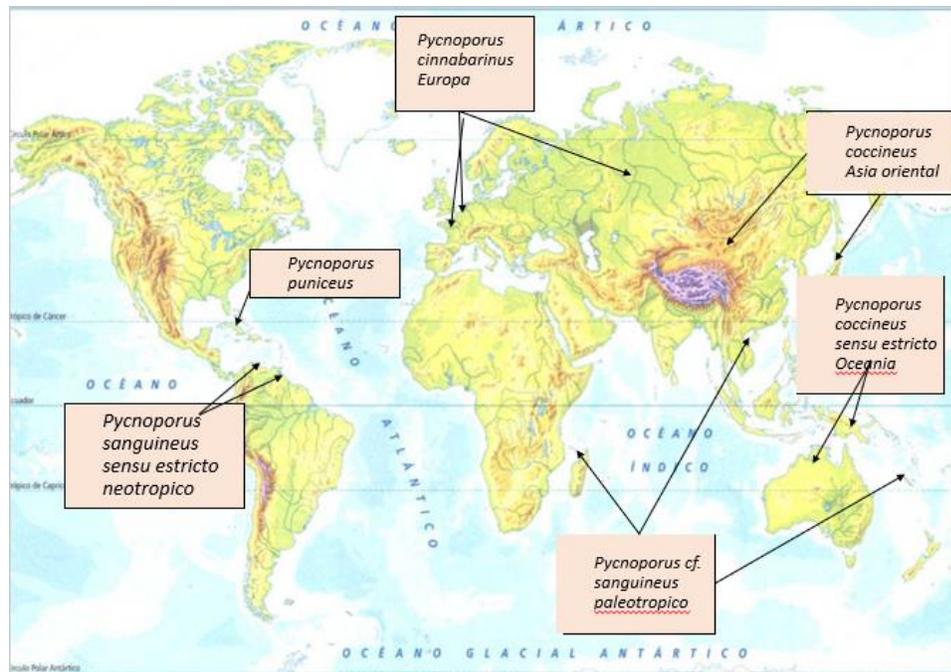


Figura 1. Distribución de subespecies de *Pycnoporus*

Al género *Pycnoporus* se le puede encontrar sobre troncos caídos, incluso sobre madera quemada, son anuales, con forma de abanico o flabeliformes, se encuentran adheridos al sustrato por la base por lo que no se le observa el pedúnculo (Papinutti, 2013). Presenta una consistencia dura, tiene una longitud de 2 a 6 cm de diámetro, con la superficie lisa y zonas ligeramente marcadas como se ilustra en la figura 2 tomada en campo por Díaz., 2010.

Una característica de este género es el intenso color rojo anaranjado conferido por los compuestos cinabarina, tramesanguina y ácido cinabarínico los cuales son importantes por sus propiedades biotecnológicas (Lomascolo *et al.*, 2011).



Figura 2. Carpóforo de *Pycnoporus cinnabarinus*.

1.2 Pigmentos fúngicos producidos por *Pycnoporus cinnabarinus*

Se ha reportado que las especies de *Pycnoporus* pueden producir hasta ocho diferentes pigmentos con una base estructural fenoxazina 3-1 (Achembach y Blüm., 1991), que se ejemplifica en la figura 3. Por otra parte, se muestran los nombres y fórmulas de los pigmentos con esta estructura fenoxazina 3-1 más conocidos y que se han elucidado entre ellos Cinabarina, Tramesanguina, Ácido cinabarínico, Cinabarina o-Acetil, Ácido 2-amino-9-formilfenoxazona-1-carbónico, Ácido métil éster 9-hidroximetil-2-metilamino-fenoxazona-1-carbónico, Fenoxazona y Picnoporina, en la tabla 1 (Días y Urban, 2009). Algunos pigmentos y en particular el ácido cinabarínico han mostrado actividad antiviral en raptovirus a concentración de 0.31 mg/mL (Smânia *et al.*, 2003) y actividad bactericida contra bacterias patógenas Gram positivas y negativas presentando valores de concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de 0.17-5.9 mg/mL, por lo que este compuesto es un antibiótico que tiene potencial de uso farmacológico en humanos, animales y plantas (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010).

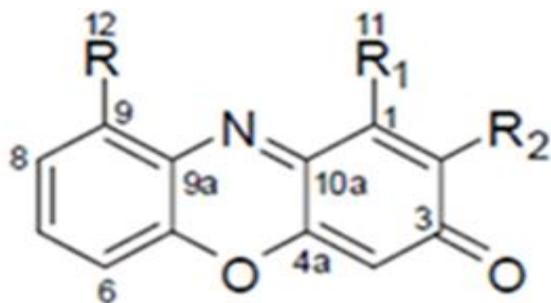


Figura 3. Estructura Base fenoxazina con numeración de radicales.

Tabla 1. Pigmentos reportados por Días y Urban, 2009

Pigmentos	R	R ₁	R ₂
Cinabarina	CH ₂ OH	COOH	NH ₂
Tramesanguina	CHO	COOH	NH ₂
Ácido cinabarínico	COOH	COOH	NH ₂
Cinabarina o-Acetil	CH ₂ OAc	COOH	NH ₂
Ácido 2-amino-9-formilfenoxazona-1-carbónico	CHO	COOH	NH ₂
Ácido métil éster 9-hidroximetil-2-metilamino - fenoxazona-1-carbónico	CH ₂ OH	COOCH ₃	NHCH ₃
Fenoxazona	H	H	H
Picnoporina	CH(OCH ₃) OH	COOH	NH ₂

2. ANTECEDENTES

2.1 Cultivo de hongos

Desde diversos puntos de vista el cultivo de hongos ha tenido un creciente interés ya que constituyen uno de los grupos metabólicamente más diversos; tradicionalmente los hongos han sido usados en ceremonias religiosas, medicina y como un componente importante en la alimentación. Representan una fuente de alto contenido nutricional en la dieta humana, y actualmente muchos de sus metabolitos secundarios tienen interés biotecnológico. Generando la búsqueda de nuevos metabolitos en estos hongos, así como alternativas para producirlos rápidamente y de manera constante; modificando condiciones, técnicas y medios de cultivo, usando inductores para estimular la síntesis de enzimas y pigmentos.

Se sabe que tanto los sistemas, así como, los medios de cultivo que se usan influyen en el metabolismo del hongo produciendo cambios en su crecimiento, asociados a un comportamiento fisiológico debido a la expresión diferencial de sus genes en respuesta a los cambios morfológicos y en la producción de metabolitos. En las últimas décadas se han estudiado diferentes sistemas de cultivo como la fermentación sólida, líquida y sólida por adhesión a superficies (Ludeña, 2017). Así como el efecto del uso de diferentes inductores en el medio de cultivo favoreciendo la expresión de dichos metabolitos. En el cultivo de hongos en soportes sólidos se han utilizado materiales lignocelulósicos, aplicando las técnicas tradicionales para el cultivo de hongos comestibles como *Agaricus bisporus* y *Pleurotus ostreatus*. Para *Pycnoporus* el tiempo de cultivo para obtener los cuerpos fructíferos en sustrato sólido es superior a 250 días, aunque se han obtenido buenos rendimientos de producción de pigmentos, se requiere demasiado tiempo para obtenerlos a partir del cuerpo fructífero (Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010). El cultivo sumergido ha sido el de mayor atención, debido a que es una alternativa muy eficiente y reproducible para obtener micelio, biomasa y metabolitos fúngicos (Petre, 2015). Ya que provee la oportunidad de producir altas concentraciones de compuestos bioactivos como proteínas (enzimas), aminoácidos esenciales, vitaminas, enzimas, biomasa y polisacáridos; con la opción de escalar los procesos desde laboratorio hasta nivel industrial en biorreactores de tanque agitado o de flujo

ascendente de aire (Airlift). Otro sistema de cultivo es el sólido, este tipo de fermentación sólida permite al hongo crecer de una forma más parecida a como lo hace en la naturaleza y algunas veces aumentar la producción de sus metabolitos secundarios. Una modalidad es crecer al hongo en un sustrato que le provea de todos los nutrientes y al crecer lo degrade, como se realiza para obtener hongos comestibles, medicinales o productores de metabolitos de interés biotecnológico como enzimas o antimicrobianos (Acosta *et al.*, 2010). Otra modalidad es cuando el medio de cultivo se embebe en un soporte inerte que pueden ser esferas de amberlita, una resina funcional (Villegas *et al.*, 1993, Auria *et al.*, 1990) o cubos de espuma de poliuretano entre otros (Zhu *et al.*, 1994, Téllez-Téllez *et al.*, 2008). En la figura 4 se ilustran los sistemas de fermentación. En la tabla 2 se resumen varios procesos de obtención de metabolitos secundarios, inductores y composición de los medios de cultivo que se han utilizado en el cultivo de *Pycnoporus*.



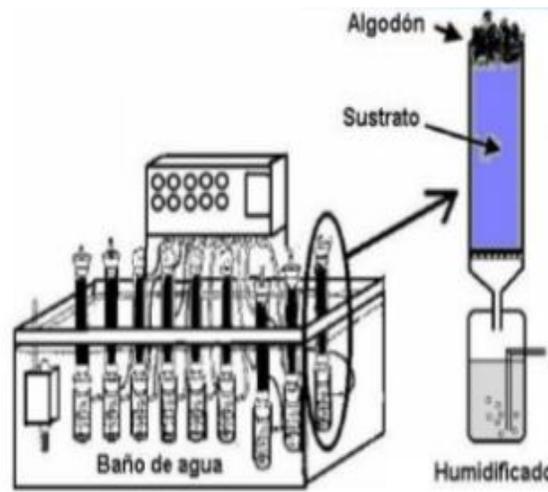
a)



b)



c)



d)



e)



f)



g)

Figura 4. Sistemas de fermentación: a) cultivo en bolsa con sustratos lignocelulósicos; b) cultivo en caja Petri con medio PDA; c) cultivo sólido con espuma de poliuretano como soporte inerte y medio líquido (puf); d) reactor en estado sólido, modelo de columnas; e) cultivo en matraz con medio líquido MT; f) cultivo en reactor Airlift con medio líquido MT; g) cultivo en reactor tanque agitado con medio líquido MT.

Tabla 2. Factores que interfieren en el metabolismo del hongo

Método de producción	Inductores	Fuente de carbono	Fuente de nitrógeno
Bolsa de polipapel	CuSo4	Glucosa	Extracto de levadura
Caja Petri	Metanol	Fructosa	Urea
Matraz	Xilidina	Galactosa	Aceite de soya
Reactores	Guaiacol	Celulosa	Sulfato de amonio
Soportes inertes	Etanol	Manosa	peptona
	DMSO	Maltosa	Extracto de malta
	Ácido felúrico	Xilosa	
	Alcohol veratril		

Meza *et al.*, 2006; Rodríguez y Toca, 2007; Tellez-Tellez *et al.*, 2008 Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010; Lomascolo *et al.*, 2011; Ramírez-Cavazos *et al.*, 2014; Göçenoğlu *et al.*, 2014; Cruz-Muñoz *et al.*, 2015

2.2 Síntesis del ácido 3-hidroxiantranílico y cinabarínico por *Pycnoporus cinnabarinus*

El ácido cinabarínico es un compuesto sintetizado a partir de la oxidación de su precursor, el ácido 3-hidroxiantranílico, 3-HAA, por las enzimas tirosinasas, peroxidases y fenoxazina-sintasa y lacasas (Eggert *et al.*, 1997,). (Figura 5). El ácido es en la vía del ácido Shikimico o del Shikimato es un intermediario en la síntesis del triptófano y el ácido cinabarínico y la producción de otros pigmentos. A su el 3-HAA puede ser precursor o base en la síntesis de otros antibióticos como la actinomicina D y sus derivados tal como se muestra en la figura 6, un antibiótico polipeptídico aislado de bacterias del género *Streptomyces* (PubChem, 2016), pero sin la toxicidad de la actinomicina que provoca reacciones secundarias al ser suministradas en humanos y por lo tanto ahora se usa como anticancerígeno más que antibiótico (Göçenoğlu y Pazarlioglu 2014).

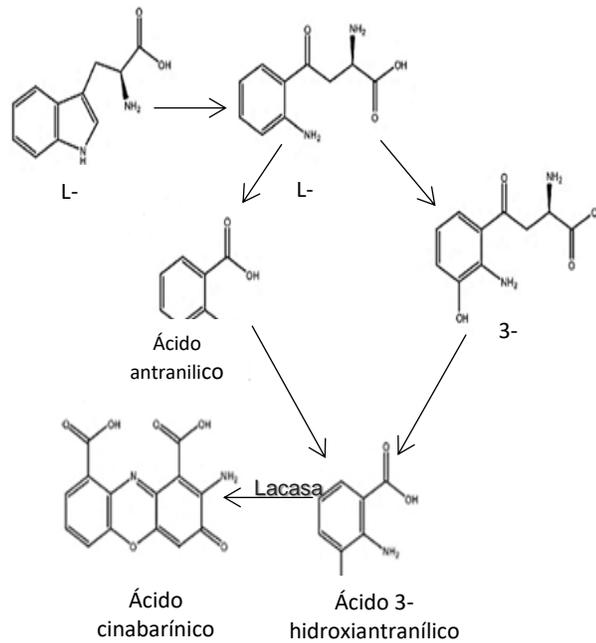


Figura 5. Biosíntesis del ácido cinabarínico

Otro compuesto importante que sintetizan varias especies de *Pycnoporus* es la cinabarina, que se encuentra en mayor proporción en cuerpos fructíferos (Días *et al.*, 2009). La cinabarina difiere del ácido cinabarínico en que este último tiene dos grupos radicales ácidos en la posición R y R1 y la cinabarina en la posición R tiene un grupo CH₂OH (Tabla 1). El ácido 3HAA es un sustrato precursor de la cinabarina, un antibiótico de amplio espectro. La dosis letal media de cinabarina LD₅₀ en ratones por vía oral corresponde a 1000 mg/kg mientras que para la actinomicina D es de 13 mg/Kg, si bien es 70 veces más grande la LD₅₀ de la cinabarina, esto sugiere que se requiere de una gran cantidad de cinabarina para provocar algún efecto adverso además de que tiene la ventaja de la ausencia de reacciones secundarias (Liu *et al.*, 2005).

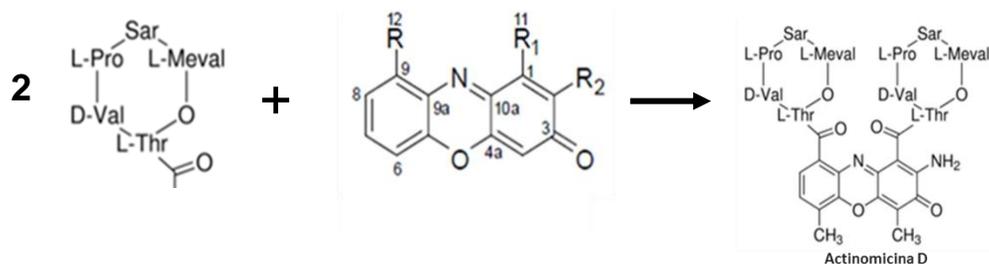


Figura 6. Comparación de la estructura de los pigmentos de *P. cinnabarinus* y la actinomicina

2.3 Importancia de las enzimas lacasas en la síntesis de los pigmentos de *Pycnoporus*

Las lacasas pertenecen a la familia de las enzimas fenoloxidasas, multicobre, se pueden encontrar en plantas y hongos, aunque recientemente se han identificado en bacterias. Particularmente en hongos del género *Pycnoporus*, las lacasas son segregadas al medio por el micelio, son glicoproteínas monoméricas extracelulares cuya función en la naturaleza es catalizar reacciones de degradación de la lignina para la obtención de energía, producción de radicales libres fenólicos y metabolitos antioxidantes u otros monómeros para la síntesis de otros compuestos como biomasa, antibióticos, enzimas y melanina. Las fenoloxidasas, son capaces de oxidar una amplia gama de compuestos fenólicos (orto, para, amino y polifenoles), entre ellos lignina siendo el O₂ reducido a H₂O. Además, poseen una gran importancia en muchos procesos biotecnológicos en la industria alimenticia, textil, cosmética, del papel, etc. (Rodríguez y Toca., 2006). La producción de lacasas depende de las condiciones de cultivo como: concentraciones de carbono y nitrógeno, adición de surfactantes como tween 80 y la presencia de inductores y de iones metálicos como cobre (Lomascolo *et al.*, 2011).

Se producen además otras enzimas como hidrolasas entre ellas amilasas, pectinasa, invertasas y xilanasas entre otras con un efecto catalítico hidrolizante degradan celulosa para producir glucosa.

2.4 Cultivo de *Pycnoporus* para la producción de enzimas como fenol oxidasas e hidrolasas, ácido 3- hidroxiantranílico (3-HAA), cinabarina y ácido cinabarínico.

Se han investigado medios de cultivo y diferentes condiciones en varios sistemas para la producción de pigmentos provenientes de *Pycnoporus*. Como cultivo en medio líquido en matraz y reactores, en la tabla 3 se observa un listado de trabajos en los cuales se evaluó la producción de ácido cinabarínico en cultivo en líquido usando algunos inductores para la producción de lacasas y algunas hidrolasas. Por otra parte, en la tabla 4 se resumen el cultivo de *Pycnoporus* en reactores con la finalidad de producir enzimas y pigmentos.

En sustrato sólido tanto en placa de Petri, bolsas de polipapel como en espuma de poliuretano, los resultados dependiendo de los medios y los rendimientos obtenidos se muestran en la tabla 5 (Smânia *et al.*, 1997; Baumer *et al.*, 2008; Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010; Göçenoğlu y Pazarlioglu., 2014). Además, se han establecido las técnicas para evaluar y cuantificar 3-HAA, cinnabarina y ácido cinabarínico mediante TLC, absorbancia y HPLC, así como biomasa, consumo de azúcares, actividad antibiótica e insecticida (Adame 2008, Acosta-Urdapilleta *et al.*, 2010; Ponce 2012; coronel, 2016; Guadarrama 2016). y Puf en los cultivos en matraz y en biorreactores se logra incrementar la actividad de lacasas, sin embargo, la concentración de ácido cinabarínico se mantiene en el mismo rango de concentración.

Tabla 3. Producción de ácido cinabaránico y enzimas en medios líquidos(matraz)

Autor	Sustrato	Cepa	Pigmentos y enzimas	Días	Rendimiento
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010	Medio liquido con 3% bran flakes(hojuelas de salvado de trigo) en 60 mM de buffer de fosfato de potasio, at 28°C and 250 rpm,	*HEMIM-51	Lacasas	7	/
Guadarrama, 2016	Medio MT con Glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L CuSO ₄ 0.01 g/L	*HEMIM-79	Lacasas Ác. Cinabaránico	7	8,000 U/L 2.5 µg/mL
*Cuevas, 2017 Trabajo en proceso	Optimizado para producir pigmentos Glucosa Extracto de levadura Sulfato de cobre	*HEMIM-53	Lacasas Ác. cinabaránico	15	519,500 U/L 13.3µg/mL
Amezcuca, 2017	Medio MT con Glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, y CuSO ₄ 0.01 g/L	*HEMIM-51	Lacasas Celulasas Xilanasas Amilasas	15	54,000 U/L 106 U/L 300 U/L 220 U/L
López, 2017	Medio MT con Glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, y CuSO ₄ 0.01 g/L	*HEMIM-74	Lacasas Celulasas Xilanasas Amilasas	15	17,860 U/L 55 U/L 65 U/L 65U/L

*HEMIM= Herbario Micológico de Morelos

Tabla 4. Cultivo de *Pycnoporus* en reactores

Autor	sustrato	Cepas	sistema	Pigmentos y enzimas	Días	Rendimiento
Díaz-Godínez <i>et al.</i> , 2016	Medio con glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L CuSO ₄ (0.25 g/L)	*HEMIM-79	Airlift	Lacasas	15	200 U/L
Guadarrama 2016	Medio con glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L CuSO ₄ (0.25 g/L)	*HEMIM-53	Airlift	Lacasas Ac. cinabaránico	15	8000 U/L 14 µg/mL
Guadarrama 2016	Medio con glucosa 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, CuSO ₄ (0.25 g/L)	*HEMIM-53	Tanque agitado	Lacasas Ac. cinabaránico	15	40,000 U/L 12 µg/mL

Tabla 5. Cultivo sólido

Autor	Sustrato	Sistema	Pigmentos y enzimas	Tiempo días	Rendimiento
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010 HEMIM-51	PDA con aserrín de cedro, pino y encino.	Caja Petri	cinnabarina	7	7 mg/gr
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010 HEMIM-52	Harina integral medio HIT	Caja Petri	Cinnabarina	7	8 mg/gr
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010 HEMIM-52	Paja de avena	Bolsa de polipapel	Cinnabarina	250	25mg/gr
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010 HEMIM-53	PDA con aserrín de cedro	Caja Petri	cinnabarina	7	6 mg/gr
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010 HEMIM-53	Aserrín de cedro	Bolsa de polipapel	cinnabarina	250	62 mg/gr
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010 HEMIM-54	PDA con aserrín de cedro	Caja de Petri	cinnabarina	7	
Acosta-Urdapilleta <i>et al.</i> , 2010 HEMIM-54	Paja de cedro	Bolsas de polipapel	cinnabarina	250	68 mg/g
Amezcuca, 2017 HEMIM-51	Medio MT Glucosa 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, CuSO ₄ 0.01 g/L	Puf (espuma de poliuretano)	1. Lacasas 2. Ac. cinabarínico	16	1. 0.58 U/L 2. 1.40 µg/mL
López, 2017 HEMIM-74	Medio MT Glucosa 10 g/L, Extracto de levadura 5 g/L, CuSO ₄ 0.01 g/L	Puf (espuma de poliuretano)	1. Lacasas 2. Ac. cinabarínico	16	1. 1.0 U/L 2. 0.6 µg/mL

2.5 Actividad insecticida de *Pycnopus*

La actividad insecticida del género *Pycnopus* ha sido poco investigada, existe un reporte donde fue evaluada contra mosquitos *Aedes aegypti* y *Anopheles nuneztovari*. Buccker y colaboradores en el 2013 probaron cinco concentraciones de los extractos acuosos de cuerpos fructíferos silvestres de *Pycnopus sanguineus* en el rango de 100, 200, 300, 400 y 500 ppm, se determinó una concentración letal media, $CL_{50} = 156.8$ ppm. Hernández en el 2014, realizó un trabajo de tesis en el que evaluó el efecto insecticida de los extractos acetónicos de cuerpos fructíferos cultivados en aserrín de cedro de *Pycnopus sanguineus* contra el lepidóptero *Spodoptera frugiperda* (plaga del maíz) y obtuvo una dosis letal media, $DL_{50} = 1.183$ mg/gr mediante bioensayos de microinyección en larvas del tercer instar.

Se realizaron también pruebas a través de la ingesta, usando diferentes concentraciones de extracto en el rango de 2.4 hasta 9.6 mg/mL adicionadas a la dieta meridica, como resultado se observó un efecto de retraso en el crecimiento y causando algunas malformaciones como falta de patas y alas en adultos. Además, se demostró que dichos extractos no produjeron un efecto disuasivo para que las larvas dejaran de comer.

Recientemente Díaz-Godínez y colaboradores en el 2016, en una estancia sabática en nuestro laboratorio, evaluaron la actividad enzimática, antioxidante, antimicrobiana e insecticida del filtrado de la fermentación de *Pycnopus cinnabarinus* cepa HEMIM-79 producido en reactor airlift, se tomaron muestras cada 24 horas. Los extractos presentaron actividad antibacteriana en *E. coli* y *S. aureus*; el extracto obtenido a las 240 horas (10 días) de cultivo presentó efecto bacteriostático y a 264 horas (11 días) y 288 (12 días) horas de fermentación se observó un efecto bactericida. La dosis letal media para larvas de *Diatraea magnifactella* (plaga de la caña de azúcar) se determinó por medio de microinyección. Con un valor de LD_{50} de 25.03 μ g/mL. Cabe destacar que es el primer reporte de actividad insecticida presente en extractos provenientes de fermentación en reactor Airlift (Díaz *et al.*, 2010).

Las interesantes actividades biológicas, particularmente la actividad insecticida que presentan los extractos del hongo *Pycnoporus* ofrecen una alternativa en la búsqueda constante de metabolitos que ayuden a disminuir el uso de productos químicos para el control de plagas de importancia económica como son algunos lepidópteros que generan grandes pérdidas en la industria agropecuaria, plagas como *Diatraea magnifactella* y *Spodoptera frugiperda*.

2.6 *Diatraea magnifactella* y *Spodoptera frugiperda*

El lepidóptero *Diatraea magnifactella* conocido comúnmente como barrenador de la caña de azúcar se encuentra ampliamente distribuido en las zonas cañeras de México, se ha reportado su presencia en estados como: Campeche, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz y Morelos; donde el cultivo de caña está ampliamente desarrollado (Rodríguez, 2009).

Esta plaga se alimenta de los tallos de la caña de azúcar y con esto favorece a la entrada de patógenos secundarios, es difícil llevar a cabo un control efectivo ya que la mayor parte de su ciclo de vida se encuentra en estadio larval como se ilustra en la figura 7 además de que son de hábitos crípticos, durante este tiempo permanece en el tallo de las plantas (Cuevas-Molina *et al.*,2015).

Diatraea magnifactella



Spodoptera frugiperda

Cruz, 2015 y Rodríguez, 2009

Figura 7. Ciclos de vida de *Diatraea magnifactella* y *Spodoptera frugiperda*

Otra plaga importante es *Spodoptera frugiperda*, originaria de América con amplia distribución, aunque recientemente se ha encontrado en África; este lepidóptero causa mayores daños en cultivos con importancia económica como: Maíz, arroz, sorgo y caña de azúcar, algodón entre otras ya que es polífago; en México principalmente ataca los cultivos de maíz por ello es conocido como gusano cogollero del maíz. Estos lepidópteros generan pérdidas importantes en el rendimiento de los cultivos (Rodríguez del Bosque *et al.*, 2008), por lo que es necesario encontrar alternativas para su tratamiento que sean novedosas, efectivas y que no dañen al ambiente. Anteriormente se ha mencionado que los pigmentos del hongo *Pycnoporus cinnabarinus* particularmente el ácido cinabarinico presentan actividades biológicas interesantes, como antiviral, citotóxica, antioxidante, antifúngica e insecticida, útiles en aplicaciones biotecnológicas, en diversas áreas como la industria alimenticia, cosmética y el área de control biológico.

Aun así, su actividad insecticida ha sido poco investigada (Buccker *et al.*, 2013; Hernández, 2014; Díaz *et al.*, 2016). Por lo que en este trabajo nos proponemos estudiar la actividad insecticida de extractos de *Pycnoporus* obtenidos con diferentes sistemas o métodos de cultivo.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido al incremento en la resistencia a productos químicos en el control de plagas, es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas para combatirlas que sean menos agresivas con el ambiente y menos dañinas a la salud humana; con la inquietud de investigar nuevas fuentes de moléculas con potencial insecticida. En este trabajo se pretende determinar el potencial insecticida de los sobrenadantes del cultivo líquido *Pycnoporus cinnabarinus* HEMIM-53 en reactores tanque agitado y airlift frente a *Spodoptera frugiperda*. Así como el efecto de los sobrenadantes del cultivo sólido Puf de las cepas de *Pycnoporus cinnabarinus* HEMIM-51, 53 y 74 sobre *Spodoptera frugiperda* y *Diatraea magnifactella* mediante ensayos de microinyección e ingesta.

4. HIPÓTESIS

Los sobrenadantes del cultivo en líquido y sólido (Puf), de las cepas de *Pycnoporus cinnabarinus* HEMIM-51, 53 y 74 tendrán actividad insecticida contra larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Diatraea magnifactella*.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar la actividad insecticida de los sobrenadantes de las cepas HEMIM- 51, 53 y 74 obtenidos del cultivo de *Pycnoporus cinnabarinus* en fermentación líquida y sólida.

5.2 Objetivos particulares

- Obtener los sobrenadantes de *Pycnoporus cinnabarinus* HEMIM- 51, 53 y 74, a partir de fermentación líquida y sólida.
- Determinar la concentración de ácido cinabarínico y ácido 3-hidroxiantranílico en los sobrenadantes del cultivo.
- Evaluar la actividad insecticida de los sobrenadantes mediante ensayos de microinyección en larvas de lepidópteros.
- Estimar el efecto crónico de los sobrenadantes en la dieta de larvas de lepidópteros.

6. METODOLOGÍA

6.1 Estrategia experimental general

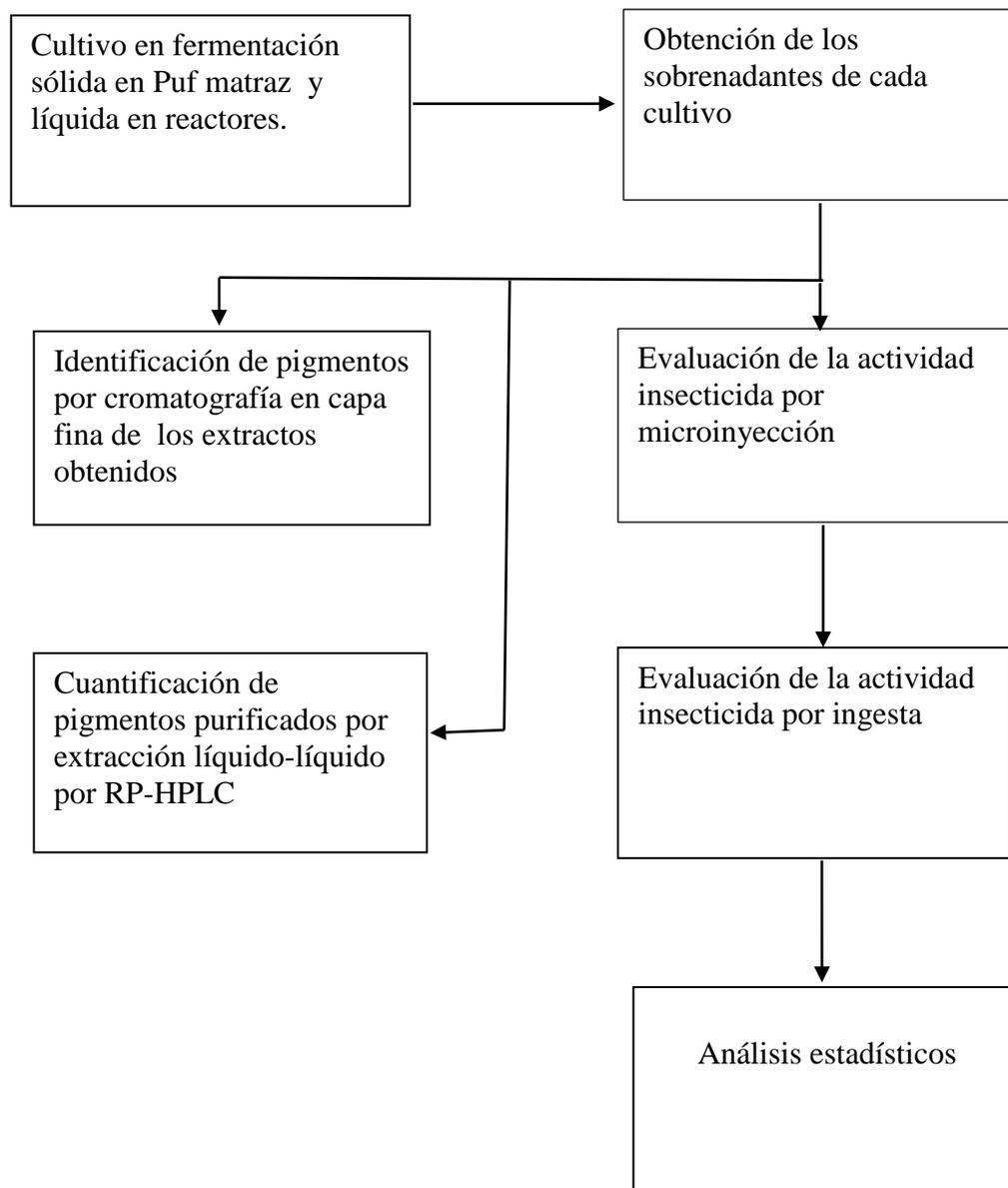


Diagrama 1. Metodología

6.2 Obtención de los sobrenadantes

6.2.1 Organismos

Las cepas de *Pycnoporus* HEMIM-51, 53 y 74 fueron proporcionadas por la maestra Lourdes Acosta Urdapilleta las cepas pertenecen al HEMIM (Herbario Micológico de Morelos), del Centro de Investigaciones Biológicas; de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y también se encuentran preservadas en el Laboratorio de Estructura Función e Ingeniería de Proteínas en gliceroles a temperatura de -80°C y también se mantienen viables. Los cultivos se mantienen por 15 días en la caja Petri y se resiembran en agar HIT y PDA.

Las colonias de lepidópteros *Diatraea magnifactella* y *Spodoptera frugiperda* se mantienen en el laboratorio de control biológico por la Dra. Verónica Obregón Barbosa y la maestra Laura Lina. La actividad insecticida fue probada con larvas del tercer instar de estos lepidópteros y fueron donadas por el laboratorio de control biológico.

6.2.2 Medios de Cultivo

Para el mantenimiento y activación de las cepas de *Pycnoporus* se utilizó medio PDA (agar papa-dextrosa). Para el cultivo en matraz; matraz con espuma de poliuretano ; así como reactor tanque agitado y reactor airlift se utilizó el medio MT (Medio de Téllez-Téllez *et al.*, 2008), en g/L: glucosa, 10; extracto de levadura, 5; KH₂PO₄, 0.6; MgSO₄, 0.5; K₂HPO₄, 0.4; CuSO₄, 0.25; FeSO₄, 0.05; MnSO₄, 0.05; ZnSO₄, 0.001; pH, 6.5 (ajustar con HCl o NaOH 0.1 N).

6.2.3 Cultivo en caja Petri

Con el fin de preservar las cepas se inoculó un disco de micelio de 3mm tomado de la periferia del crecimiento en una caja Petri de 10 cm en medio PDA y se almacenó durante 30 días a 4°C.

Para activar la cepa se tomaron discos de micelio de 3 mm de la caja en que se preserva la cepa a 4°C y se sembraron en medio PDA contenido en caja Petri, se incubaron por 7 días a 28°C.

6.2.4 Cultivo sólido en espuma de poliuretano (Puf) como soporte inerte en matraz

Este sistema requiere de un soporte inerte, en este caso se utilizó espuma de poliuretano de la cual se agregaron 0.5 gramos a cada matraz de 250 mL. La espuma de poliuretano se cortó en trozos de 1cm x 1cm, fue lavada previamente con agua caliente durante cinco minutos, después con agua fría por cinco minutos; este proceso se repitió dos veces y se colocó en la estufa hasta secarse completamente. Después a los matraces que contenían 0.5 g de Puf se les agregó 15 mL de medio MT. El inóculo se realizó con tres discos de micelio de 3mm provenientes de la cepa previamente activada, se incubaron a 25°C sin agitación por 17 días, se tomaron muestras diarias a partir de 72 horas; de los sobrenadantes obtenidos de estas fermentaciones se caracterizó la composición de los pigmentos y se evaluó su actividad insecticida.

6.2.5 Cultivo en reactor tanque agitado

El proceso se inició con el reactor previamente esterilizado por 15 minutos a 121°C con capacidad 3L utilizándose al 75% de capacidad es decir 2.25 L con el medio optimizado, se mantuvo a temperatura de 28°C. Se instalaron los dispositivos del flujo de aire que deben pasar por un filtro de 0.22 μm . Se mantuvieron a un nivel de aireación 1 vvm (volumen de aire por volumen de líquido en un minuto) y a 125 rpm. El inóculo fue de siete días de crecimiento en líquido en matraz equivalente al 10% del volumen del reactor, una vez inoculado fue monitoreado por 20 días; se tomaron muestras a partir de las 72 horas, cada 24 horas y se evaluó el extracto crudo, (Guadarrama, 2016).

6.2.6 Cultivo en reactor airlift

El reactor airlift de 5 L fue esterilizado y operado con un volumen de trabajo del 75% con medio MT a 121°C por 15 min, se le instalaron los dispositivos del flujo de aire que pasan por un filtro de 0.22 μm . Se inoculó con el equivalente al 10% de su volumen con caldo de cultivo de 7 días a través de un matraz de inoculación. Se usó una tasa de aireación de 1 vvm y temperatura ambiente.

La fermentación duró un total de 20 días, la primera muestra se tomó a las 72 h y a partir de esta cada 24 h. Para obtener el extracto crudo, se filtró, centrifugo (10,000 g por 10 min) y almaceno a temperatura de congelación de -80°C.

6.2.7 Obtención de los sobrenadantes

Para obtener los sobrenadantes se tomaron muestras cada 24 horas de los cultivos sólidos en Puf en matraz y líquidos en reactores (Diagrama 1). Para el cultivo en sólido los cubos de Puf se colocaron en una jeringa y mediante presión manual se obtuvo el extracto crudo. El sobrenadante del cultivo líquido o extracto crudo se obtuvo por filtración en papel Whatman No. 4 usando un Kitasato conectado a una bomba de vacío para remover el micelio. Los extractos obtenidos se centrifugaron a 7800 rpm durante 10 min y se almacenaron a una temperatura de -20°C. Estos extractos serán utilizados para evaluar la actividad insecticida en ambos lepidópteros según el bioensayo que se describe en la tabla 6 y la presencia de ácido 3-HAA y pigmentos.

6.2.8 Análisis de cromatografía en capa fina

Se analizaron un total de 81 muestras mediante cromatografía en capa fina o TLC por sus siglas en inglés "Thin layer chromatography". Usando placas de gel de sílice 60 F₂₅₄, Merck, para identificar el ácido cinabarínico y el ácido 3-hidroxiantranílico. Se aplicaron 20 µL de las muestras en la línea base sobre las placas de dimensiones 7 cm. de ancho x 10 cm. de largo, con un capilar, incluyendo los controles positivos ácido cinabarínico y antranílico. Posteriormente se desarrolló la placa sumergiéndola en una fase móvil compuesta por una mezcla de solventes: benceno, acetato de etilo, ácido acético glacial y ácido fórmico en proporción (12:6:1:1) (Pérez-Silva *et al.*, 1988).

Se calcularon los frentes de retención de las bandas visibles y las reveladas con luz ultravioleta, además los frentes de retención de las bandas obtenidas en cada extracto fueron comparados con los Fr de las bandas de los estándares CA $R_f = 0.49$ (estándar de ácido cinabarrínico) y $R_f =$ desconocido para el ácido 3-HAA, así como con los frentes de retención de las bandas reportadas en literatura y de esta manera se logró la identificar el ácido cinabarrínico y ácido 3-hidroxiantranílico. Los Fr se calcularon con la siguiente fórmula:

$$RF = D_{mi} / D_e.$$

Donde:

D_{mi} = Distancia recorrida por el compuesto de la muestra de interés

D_e = Distancia recorrida por el compuesto de la muestra de interés

6.2.9 Determinación de la concentración del AC y 3-HAA por HPLC

Se realizaron extracciones líquido-líquido de las muestras de extracto crudo (Diagrama1), empleando acetato de etilo (1:1), se separaron las fases en un embudo de decantación de acuerdo con Guadarrama (2016). El extracto obtenido se secó y fue resuspendido en acetonitrilo/agua (10/90), al igual que los controles positivos ácido 3-HAA y AC. Las muestras en acetonitrilo/agua se inyectaron a volumen de 100 μ L al puerto del cromatógrafo (HPLC), empleando una columna de fase reversa C_{18} , con un gradiente de acetonitrilo/agua (10/90, 0-5 min; 60/40, 5-55 min; 100/0, 55-65 min; 10/90, 65-70 min) a una longitud de onda de 435 nm y una tasa de flujo de 1 mL/min. Mediante el cromatograma se obtuvieron los picos representativos del AC y 3HAA determinando las áreas bajo la curva. En el caso del pico del ácido 3-HAA mostro un tiempo de retención que correspondió al minuto 3 y al minuto 23 para el CA como se muestra en los cromatogramas de las figuras 8 y 9. Las concentraciones se interpolaron con una curva estándar.

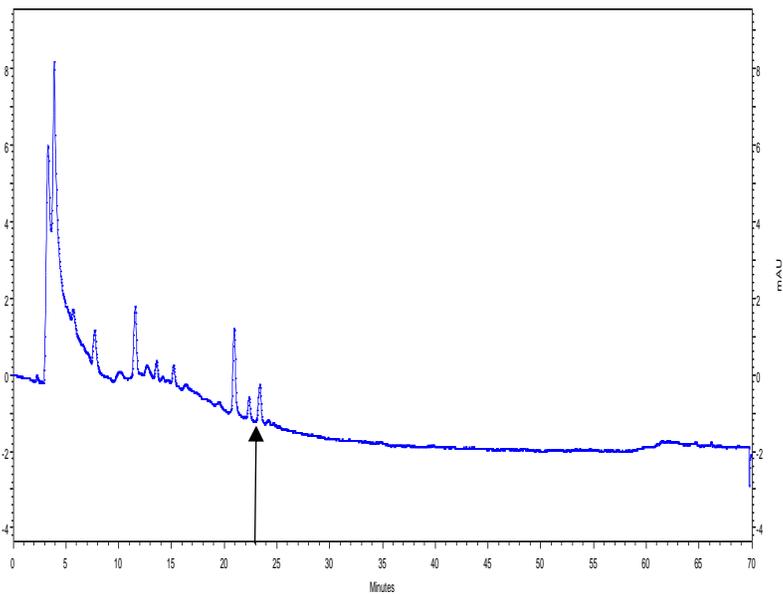


Figura 8. Cromatograma que muestra el pico correspondiente al ácido cinabarínico (AC) con tiempo de retención en el minuto 23, indicado con una flecha.

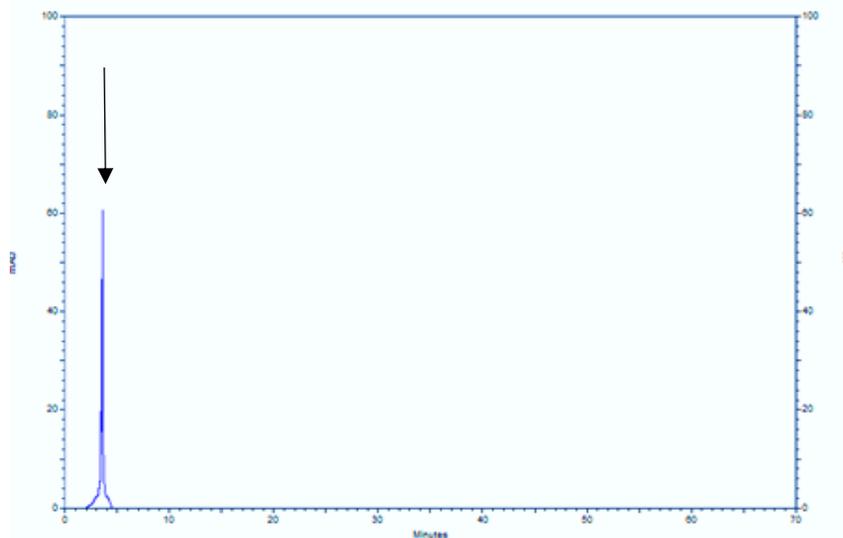


Figura 9. Cromatograma que muestra el pico correspondiente 3-HAA con tiempo de retención en el minuto 3, indicado con una flecha.

6.3 Bioensayos de la actividad insecticida

Los bioensayos de la actividad insecticida se realizaron antes de terminar las concentraciones de CA y 3-HAA por HPLC. Las muestras de los extractos crudos fueron evaluadas por microinyección (Corzo *et al.*, 2000).

6.3.1 Bioensayo de microinyección

Brevemente este experimento consistió en clasificar a las larvas de *Spodoptera frugiperda* y *Diatraea magnifactella* por peso para determinar las dosis a inyectar. Se formaron grupos de 5 larvas por tratamiento (cada extracto) con tres replicas. Las larvas se inyectaron con dosis que representan un volumen equivalente al 10% de su peso usando jeringas pediátricas para insulina (Figura 10). Posterior a la inyección las larvas se depositaron en cajas Petri y se realizaron observaciones durante 24, 48,72 hasta un máximo de 96 horas para determinar la mortalidad. Los controles negativos fueron grupos control de cinco larvas que se inyectaron solamente con agua destilada estéril y con el medio de cultivo sin inocular (la estrategia se muestra en la tabla 6).

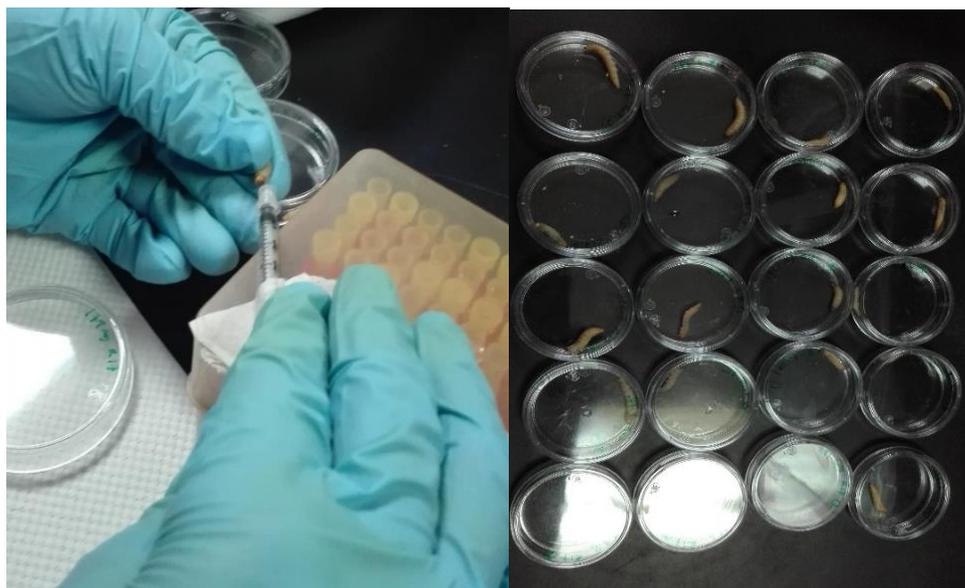


Figura 10. Inyección de larvas.

Tabla 6. Bioensayos para evaluar los extractos obtenidos cada 24 horas de los cultivos en líquidos y sólidos.

Tratamiento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	Control		
Extracto del tiempo (Horas)	24	48	72	96	120	144	168	192	216	240	264	288	312	336	Único	Larvas	X 3
Número de larvas	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	75	225
																Total	225
																75	225

6.3.1.1 Bioensayo para determinar la LD₅₀ del 3-HAA en *Spodoptera frugiperda*

Se realizó un ensayo ventana con cinco dosis de ácido 3-hidroxiantranílico comercial de la marca Sigma Aldrich, dosis de: 0.5 µg/g; 2.25 µg/g ;5µg/g; 22.5 µg/g y 50 µg/g (microgramo por gramo de larva). Se aplicaron por microinyección, posterior a la aplicación las larvas se depositaron en cajas de Petri para hacer observaciones durante 24, 48, 72 hasta 96 horas, cada grupo fue constituido por cinco larvas y los grupos control de cinco larvas que fueron inyectadas solamente con agua destilada estéril.

6.3.1.2 Evaluación de la respuesta crónica

Para evaluar el efecto crónico en las larvas se incorporó el extracto en hojas de maíz cortadas en trozos de una pulgada cuadrada previamente pasadas por un tren de desinfección conformado por lavados de hipoclorito de sodio al 1%, agua, alcohol etílico al 70 %, agua, alcohol al 70%, agua, agua, agua; y finalmente se dejaron secar. Se impregnaron las hojas con cada uno de los extractos por 30 minutos, se evaluaron los extractos obtenidos en el día 15 de la fermentación de cepas 51,74 y 53 cultivadas en puf, se realizó el mismo procedimiento con los controles que en este caso fueron el medio de cultivo sin inocular y hojas sin extracto y sin medio de cultivo (la estrategia se muestra en la tabla 6), una vez secos los trozos de hoja ya impregnados con el extracto o el medio de cultivo, se colocaron en cajas Petri que contenían una capa delgada de agar para evitar que se deshidrataran las hojas y encima de los trozos de hoja se colocó una larva neonata por cada caja.

Se llevó registro diario de mortalidad, así como de cambios morfológicos o de comportamiento en comparación con el grupo control, durante el tiempo que consumieron las larvas el trozo completo de hoja.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de los extractos

Se obtuvieron los extractos provenientes de las fermentaciones sólida en matraz Puf tomadas cada 24 horas a partir de las 32 primeras horas de fermentación, se tomaron los extractos de 15 días; para el caso de la fermentación en reactores las muestras fueron tomadas cada 24 horas por 18 días, este proceso aplicó para todas las cepas en fermentación sólida o líquida.

7.2. Identificación de pigmentos

7.2.1 Determinación de pigmentos por TLC en fermentación solido en Puf

En las 45 muestras, 15 de cada una de las cepas HEMIM-51,53 y 71 cultivadas en solido en Puf. No se lograron observar las bandas visibles de los pigmentos debido a la baja concentración de ellos en las muestras, sin embargo, los controles de CA y 3-HAA si se observaron con frente de retención, $R_f = 0.49$ para el estándar de ácido cinabaránico y un $R_f = 0.64$ para el ácido 3-HAA.

7.2.2 Determinación de pigmentos por TLC en fermentación liquida en reactores

En los 18 extractos de las cepas HEMIM-53 cultivada en STR y AL de las cuales no se lograron observar las bandas visibles de los pigmentos a excepción de las bandas de los controles los cuales consistieron en ácido cinabaránico y ácido 3-HAA comerciales los cuales presentan en promedio un frente de retención, $R_f = 0.49$ para el estándar de ácido cinabaránico y $R_f = 0.64$ para el ácido 3-HAA. En la figura 11, se muestran los resultados de las muestras en las placas de la cepa 53 cultivada en reactor Airlift, se obtuvieron los mismos resultados con las muestras de las demás cepas, no se detectó

CA ni 3-HAA, probablemente debido a las bajas concentraciones de los pigmentos en las muestras. Para demostrar esto se hicieron placas de TLC usando extractos de las mismas cepas obtenidos del cultivo de cuerpo fructífero, usando como controles; ácido cinabaránico y ácido 3-HAA comerciales. Los resultados muestran las bandas correspondientes a CA y 3-HAA que se perciben a simple vista y también revelados bajo luz UV a una longitud de onda de 253/365 nm (Figura 11). Estos resultados coinciden con lo reportado por Guadarrama, 2016 quien en su trabajo señaló que no logró apreciar las bandas de los pigmentos en TLC en las muestras obtenidas de extractos líquidos.

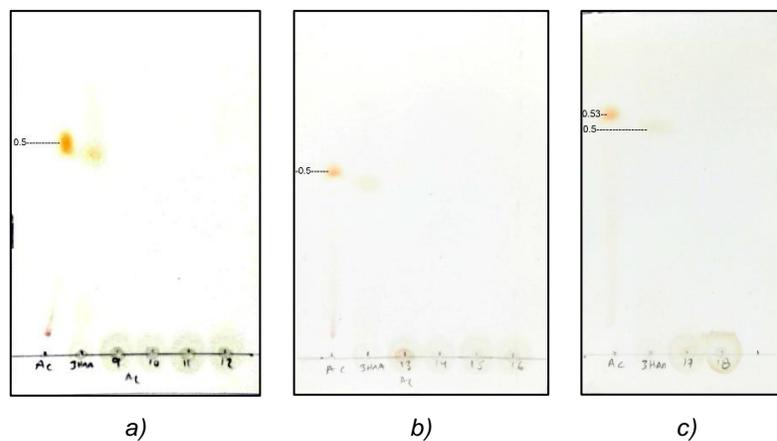


Figura 11. Placas de TLC de la cepa 53 a) cultivada en AL; b) Cultivada en STR c) Cultivada en Puf

Lo que contrasta con lo reportado por Coronel, 2016 quien en TLC empleando extractos acetónicos de cuerpos fructíferos y usando como controles el ácido cinabaránico lograron apreciar diferentes bandas a simple vista. Un resultado importante de este trabajo es la determinación del R_f del 3-HAA control, el cual no se había calculado por lo que se realizó una TLC (Figura 12). Los resultados muestran un R_f de 0.66 para el 3-HAA que corresponde al estándar de ácido 3-HAA, que se observaron en el trabajo de Coronel, 2016 pero no sabían a qué correspondía. No se observó esta banda en ninguna de las muestras de fermentación sólida en Puf o líquida en reactores.

Además, en los extractos de cuerpos fructíferos para la cepa 51 una banda cercana con Rf 0.67 que corresponde a la Tramesanguina según lo reportado con Sullivan y Henry en 1971, los carriles de las cepas 53 y 74 muestra dos bandas fluorescentes con Rf 0.71 la cual también logró observar Acosta-Urdapilleta *et al* 2010 pero que no se ha identificado y de 0.86 que corresponde a la Tramesanguina según Pérez-Silva *et al* 1988.

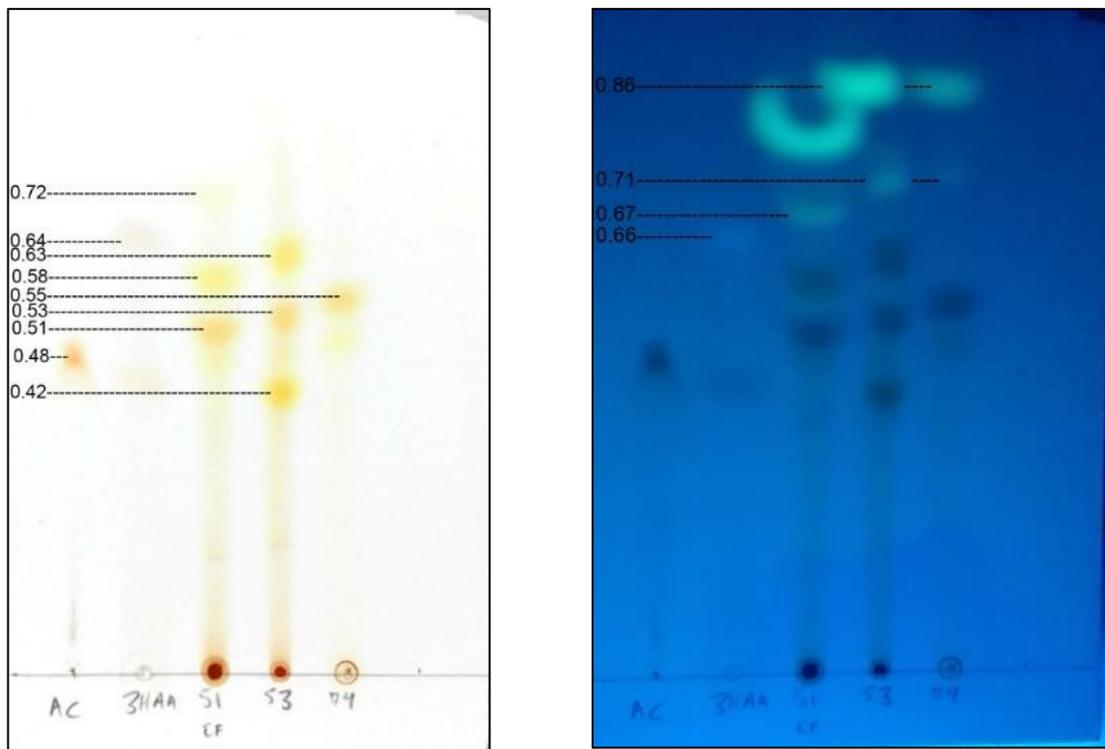
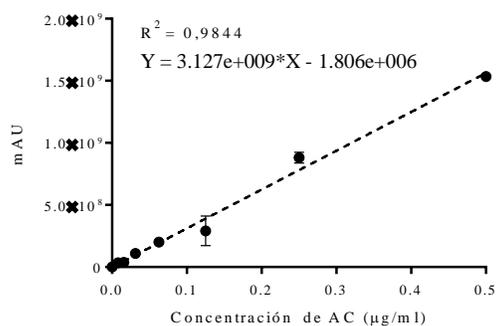


Figura 12. TLC de extractos de cuerpo fructífero cepas 51, 53 y 71 de *Pycnoporus cinnabarinus*, a) A simple vista y b) con luz UV a 253nm.

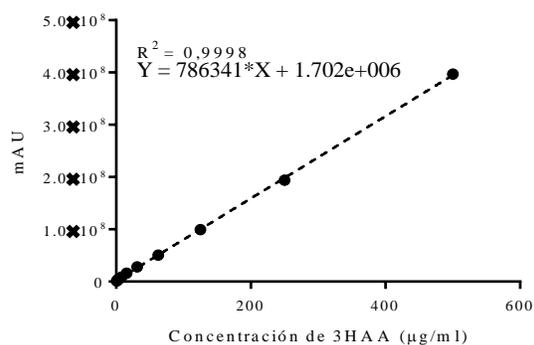
7.2.3 Determinación pigmentos por HPLC

7.2.3.1 Curvas de calibración de CA y 3HHA por RP-HPLC

Los cromatogramas muestran los picos a los tiempos correspondientes y con el área bajo la curva se obtuvieron las concentraciones mediante una curva estándar Guadarrama (2016).



1)

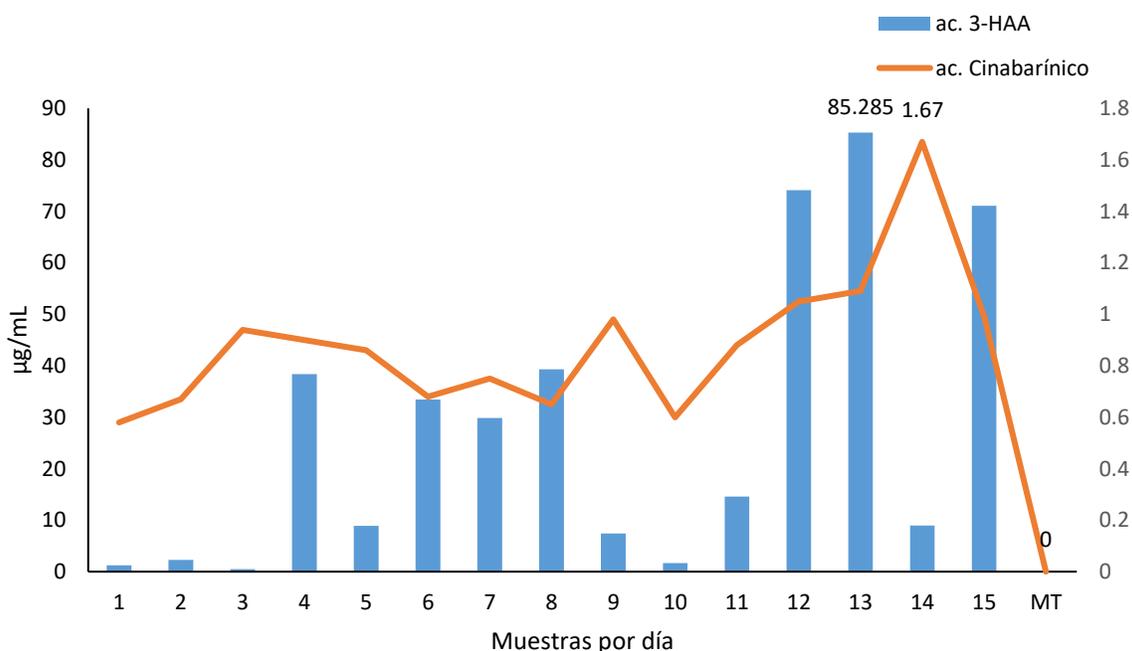


2)

Gráfica . 1) Curva estándar del ácido cinabarrínico, 2) Curva estándar del ácido 3-HAA elaborada por Guadarrama, 2016.

7.2.3.2 Determinación pigmentos por HPLC de la cepa HEMIM-51 en cultivo sólido Puf

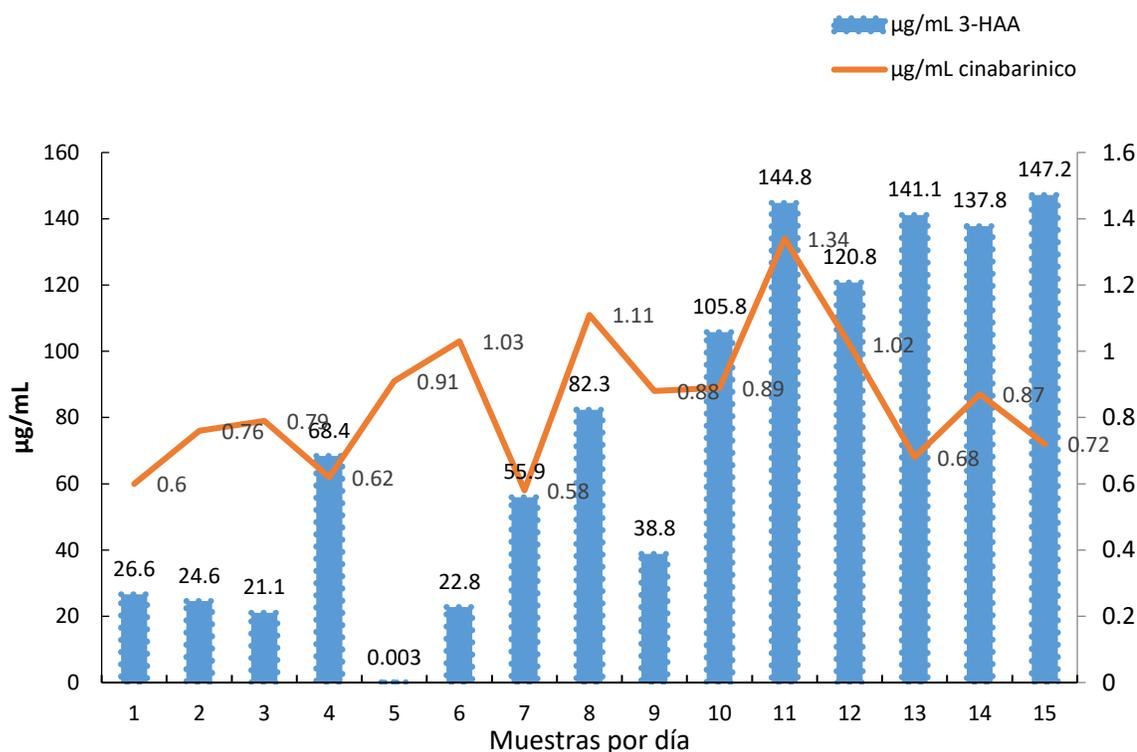
Se determinaron las concentraciones de ácido cinabaránico y ácido 3-HAA de los sobrenadantes obtenidos de la cepa HEMIM-51, de *Pycnoporus cinnabarinus* cultivada en fermentación sólida Puf. Los picos de CA y 3-HAA corresponden a los tiempos de los estándares Guadarrama (2016). Se obtuvo el área bajo la curva y esta se interpolo con una curva estándar (gráfica 2), se puede observar que la concentración máxima de ácido 3-HAA en las muestras fue de 85 µg/mL en el día 13 (312 horas) de la fermentación mientras que la concentración máxima de CA fue de 1.09 µg/mL . Por otro lado, la Concentración mínima de 3-HAA fue 0.46 µg/mL en el día 3 y el ácido cinabaránico se observa el día 14 con 1.67 µg/mL. De igual manera es importante apreciar que el ácido 3-HAA se encuentra en mayor concentración que el ácido cinabaránico.



Gráfica 3. Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabaránico de la cepa HEMIM-51 en cultivo sólido Puf

7.2.3.3 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-74 en cultivo sólido Puf

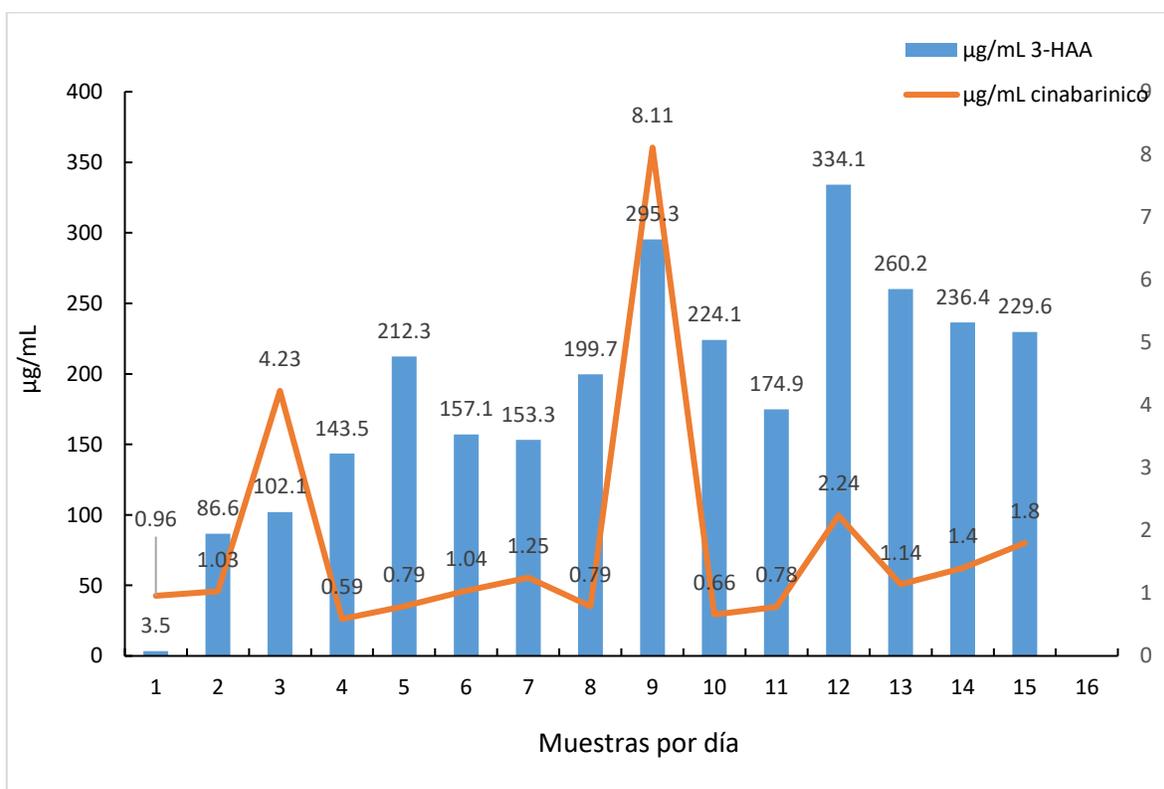
De los sobrenadantes obtenidos de la cepa HEMIM-74, de *Pycnoporus cinnabarinus* cultivada en fermentación sólida Puf fueron determinadas las concentraciones de ácido cinabarínico y ácido 3-HAA por medio de HPLC, dichas concentraciones fueron interpoladas con la curva estándar. Los resultados se muestran en la gráfica 3 en la que se observa que la concentración máxima de ácido 3-HAA en las muestras fue de 147.2 $\mu\text{g/mL}$ en el día 15 de la fermentación mientras que la concentración mínima de ácido 3-HAA se observa el día 5 con 0.62 $\mu\text{g/mL}$. Podemos apreciar que el ácido 3-HAA se encuentra en mayor concentración que el ácido cinabarínico ya que la concentración máxima de este se obtuvo el día 12 con 1.34 $\mu\text{g/mL}$.



Gráfica 4. Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabarínico de la cepa HEMIM-74 en sobrenadantes del cultivo sólido Puf

7.2.3.4 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-53 en cultivo sólido Puf

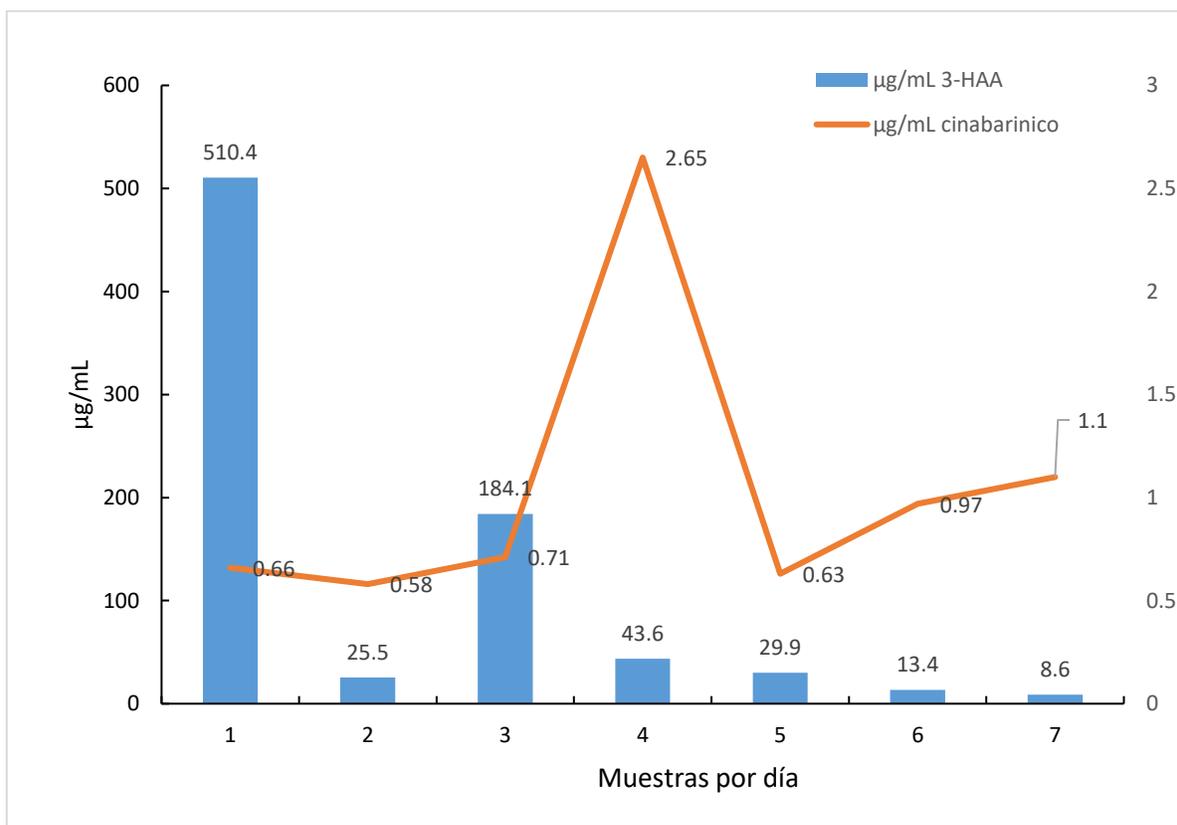
A partir de los extractos obtenidos de la cepa HEMIM-53, de *Pycnoporus cinnabarinus* cultivada en fermentación sólida Puf fueron determinadas las concentraciones de ácido cinabarinico y ácido 3-HAA por medio de HPLC, e interpoladas con una curva estándar. Los resultados se muestran en la gráfica 4. Se observa que la concentración máxima de ácido 3-HAA en las muestras fue de 334.1 $\mu\text{g/mL}$ en el día 12 de la fermentación asimismo la concentración mínima fue del día 1 con 3.5 $\mu\text{g/mL}$, mientras que del ácido cinabarinico se observa la mayor concentración el día 8 con 8.11 $\mu\text{g/mL}$.



Gráfica 5. Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabarinico cepa HEMIM-53 en cultivo sólido Puf

3.2.3.5 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-53 del cultivo en STR

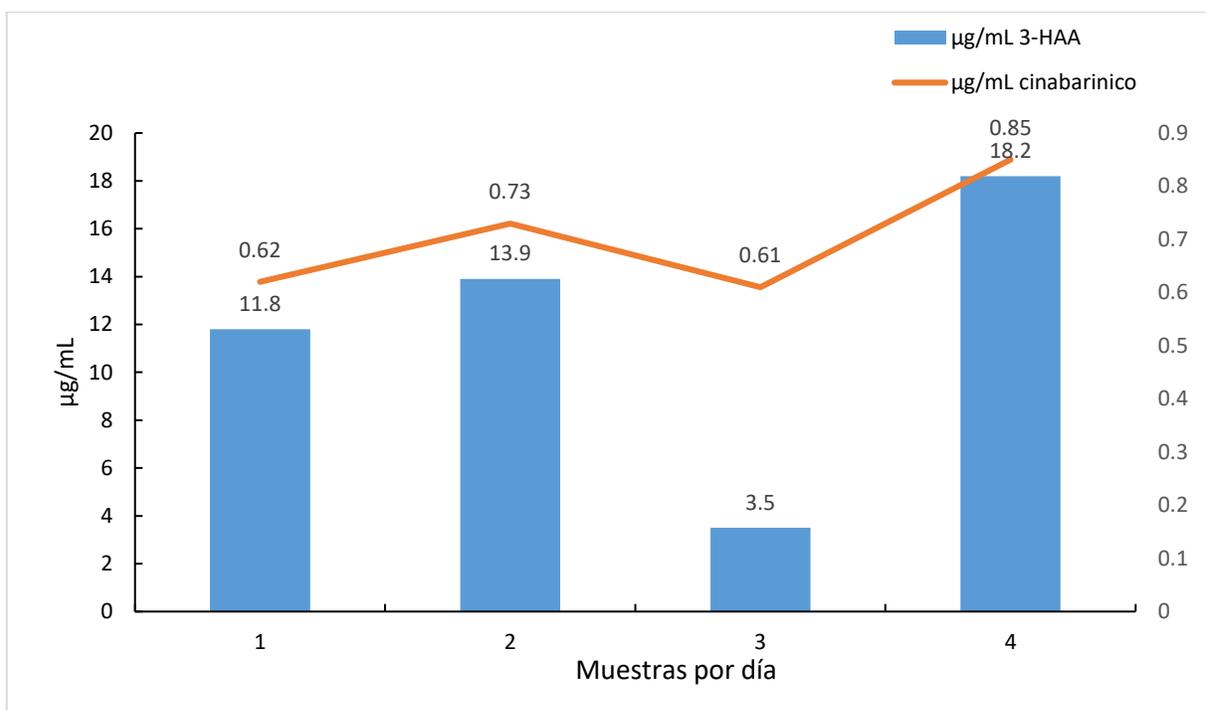
Por medio de HPLC fueron determinadas las concentraciones de ácido cinabaránico y ácido 3-HAA de los extractos obtenidos de la cepa HEMIM-53, de *Pycnoporus cinnabarinus* cultivada en Reactor tanque agitado. Los resultados se muestran en la gráfica 5 misma que muestra que la concentración máxima de ácido 3-HAA en las muestras fue de 510.4 $\mu\text{g/mL}$ en la muestra 1 correspondiente al día 7 de la fermentación mientras que la concentración máxima de ácido cinabaránico se observa en la muestra 7 del día 18 con 1.1 $\mu\text{g/mL}$.



Gráfica 6. Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabaránico cepa HEMIM-53 del cultivo en reactor tanque agitado

7.2.3.6 Determinación de concentraciones por HPLC de la cepa HEMIM-53 del cultivo en AL

Se determinaron las concentraciones de ácido cinabárnico y ácido 3-HAA de los sobrenadantes obtenidos de la cepa 53, de *Pycnoporus cinnabarinus* cultivada en reactor Airlift por medio de HPLC, se interpolaron con la curva estándar. Los resultados se muestran en la gráfica 6 y se puede observar que la concentración máxima de ácido 3-HAA en las muestras medidas fue de 18.2 $\mu\text{g/mL}$ en la muestra 4 del día 18 de la fermentación de igual manera la concentración máxima de ácido cinabárnico se observa en la muestra 4 con 0.85 $\mu\text{g/mL}$.



Grafica 7. Concentraciones de ácido 3-HAA y ácido cinabárnico cepa HEMIM-53 cultivada en reactor Air Lift

7.3.1. Evaluación de la actividad insecticida por microinyección

7.4.3.1 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-51 en *Spodoptera frugiperda*

Se evaluaron las muestras tomadas cada 24 horas de la fermentación a partir de las 72 horas por 15 días. En la gráfica 7 se muestra el porcentaje de mortalidad de los sobrenadantes de la cepa HEMIM-51 contra el insecto *Spodoptera frugiperda*. Cabe resaltar que el extracto que presentó mejor actividad fue el de la muestra 14 puesto que se alcanzó una mortalidad del $86.7\% \pm 5.0\%$, por el contrario los que presentaron un menor porcentaje de mortalidad fueron los extractos de las muestras 2 y 6 ya que se alcanzó una mortalidad del 46.7% ; además es importante hacer notar que todos los extractos presentan cierto porcentaje de mortalidad, en el caso de los controles se presentó el 0% de mortalidad para las larvas tratadas con agua y con el medio de cultivo MT sin inocular.

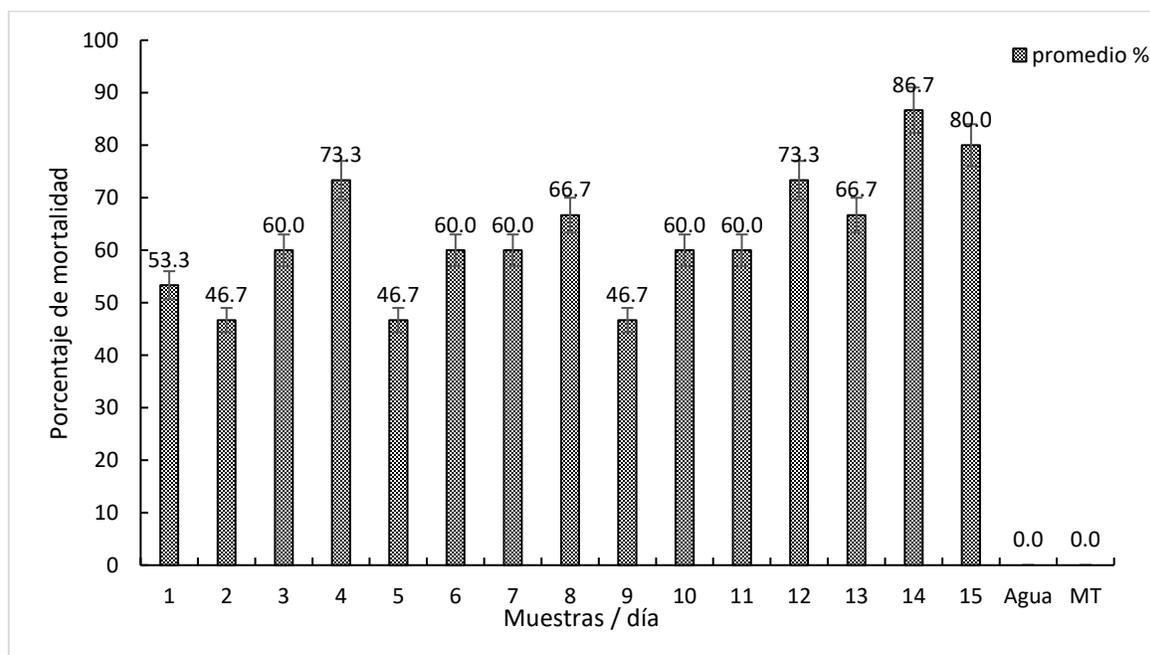
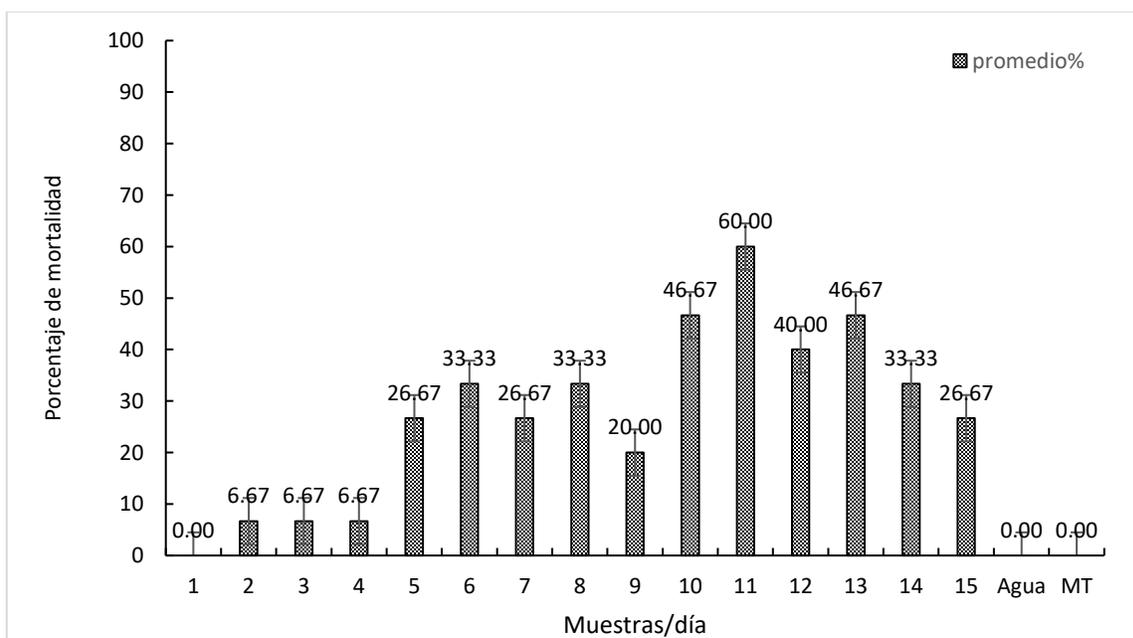


Figura 8. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* tratadas con extractos de la cepa HEMIM-51.

7.3.2 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-51 en *Diatraea magnifactella*

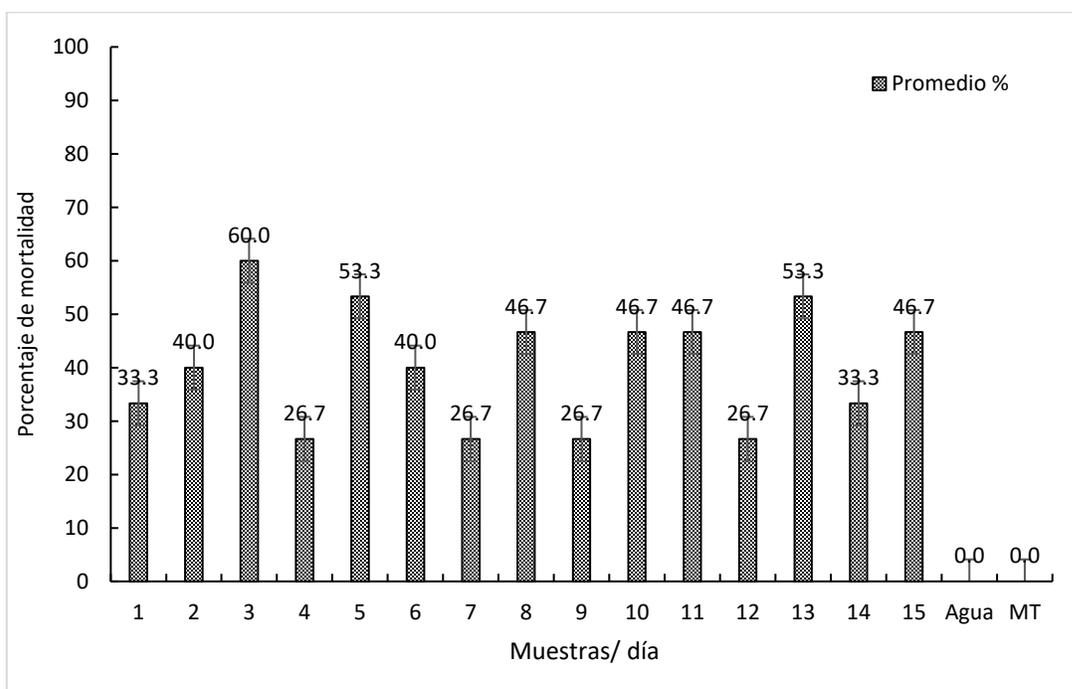
Por otra parte, en la gráfica 8 se muestra el porcentaje de mortalidad que causan los sobrenadantes de la cepa 51 contra el insecto *Diatraea magnifactella*. En el caso de los controles negativos se presentó 6.7% de mortalidad para las larvas tratadas con agua, y con el medio de cultivo MT sin inocular el 13.3% de mortalidad, porcentaje que fue restado a los tratamientos con medio de cultivo. Es importante hacer notar que todos los extractos presentaron cierto porcentaje de mortalidad. El extracto que presento mayor actividad insecticida fue el de la muestra del día 11, con una mortalidad del 60.0 ± 7.0 %. Por el contrario, la muestra que presentó un menor porcentaje de mortalidad fue la muestra 1, con una mortalidad de 0 % igual que el medio de cultivo sin inocular.



Gráfica 9. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Diatraea magnifactella* tratadas con extractos de la cepa HEMIM-51.

7.3.3 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de la toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-74 en *Spodoptera frugiperda*

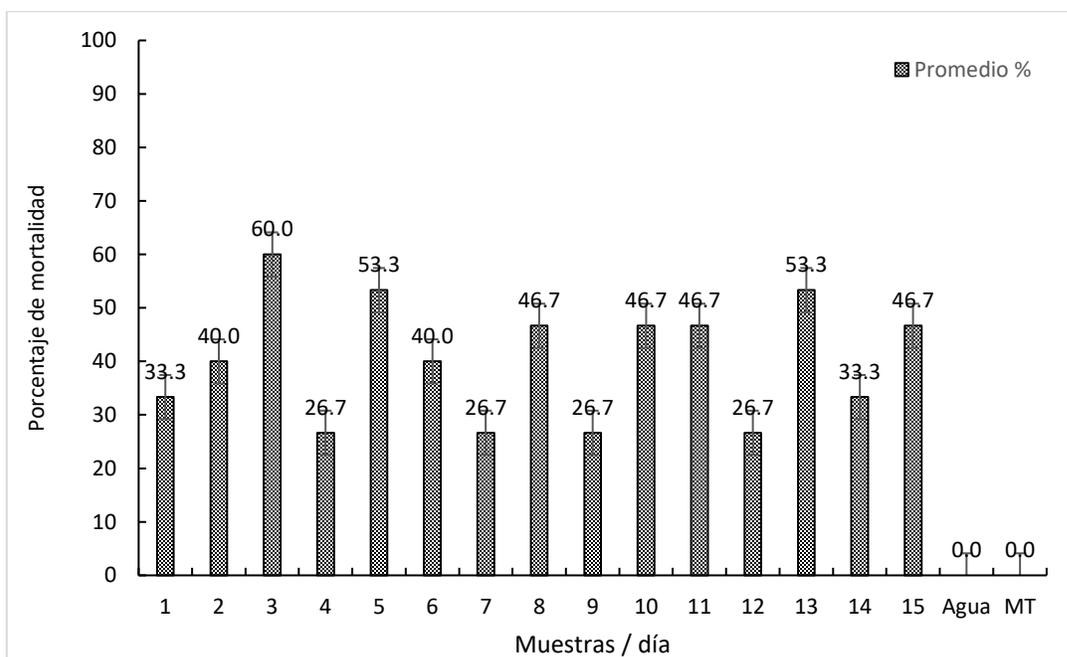
Se probaron los sobrenadantes de la cepa HEMIM-74 en larvas del tercer instar de *Spodoptera frugiperda* y se presentan los resultados en la gráfica 9. Es importante hacer notar que todos los extractos presentan cierto porcentaje de mortalidad no obstante más bajos en comparación con los dos anteriores bioensayos, los extractos que presentaron mayor porcentaje de mortalidad fueron los extractos de los días 13 y 15 con un 53.3 ± 5.0 , 46.7 ± 6.0 %. Mientras que los que presentaron menor porcentaje de mortalidad fueron los sobrenadantes de los días 7 y 12 con el $13.3 \% \pm 4.6\%$ de mortalidad. Así mismo las larvas inyectadas con agua y/o el medio de cultivo MT sin inocular mostraron un 0 % de mortalidad.



Gráfica 10. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* tratadas con extractos de la cepa HEMIM-74.

7.3.4 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-53 en *Spodoptera frugiperda*

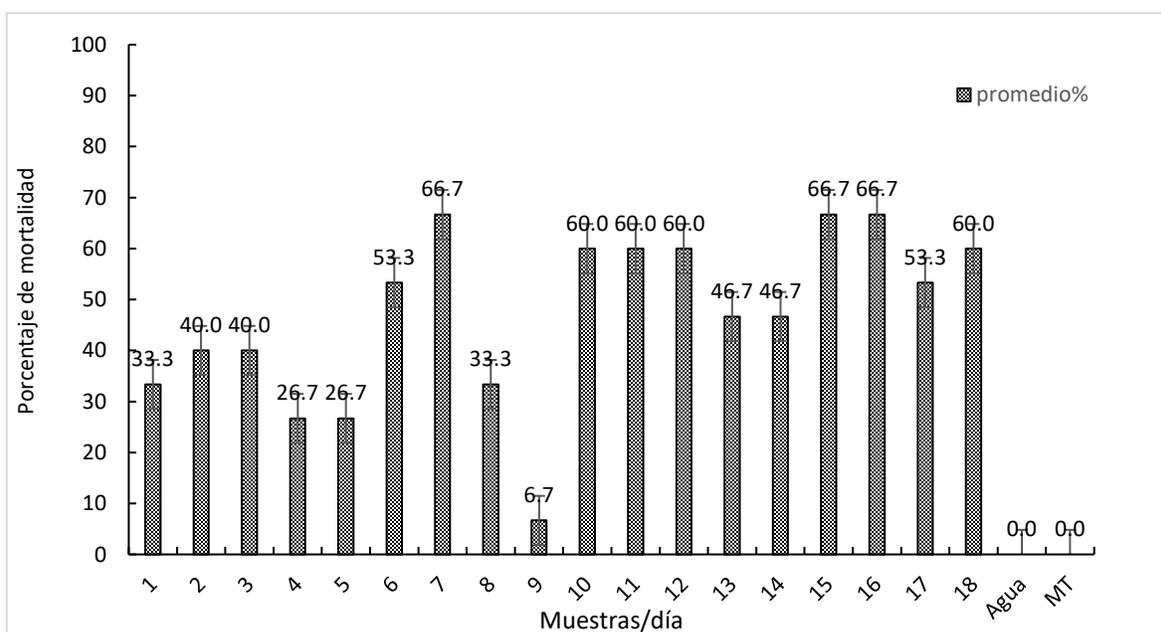
Se probaron los sobrenadantes de la cepa HEMIM-53 en larvas del tercer instar de *Spodoptera frugiperda* y se presentan los resultados en la gráfica 10. El extracto que presento mayor porcentaje de mortalidad fue el extracto del día 3 con un $60 \pm 7 \%$, seguido por los días 5 y 13 con 53.3% de mortalidad. Mientras que el menor porcentaje de mortalidad fue en los días 4, 7, 9 y 12 con el $26.7 \pm 3.3 \%$ de mortalidad, para las larvas inyectadas con agua y el medio de cultivo MT sin inocular se observa un 0% de mortalidad.



Gráfica 11. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* tratadas con extractos de la cepa HEMIM-53.

7.3.5 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-53 en STR evaluada en *Spodoptera frugiperda*

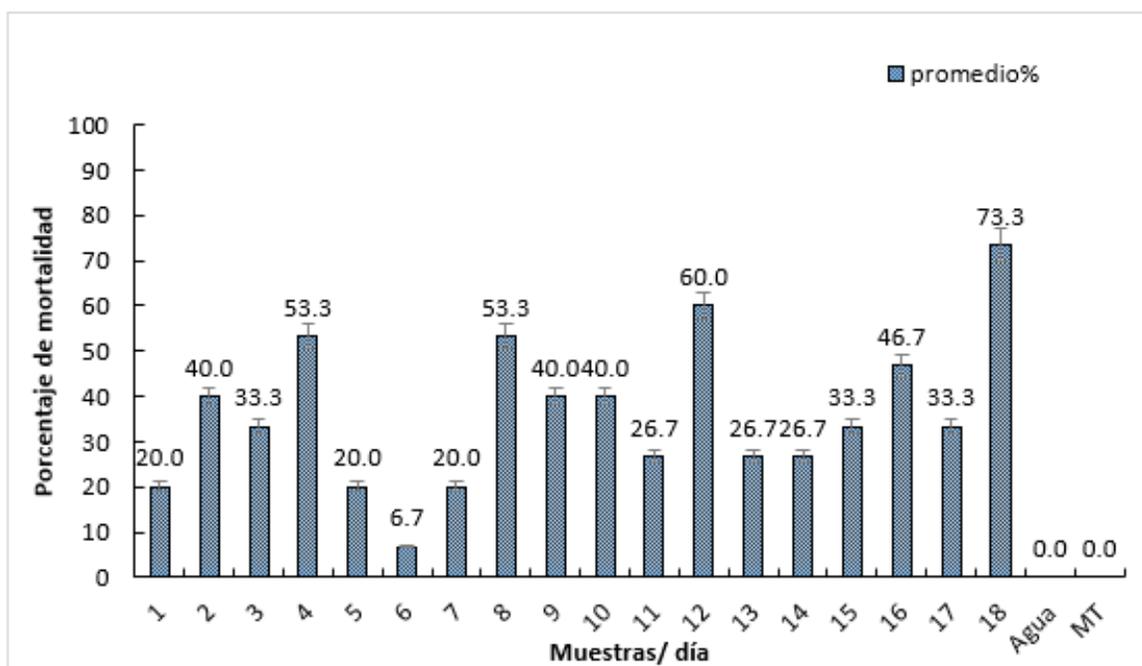
Se probaron todos los sobrenadantes de la cepa HEMIM-53 en larvas del tercer instar de *Spodoptera frugiperda* y se presentan los resultados en la gráfica 11. Se puede hacer notar que los extractos del día 7, 15 y 16 presentan la mayor actividad insecticida con un 66.7 ± 3.0 % de mortalidad para los tres casos. Por el contrario el extracto 9 solo presenta el 6.7 ± 7 % de mortalidad, el control con agua indicó una mortalidad del 6.7 ± 11.0 % porcentaje que fue restado de la mortalidad con los tratamientos y el medio MT sin inocular se presenta el 0% de mortalidad.



Gráfica 12. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* con extractos de la cepa HEMIM-53 cultivada en STR.

7.3.6 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección de extractos obtenidos a partir de toma de muestras diarias del cultivo de la cepa HEMIM-53 en AL evaluada en *Spodoptera frugiperda*

Se probaron todos los sobrenadantes de la cepa HEMIM-53 en larvas del tercer instar de *Spodoptera frugiperda* y se presentan los resultados en la gráfica 12. Se puede hacer notar que el extracto del día 18 presenta la mayor actividad insecticida con un $73.3\% \pm 4.0\%$ de mortalidad para los tres casos. Por el contrario el extracto del día 6 solo presenta el $6.7 \pm 3.0\%$ de mortalidad, el control con agua y el medio MT sin inocular presentaron el 0% de mortalidad.

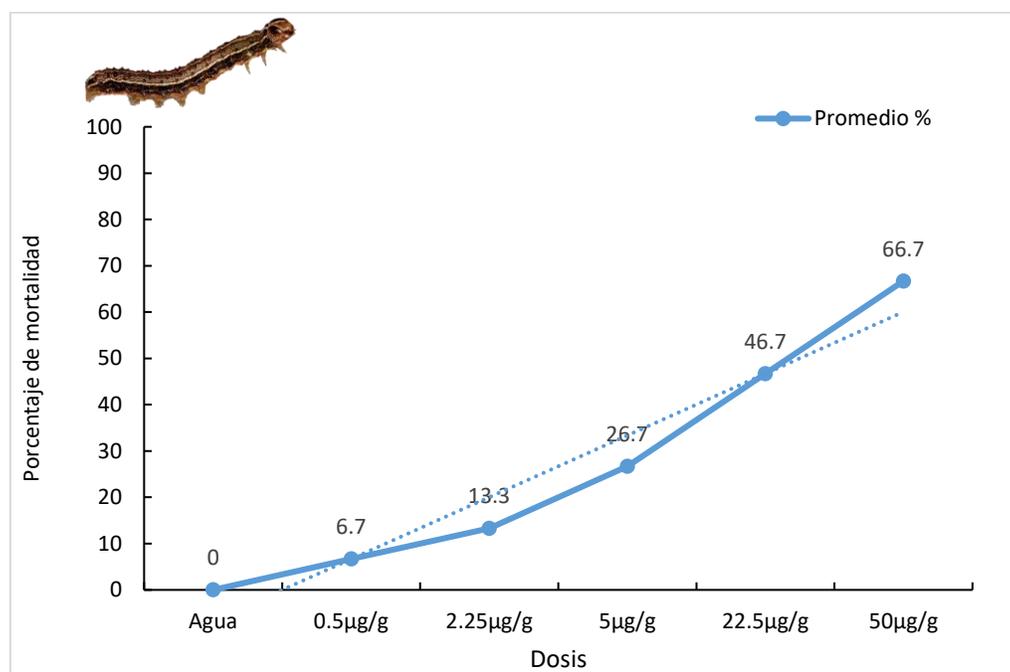


Gráfica 13. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* con extractos de la cepa HEMIM-53 cultivada en AL.

7.3.7 Evaluación de la actividad insecticida por microinyección del ácido 3-HAA comercial en *Spodoptera frugiperda*

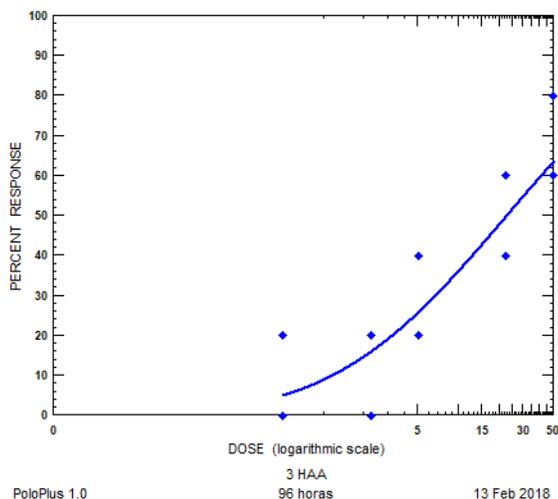
Se realizó un ensayo ventana con cinco dosis de ácido 3-hidroxiantranílico comercial de la marca sigma aldrich, dosis de: 0.5µg/g, 2.25 µg/g, 5µg/g, 22.5 µg/g y 50µg/g (microgramo por gramo de larva), los resultados se muestran en la gráfica 13.

En el grupo tratado con la dosis más alta es decir de 50 µg/g se observa una mortalidad que del 66.7%, mientras que la dosis que presentó menor mortalidad fue la de 0.5 µg/g con un 6.7% y en el caso del control que fue agua, se presentó 0% de mortalidad.



Gráfica 14. Porcentaje de mortalidad de larvas de *Spodoptera frugiperda* tratadas con cinco concentraciones diferentes de ácido 3-hidroxiantranílico.

Resulta interesante que la dosis de 22.5 µg/g mostró un porcentaje cercano al 50 % por lo que se consideró pertinente calcular la LD₅₀(dosis letal media) para tener un valor exacto, el cual fue calculado con el programa Probit y arrojó como resultado una LD₅₀ de 22.540 µg/g, y se muestra en la gráfica 14.



Gráfica 15. Cálculo de LD₅₀ con el programa Probit

7.4 Efecto sinérgico del Ac. Cinabarínico y 3-hidroxiantranílico en las muestras con mayor mortalidad

En la tabla 7 podemos observar los porcentajes de mortalidad entre todos los sobrenadantes de las fermentaciones sólida en Puf y líquido evaluados. En la tabla se muestra en que día fue obtenida la muestra, además de las concentraciones de 3-HAA y AC, así como las dosis usadas e inyectadas a las larvas. Se observa como control positivo la concentración de 3-HAA de Sigma a la que se obtuvo el 50% de mortalidad en *Spodoptera frugiperda*. Todos los extractos presentaron arriba de un 50% de mortalidad y suponemos que se debe al efecto sinérgico de dichos metabolitos. El sobrenadante que presentó la mayor mortalidad de 87.3 % fue el obtenido de la cepa HEMIM-51 cultivada en Puf en el día 14, la dosis empleada contenía 4.25 µg/g de 3-HAA y 0.05 µg/g de AC, una concentración casi seis veces menor en comparación con 22.54 µg/g de larva correspondiente a la LD₅₀. el sobrenadante que presento menor porcentaje de mortalidad fue el de la cepa 74 cultivada en Puf obtenido el día 15 con un 53.3% , las dosis aplicadas a las larvas son de 7.36 µg/mL de 3-HAA y de 0.04 µg/mL AC; cabe resaltar que en ninguno de los casos mencionados es superada la LD₅₀ de 22.54 µg/g de 3-HAA. El único caso en que se supera dicha dosis en el sobrenadante obtenido de la cepa 53 cultivada en STR con una dosis de 25.5 µg/g.

En todas las muestras la dosis de 3-HAA es mayor que la de AC, sin embargo, no necesariamente el porcentaje de mortalidad tiene relación directa con las concentraciones de 3-HAA y AC por lo que podría tratarse de un efecto sinérgico de ambos compuestos puesto que ya se ha demostrado que el 3-HAA tiene efecto de manera independiente ya que se logró medir la LD₅₀.

Tabla 7.Efecto sinérgico del Ac. Cinabárínico y Ac. 3-HAA en las muestras con mayor mortalidad

Tratamiento	Sistema	Lepidóptero	% Mortalidad	Días	Concentraciones		Dosis	
					Ac. 3-HAA µg/mL	AC. µg/mL	Ac.3-HAA µg/g	AC µg/g
HEMIM-51	Puf	<i>Spodoptera</i>	86.7	14	85.0	1.09	4.25	0.05
53	AL	<i>Spodoptera</i>	73.3	18	18.8	0.85	0.91	0.04
53	STR	<i>Spodoptera</i>	66.7	7	510.4	0.66	25.5	0.03
53	STR	<i>Spodoptera</i>	66.7	15	29.9	0.63	1.45	0.03
53	STR	<i>Spodoptera</i>	66.7	16	13.4	0.97	0.67	0.05
53	Puf	<i>Spodoptera</i>	60.0	3	102.1	4.23	5.11	0.21
51	Puf	<i>Diatraea</i>	60.0	11	15.0	0.88	0.75	0.04
74	Puf	<i>Spodoptera</i>	53.3	15	147.2	0.72	7.36	0.04
3-HAA	/	<i>Spodoptera</i>	50.0	/	/	/	22.54	/

7.5 Evaluación de la respuesta crónica

Para evaluar el efecto crónico en las larvas se incorporó el extracto en hojas de maíz, se llevó un registro diario de mortalidad así como de cambios morfológicos hasta que las larvas consumieron en su totalidad el trozo de hoja, este proceso duró 15 días; en la figura 13 se muestran el registro visual que se realizó durante los quince días, como se puede observar las larvas consumieron en su totalidad los trozos de hoja sin mostrar algún comportamiento o cambio en comparación con el grupo control que se trató solamente de hojas de maíz, estos resultados se observaron con los extractos de las tres cepas HEMIM-51,53 y 74 por lo que solo se presentan imágenes de la cepa 53 probablemente no se tuvo efecto debido a los hábitos crípticos propios del estadio larval de *Diatraea magnifactella*, ya que se introducen en la hoja y comen el interior y después el exterior, también pudo suceder que el extracto perdiera efectividad ya que es fotosensible, por lo cual no es la manera más adecuada de probarlo.

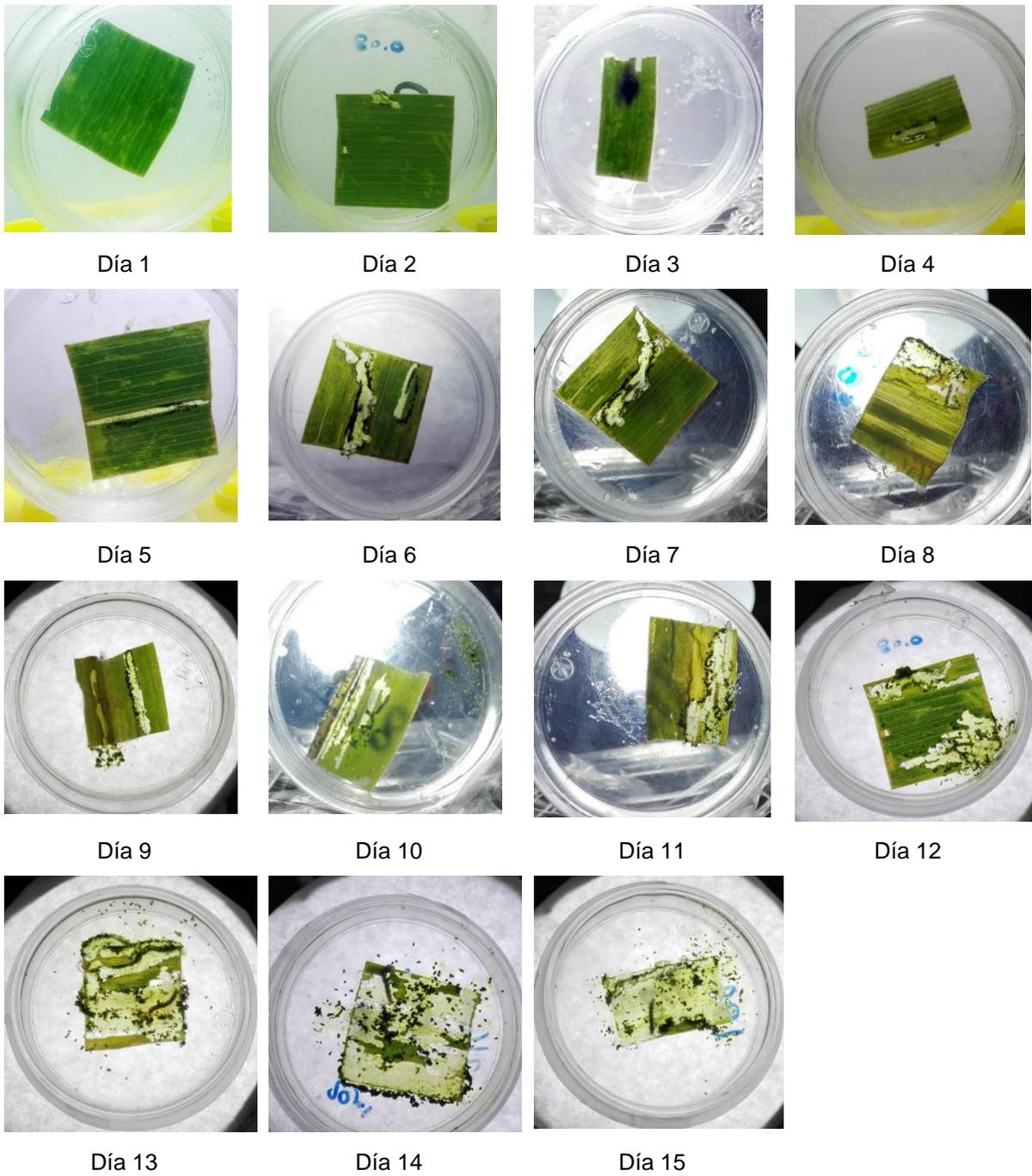


Figura 13. Registro visual de 15 días de la respuesta crónica de la cepa HEMIM-53 en *Diatraea magnifactella*

8. CONCLUSIONES

- Fueron obtenidos los sobrenadantes de *Pycnoporus* HEMIM-51, 53 y 74, a partir de fermentación sólida en Puf, así como los sobrenadantes de *Pycnoporus* HEMIM- 53 de fermentación líquida en reactor tanque agitado y Airlift.
- Se obtuvo el frente de retención de ácido cinabárínico = 0.41 y el del ácido 3-HAA = 0.64, en TLC.
- Las muestras de los sobrenadantes presentaron bajas concentraciones de 3-HAA y CA probablemente, por lo que no se observaron los frentes de retención en las muestras por TLC.
- Las concentraciones de 3-HAA y CA se obtuvieron mediante RP-HPLC los resultados muestran que la presencia de ácido 3-HAA es mayor que la de ácido cinabárínico en todas las muestras.
- El extracto de la cepa HEMIM-51 de la fermentación sólida en Puf fue el más eficiente frente al insecto *Spodoptera frugiperda* ya que alcanzó una mortalidad del 86%.
- La LD₅₀ para *Spodoptera frugiperda* se obtuvo con una dosis de 22.54 µg/g de larva.
- Existe un efecto insecticida sinérgico entre el 3-HAA y el CA frente a *S. frugiperda*.
- El extracto de la cepa HEMIM-74 de la fermentación sólida en Puf fue el más eficiente frente al insecto *Diatraea magnifactella* ya que alcanzó una mortalidad del 60%.
- El efecto crónico de los sobrenadantes en hojas de maíz no se observó en larvas neonatas de *S. frugiperda*.

9. LITERATURA CITADA

1. Achenbach, H., & Blümm, E. (1991). Investigation of the Pigments of *Pycnoporus sanguineus*-Pycnosanguin and New Phenoxazin-3-ones. *Archiv der Pharmazie*, 324(1), 3-6.
2. Acosta-Urdapilleta, L., Alonso-Paz, G. A., Rodríguez, A., Adame, M., Salgado, D., Montiel-Peña, M., ... & Villegas-Villarreal, E. C. (2010). *Pycnoporus sanguineus*, un hongo con potencial biotecnológico. *Hacia un Desarrollo sustentable de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el siglo XXI. Puebla*, 531-562.
3. Adame M., (2010) Tesis de licenciatura actividad antimicrobiana de la cinabarina proveniente de cuerpos fructíferos de *Pycnoporus sanguineus*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
4. Baumer, J. D., Mas Diego, S. M., Pacheco, S. M. V., Morgado, A. F. M., & Furigo, A. F. (2008). Comparative study of mycelial growth and production of cinnabarin by different strains of *Pycnoporus sanguineus*. *Biofar Rev. Biol. Farm*, 2, 1-5.
5. Brizuela, M. A., García, L., Pérez, L., & Mansur, M. (1998). Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol*, 15, 69-74.
6. Bucker, A., Bucker, N. C. F., Souza, A. Q. L. D., Gama, A. M. D., Rodrigues-Filho, E., Costa, F. M. D., ... & Tadei, W. P. (2013). Larvicidal effects of endophytic and basidiomycete fungus extracts on *Aedes* and *Anopheles* larvae (Diptera, Culicidae). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(4), 411-419.
7. Couto, S. R., & Herrera, J. L. T. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances*, 24(5), 500-513.
8. Couto, S. R., & Toca-Herrera, J. L. (2007). Laccase production at reactor scale by filamentous fungi. *Biotechnology advances*, 25(6), 558-569.
9. Cuevas (2016) Tesis de licenciatura. Producción de ácido cinabarínico empleando *Pycnoporus cinnabarinus* HEMIM 53, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
10. Dias, D. A., & Urban, S. (2009). HPLC and NMR studies of phenoxazone alkaloids from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Natural product communications*, 4(4), 489-498.
11. Díaz (2012) Tesis de licenciatura. Caracterización molecular de cepas de *Pycnoporus sanguineus* Universidad Autónoma del estado de Morelos.
12. Díaz-Godínez, G., Téllez-Téllez, M., Rodríguez, A., Obregón-Barbosa, V., de Lourdes Acosta-Urdapilleta, M., & Villegas, E. (2016). Enzymatic, antioxidant, antimicrobial, and insecticidal

- activities of *Pleurotus pulmonarius* and *Pycnoporus cinnabarinus* grown separately in an airlift reactor. *BioResources*, 11(2), 4186-4200.
- Eggert, C. (1997). Laccase-catalyzed formation of cinnabarinic acid is responsible for antibacterial activity of *Pycnoporus cinnabarinus*. *Microbiological research*, 152(3), 315-318.
13. Göçenoğlu, A., & Pazarlıoğlu, N. (2014). Cinnabarinic acid: Enhanced production from *Pycnoporus cinnabarinus*, characterization, structural and functional properties. *The Journal of Biological Chemistry*, 42, 281-290.
14. Guadarrama Pérez, V.H. (2016) Estudio de la producción de pigmentos de *Pycnoporus* HEMIM-53 cultivado en distintos sistemas de fermentación. (Tesis de maestría) Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, CEIB. Cuernavaca, Morelos.
15. Guohong Li¹, Keqin Zhang^{1,*}, Jianping Xu^{1, 2}, Jinyan Dong¹ & Yajun Liu¹(2007). Nematicidal Substances from Fungi 1Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming 650091, P. R. China, 2Department of Biology, McMaster University, Hamilton, Ontario L8S 4K1, Canada. Pp 2.
16. Krings, U., Pilawa, S., Theobald, C., & Berger, R. G. (2001). Phenyl propenoic side chain degradation of ferulic acid by *Pycnoporus cinnabarinus*—elucidation of metabolic pathways using [5-²H]-ferulic acid. *Journal of biotechnology*, 85(3), 305-314.
17. Liu, J., Cai, Y., Liao, X., Huang, Q., Hao, Z., Hu, M., ... & Li, Z. (2013). Efficiency of laccase production in a 65-L air-lift reactor for potential green industrial and environmental application. *Journal of cleaner production*, 39, 154-160.
18. Lomascolo, A., Uzan-Boukhris, E., Herpoël-Gimbert, I., Sigoillot, J. C., & Lesage-Meessen, L. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Applied microbiology and biotechnology*, 92(6), 1129-1149.
19. Lu, L., Zhao, M., Zhang, B. B., Yu, S. Y., Bian, X. J., Wang, W., & Wang, Y. (2007). Purification and characterization of laccase from *Pycnoporus sanguineus* and decolorization of an anthraquinone dye by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1232-1239.
20. Meza, J. C., Auria, R., Lomascolo, A., Sigoillot, J. C., & Casalot, L. (2007). Role of ethanol on growth, laccase production and protease activity in *Pycnoporus cinnabarinus* ss3. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(1-2), 162-168.
21. Papinutti, L. (2013) *Pycnoporus sanguineus*. Boletín biológico. Año 7, N° 29, 32-33.
22. Ponce 2012. Tesis de licenciatura purificación y caracterización de los pigmentos presentes en el extracto de *Pycnoporus sanguineus*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

23. Quiroga, E. N., Sgariglia, M. A., Molina, C. F., Sampietro, D. A., Soberón, J. R., & Vattuone, M. A. (2009). Purification and characterization of an exo-polygalacturonase from *Pycnoporus sanguineus*. *Mycological research*, 113(12), 1404-1410.
24. Ramírez-Cavazos, L. I., Junghanns, C., Nair, R., Cárdenas-Chávez, D. L., Hernández-Luna, C., Agathos, S. N., & Parra, R. (2014). Enhanced production of thermostable laccases from a native strain of *Pycnoporus sanguineus* using central composite design. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 15(4), 343-352.
25. Richard, A., Sergio, H., Maurice, R., & Sergio, R. (1990). Ion exchange resin: a model support for solid state growth fermentation of *Aspergillus niger*. *Biotechnology techniques*, 4(6), 391-396.
26. Rodríguez-del-Bosque, L. A., & Vejar-Cota, G. (2008). Barrenadores del tallo (Lepidoptera: Crambidae) del maíz y caña de azúcar. *Casos de Control Biológico en México. Ed. Mundi-Prensa, México-España*, 9-22.
27. Smânia, A., Delle Monache, F., Smânia, E. F. A., Gil, M. L., Benchetrit, L. C., & Cruz, F. S. (1995). Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, 45(3), 177-181.
28. Smânia, A., Marques, C. J. S., Smânia, E. F. A., Zanetti, C. R., Carobrez, S. G., Tramonte, R., & Loguercio-Leite, C. (2003). Toxicity and antiviral activity of cinnabarin obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1069-1072.
29. Smânia, E. F., Smânia Jr, A., Loguercio-Leite, C., & Gil, M. L. (1997). Optimal parameters for cinnabarin synthesis by *Pycnoporus sanguineus*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental AND Clean Technology*, 70(1), 57-59.
30. Sullivan, G., & Henry, E. D. (1971). Occurrence and distribution of phenoxazinone pigments in the genus *Pycnoporus*. *Journal of pharmaceutical sciences*, 60(7), 1097-1098.
31. Téllez-Téllez, M., Fernández, F. J., Montiel-González, A. M., Sánchez, C., & Díaz-Godínez, G. (2008). Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Applied microbiology and biotechnology*, 81(4), 675.
32. Trovaslet, M., Enaud, E., Guiavarc'h, Y., Corbisier, A. M., & Vanhulle, S. (2007). Potential of a *Pycnoporus sanguineus* laccase in bioremediation of wastewater and kinetic activation in the presence of an anthraquinonic acid dye. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(3), 368-376.
33. Van Baten, J. M., Ellenberger, J., & Krishna, R. (2003). Using CFD to Describe the Hydrodynamics of Internal Air-lift Reactors. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 81(3-4), 660-668.

34. Velíšek, J., & Cejpek, K. (2011). Pigments of higher fungi: a review. *Czech J Food Sci*, 29(2), 87-102.
35. Villegas, E., Aubague, S., Alcantara, L., Auria, R., & Revah, S. (1993). Solid state fermentation: acid protease production in controlled CO₂ and O₂ environments. *Biotechnology advances*, 11(3), 387-397.
36. Zhu, Y., Smits, J. P., Knol, W., & Bol, J. (1994). A novel solid-state fermentation system using polyurethane foam as inert carrier. *Biotechnology Letters*, 16(6), 643-648.

Anexos

```
PoloPlus Version 1.0
Date: 13 FEB 2018
3 HAA
Data file: C:\Users\silvia\Desktop\resultados del probit\Pam2.txt
Number of preparations: 1
Number of dose groups: 15
Model: Probit
Natural Response Parameter: no
Convert doses to logarithms: yes
LDs: 50 P9
~~~~~

3 HAA
 96 horas  subjects 75  controls 5
  slope=0.992+-0.258  nat.resp.=0.000+-0.000
 heterogeneity=0.45
 LD50=22.540  95% limits: 10.604 to 90.908
 LDP9=243368.008  95% limits: 7355.875 to 0.000
```