

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**CONTROL DE INSECTOS DE GRANOS
ALMACENADOS MEDIANTE VOLÁTILES
PROVENIENTES DE BACTERIAS
MARINAS DEL CARIBE COLOMBIANO**

Álbert Danilo Patiño Restrepo

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2019

Control de insectos de granos almacenados mediante volátiles provenientes de bacterias marinas del caribe colombiano

Álbert Danilo Patiño Restrepo

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Química

Directora:

Dr. Sci. Diana Cristina Sinuco León

Codirectora:

Dr. Sci. Juliet Angélica Prieto Rodríguez

Línea de investigación:

Productos Naturales

Grupos de investigación:

Bioprospección de compuestos volátiles

Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos y frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias - Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019

DEDICATORIA

Creo en el universo como una caja negra de inmensas posibilidades, en el cual todos somos responsables de las decisiones que tomamos y a partir de estas formar nuestra vida y nuestro destino. Es de humanos errar pues somos los más imperfecto que puede existir, pero en nosotros queda la labor de resarcir el daño causado, ser mejores seres humanos cada día, y hacer de la vida un experiencia maravillosa para los demás. Dedico este trabajo a todas aquellas personas que alguna vez cometieron un error y lograron superarlo y hacer de eso una lección de vida para transfigurar su entorno, pues este trabajo es el fruto de ese esfuerzo y de alguien que quiere cambiar el mundo desde las ciencias y una aula de clase.

Patiño Albert, 2019

Agradecimientos

Agradezco a Dios, la vida, el cosmos y todas aquellas causalidades que me llevaron a finalizar este hermoso proyecto, en el cual vemos a la biodiversidad como un laboratorio químico donde todo puede ocurrir bajo las leyes de la naturaleza.

A la Universidad Nacional de Colombia y la dirección académica por su beca asistente docente, que me permitieron financiar mis estudios de posgrado y terminar el programa de magister en Ciencias-Química que hoy finaliza, sin desmeritar los apoyos económicos recibidos en mi pregrado como estudiante lejano de Bogotá, fueron de mucha ayuda todos estos años, esta es mi casa y la llevaré en alto a donde quiera que vaya, orgulloso de pertenecer a mi alma mater.

Al proyecto de la DIEB titulado “Evaluación de la actividad biológica de compuestos volátiles liberados por bacterias aisladas de ambientes marinos”, financiado por la Universidad Nacional de Colombia, que permitió emprender y desarrollar proyectos de investigación que aportaron al conocimiento del metabolismo volátil de la microbiota marina colombiana, dentro de las cuales se enmarca esta tesis de maestría.

Al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible y el ANLA por otorgar los permisos de acceso a recursos genético de muestras y ensayos para investigación (permiso N°4 del 10/02/2010, Anexo 2, Contrato de Acceso a Recursos genéticos No 108).

Agradezco a los grupo de investigación “Estudio químico y de actividad biológica de Rutaceae y Myristicaceae colombianas vegetales” y el insectario de la facultad de ciencias agronómicas a cargo del profesor Augusto Ramírez Godoy, ambos de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá por el pie de cría de los insectos y permitirme criarlos en ese lugar.

Agradezco al grupo de investigación “Fitoquímica de la Universidad Javeriana” (GIFUJ) sede Bogotá por lo permitirme criar los insectos, usar el equipo GC-MS y apoyarme en materiales necesarios para el montaje del bioensayo.

Agradezco al grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales y frutas de Colombia” por facilitar los aislamientos bacterianas y permitirme usar las instalaciones para la realización del proyecto de investigación.

VIII Control de insectos de granos almacenados mediante volátiles provenientes de bacterias marinas del caribe colombiano

Agradezco a mis amados padres Danilo y Jaqueline por apoyarme emocional y económicamente todos estos años y en esta locura que quise emprender un día, vivir en una ciudad tan grande y desconocida para mi sin tener idea que podría pasar, a ellos les debo todo lo que soy hoy y seré en un futuro. Una mención especial a mi padre, un hombre que me enseñó que no existen las discapacidades físicas, que todo en nuestra vida es mental, y que con el favor de Dios todo es posible. El hombre que me enseñó valores como la humildad, la responsabilidad y la persistencia, la cual hace este trabajo todo un regalo para él. Las enseñanzas que me ha dado este hombre amado son inexpresables, pues todos sus sueños y metas están expresados a través de mí y mi ganas de ser un echado para adelante y jamás dejarme caer.

Agradezco a mis hermanos, Edwin, Gustavo y Yesica por apoyarme en mi estudio todos estos años por creer en mi como el ñoñito de la familia (jejeje), por aguantarme mi actitud y por ayudarme a ser mejor persona cada día, sus consejos, sus reconocimientos y lo más importante enseñarme el perdón y darme la oportunidad de volver a empezar de nuevo fueran las condiciones que fueran.

A mis estimados profesores Leonardo y Freddy, les doy las gracias por acogerme en su grupo de investigación desde ya hace 4 años, por perdonarme mis grandes embarradas, de ser mis segundos padres en esta gran ciudad. Quiero hacer una mención especial al profe Leonardo una gran persona que la vida me permitió conocer, siempre creyó en mí y en mis locas ideas de investigación en querer hacer de todo y al final no hacer mucho. En reconocer todo el esfuerzo que hice, para seguir con mis proyectos, en permitirme seguir después de todos los errores en recuperar parte de la confianza en mí y sobre todo ver en mi esa alma de investigador que llevo adentro. De un profesor como el me llevo grandes enseñanzas como el de “ser señor antes que doctor”, la capacidad que tenemos los seres humanos para corregir nuestros errores y aprender de ellos para hacer un mundo un lugar mejor y lo más importante ayudar a los demás sin esperar retribución alguna, este hombre trabaja para y por los estudiantes, (mis más sinceras admiraciones).

A mis jefas Diana y Juliet mis dos nuevas mamás, que desde el primer día sin conocerme a mi o mi trabajo, creyeron en mi sin importar lo loco que fueran mis ideas. Me proporcionaron todo lo necesario para que este trabajo tuviera estos excelentes resultados y adicional a esto

me aceptaron después de mis errores cometidos en el pasado, a ellas les doy gracias por su amor a la ciencia, su compasión y el acto de amor al corregir mis textos difíciles de apreciar en su belleza absoluta.

A mis compañeros de laboratorio con los cuales emprendimos un gran sueño algún día, asistiendo a charlas de ciencia que se fueron convirtiendo en el lenguaje de nuestro diario vivir, por los buenos y por lo malos ratos, en esta vida se vive de todo y de eso trata, por los cumpleaños, los congresos, las comidas extremas (cerditos), las horas de trabajo extenuantes. Resalto a mis compañeros Juan David y Dianita, por enseñarme el mundo maravilloso de la microbiología y como esta puede ser usada para encontrar un mundo desconocido que pocos aprecian, siempre será un universo dentro de otro universo por investigar.

A mi amiga y compañera de laboratorio Lady, fuiste mi gran apoyo todo este tiempo y mi modo de seguir en la lucha, juntos decidimos hacer parte de esta locura y aquí estamos, espero pronto hacer parte de tu gran éxito, destaco de esta persona muchos valores como el respeto, la tolerancia, la generosidad y una gran persona que me apoyo en momentos muy difíciles a pesar de mis errores y siempre estuvo ahí fuera lo que fuera, muchas gracias por estar allí, cuando más lo necesite.

Agradezco a mi mejor amigo Juan Martín, por ser ese hermanito comprensivo y amoroso que siempre estaba en casa al terminar cada día, por su compañía durante cada traspasada, su apoyo incondicional son cosas que siempre estarán en mi corazón, las experiencias, las risas, los viajes, lo más importante siempre cuidando de mí y de mi bienestar (siempre hubo una cobija y un acuéstate a dormir que te cogió el sueño leyendo) y por supuesto me enseñó a ser mejor persona.

A los nuevos chicos que están llegando a Marinos les dejamos un legado de paciencia, amor y perseverancia por la ciencias, este no es un camino fácil donde todo está hecho, es un camino donde todo está por hacer y ahí radica toda su magia. Cuiden este lugar como su propia casa y jamás querrán salir de ella.

Son muchas personas por agradecer en este hermoso regalo que es la vida, procura dejar huellas en este largo camino.

Resumen

El almacenamiento de granos como frijol, trigo, maíz, entre otros, sufre grandes afectaciones por la invasión de insectos plaga que generan efectos negativos como disminución en el valor nutricional y pérdida de peso, así como cambios en la temperatura y humedad del almacenamiento que propician condiciones para la proliferación de microorganismos.

El control químico es la forma más efectiva para atacar estos insectos plaga. Sin embargo, estos compuestos presentan complicaciones toxicológicas y ambientales, que ameritan la búsqueda de alternativas de control. Así surge la idea de buscar en microorganismos provenientes de ambientes marinos, como fuente novedosa de compuestos con actividad biológica, compuestos orgánicos volátiles (COVs) con actividad insecticida.

En este trabajo se exploraron 21 aislamientos bacterianos provenientes del caribe colombiano como fuente de COVs. Para ello se desarrolló e implementó un bioensayo insecticida que permitió seleccionar cuatro aislamientos bacterianos como posibles fuentes de COVs con actividad insecticida sobre el insecto *T. castaneum*. Así se estudiaron los COVs liberados por los aislamientos bacterianos identificados como PNM-39 (*Paenibacillus sp.*), PNM-123 (*Paenibacillus sp.*), PNM-143 (*Streptomyces sp.*) y PNM-201 (*Paenibacillus sp.*).

La extracción de los COVs se realizó por microextracción en fase sólida (HS-SPME) y los perfiles metabólicos volátiles (PMVs) se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS). Se identificaron diversos grupos funcionales entre los que se destacan monoterpenos, sesquiterpenos, ésteres alifáticos y compuestos aromáticos en el aislamiento PNM-143; cetonas alifáticas, metilcetonas y compuestos aromáticos en los aislamientos PNM-123 y PNM-201; y compuestos azufrados en el aislamiento PNM-39.

Con el fin de corroborar la actividad insecticida de los COVs identificados, se realizó un bioensayo de modelo fumigante frente a los insectos *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum*. Así se determinó que los compuestos con mayor actividad insecticida fueron benzotiazol (LC_{50} 33,5 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ frente *T. castaneum* y LC_{50} 3,3 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ *S. zeamais*) y 2-

heptanona (LC_{50} 27,96 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ frente a *S. oryzae*), la cual es semejante a la obtenida con el insecticida comercial Nuvan50EC® usado como control.

Palabras clave: bacterias aisladas de ambientes marinos, compuestos orgánicos volátiles, actividad insecticida, *T. castaneum*, *Sitophilus spp.*

Abstract

The storage of grains such as beans, wheat, corn, among others, suffers great damage due to the invasion of insect pests that generate negative effects such as a decrease in the nutritional value and weight loss, as well as changes in the temperature and humidity of storage which creates conditions for the proliferation of microorganisms.

Chemical control is the most effective way to attack these insect pests. However, these compounds present toxicological and environmental complications, which require the search for control alternatives. In this way, microorganisms from marine environments becomes as a novel source of compounds with biological activity and as source of volatile compounds with insecticidal activity.

In this work, 21 bacterial isolates from the Colombian Caribbean were explored as a source of VOCs. An insecticidal bioassay was developed and implemented to select four bacterial isolates as possible sources of VOCs with activity against *T. castaneum* insect. Thus, VOCs released by bacterial isolates identified as PNM-39 (*Paenibacillus* sp.), PNM-123 (*Paenibacillus* sp.), PNM-143 (*Streptomyces* sp.) and PNM-201 (*Paenibacillus* sp.) were studied.

The extraction of the VOCs was carried out by solid phase microextraction (HS-SPME) and the volatile metabolic profiles (PMVs) were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GCMS). Several functional groups were identified, among which monoterpenes, sesquiterpenes, aliphatic esters and aromatic compounds on PNM-143; aliphatic ketones, methyl ketones and aromatic compounds in PNM-123 and PNM-201 isolates; and sulfur compounds in PNM-39.

In order to corroborate the insecticidal activity of the identified VOCs, a fumigant model bioassay was carried out against insects *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum*. It was determined that the compounds with the highest insecticidal activity were benzothiazole (LC₅₀ 33.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ against *T. castaneum* and LC₅₀ 3.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ *S. zeamais*) and 2-heptanone (LC₅₀ 27.96 $\mu\text{mol L}^{-1}$ against to *S. oryzae*), which is like that obtained with the commercial insecticide Nuvan50EC® used as a control.

Keywords: marine bacterias, volatile organic compounds, insecticide activity, *T. castaneum*, *Sitophilus* spp.

Contenido

	pág
1. Capítulo 1: Marco teórico.....	5
1.1 Principales insectos plaga en granos almacenados	5
1.1.1 Insectos del género <i>Tribolium</i> sp.....	7
1.1.2 Insectos del género <i>Sitophilus</i> sp.....	8
1.2 Control químico para control de insectos en granos almacenados.....	10
1.3 Microorganismos como fuente de compuestos con actividad insecticida.....	13
1.4 Compuestos orgánicos volátiles liberados por microorganismos como solución para el control de insectos.....	15
1.5 Bioensayos de actividad insecticida volátil de microorganismos.....	17
1.6 Conclusiones.....	18
1.7 Referencias.....	20
2. Capítulo 2: Diseño de un bioensayo insecticida <i>in vivo</i> (microorganismo-insecto) por medio de COVs.....	27
2.1 Introducción.....	28
2.2 Materiales y métodos.....	30
2.2.1 Material biológico.....	30
2.2.2 Esterilidad del bioensayo.....	32
2.2.3 Ensayo de supervivencia de los insectos a temperatura de crianza	33
2.2.4 Bioensayo de actividad insecticida caja cerrada mediada por COVs	33
2.3 Resultados y discusión.....	36
2.3.1 Selección de los aislamientos más promisorios.....	36
2.3.2 Diseño del bioensayo insecticida caja cerrada.....	37
2.3.3 Variación de la mortalidad en función de los días	43
2.4 Conclusiones.....	45
2.5 Referencias.....	45
3. Capítulo 3: Análisis de compuestos volátiles con actividad insecticida	49
3.1 Introducción.....	50
3.2 Materiales y métodos.....	50
3.2.1 Materiales y reactivos.....	50
3.2.2 Métodos de extracción de COVs	51

3.2.3 Separación e identificación	52
3.3 Resultados y discusión.....	53
3.3.1 Comparación de métodos de extracción de COVs.....	53
3.3.2 Perfil metabólico del aislamiento PNM-143 (<i>Streptomyces sp.</i>)	53
3.3.3 Perfil metabólico volátil de los aislamientos PNM-123, PNM-201, PNM-39 (<i>Paenibacillus sp.</i>).....	56
3.4 Conclusiones	59
3.5 Referencias	60
4. Capítulo 4: Ensayos de actividad fumigante sobre insectos <i>Tribolium castaneum</i>, <i>Sitophilus oryzae</i>, <i>Sitophilus zeamais</i>.....	63
4.1 Introducción.....	64
4.2 Materiales y métodos	65
4.3 Discusión y resultados	66
4.4 Conclusiones	74
4.5 Referencias	75
5. Recomendaciones y perspectivas.....	79

Lista de figuras

Pág.

Figura 1-1 Morfología de <i>Tribolium castaneum</i> . Tomado de (20)	7
Figura 1-2 Ciclo de reproducción de <i>Tribolium castaneum</i> . Tomado de (22).....	8
Figura 1-3 Ciclo de vida de los insectos del género <i>Sitophilus</i> . Tomado de (24).....	10
Figura 1-4 Algunos de los compuestos orgánicos volátiles insecticidas reportados.....	16
Figura 1-5 Bioensayo de actividad repelente mediada por volátiles liberados por el hongo <i>Muscodora vigintineus</i> en el insecto plaga <i>Cephus cinctus</i> (41).	17
Figura 2-1 Bioensayo de actividad insecticida de COVs liberados por bacterias sobre insectos plaga.....	34
Figura 2-1 Variación del porcentaje de mortalidad de <i>T. castaneum</i> en función del tiempo en el bioensayo insecticida caja cerrada para los aislamientos PNM-39 (<i>Paenibacillus sp.</i>), PNM-123 (<i>Paenibacillus sp.</i>), PNM-143(<i>Streptomyces sp.</i>) y PNM-201(<i>Paenibacillus sp.</i>).....	44
Figura 3-1. Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza del bioensayo insecticida de COVs liberados por bacterias.....	52
Figura 3-2 a) TIC del HS-SPME para la bacteria PNM-143 a 48h del bioensayo, b) TIC del HS-SPME del blanco de medio de cultivo ISP2 a las 48h	54
Figura 3-3. TIC del HS-SPME para las bacterias a las 96 h del bioensayo a) PNM-123, b) PNM-201, c) PNM-39 y d) blanco (LB)	57
Figura 4-1. Número de compuestos activos por grupo funcional para <i>T. castaneum</i> , <i>S. zeamais</i> y <i>S. oryzae</i>	70

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1-1. Principales insectos plaga que afectan el almacenamiento de granos (6)	5
Tabla 1-2. Diferencias entre <i>S. zeamais</i> y <i>S. oryzae</i> . Tomado de (23) (24).....	9
Tabla 1-3. Insecticidas recomendados y sus tasas de aplicación (28)	12
Tabla 2-1. Microorganismos seleccionados para ser ensayados con su respectivo medio de cultivo.....	31
Tabla 2-2. Supervivencia de los insectos a la temperatura y humedad del bioensayo.	40
Tabla 2-3. Porcentaje de mortalidad de <i>T. castaneum</i> en el bioensayo con variación de volumen y cantidad UFC/caja estándar.....	41
Tabla 3-1. Microorganismos a estudiar su perfil metabólico volátil	62
Tabla 3-2. Compuestos orgánicos volátiles identificados del aislamiento PNM-143 (<i>Streptomyces sp.</i>).....	62
Tabla 3-3. COVs identificados los aislamientos <i>Paenibacillus spp.</i>	62
Tabla 4-1. Porcentaje de mortalidad en el modelo fumigante de los compuestos evaluados a una concentración de 90,1 $\mu\text{L.L}^{-1}$ sobre los insectos <i>T. castaneum</i> , <i>S. zeamais</i> , <i>S. oryzae</i>	68
Tabla 4-2. Concentración letal 50 (LC ₅₀) para los compuestos activos de la fase preliminar en los insectos <i>T. castaneum</i> , <i>S. zeamais</i> , <i>S. oryzae</i>	71

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
DCM	Diclorometano
GCMS	Cromatografía acoplada a espectrometría de masas
LC ₅₀	Concentración letal 50
SPME	Microextracción en fase sólida
UV	Ultravioleta
HS	Espacio de cabeza
DVB/CAR/PDMS	divinilbenceno/carboxen/polidemitilsiloxano
PMV	Perfil metabólico volátil
FAO	Food and agriculture organization
AIP	Fosforo de aluminio
UFC	Unidad formadora de colonia
PNM	Productos naturales marinos
IBUN	Instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
LB	Luria Bertani
H.R.	Humedad relativa
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
nm	nanometros
NaClO	Hipoclorito de sodio
CH ₃ CH ₂ OH	Etanol
μL	Microlitros
SPME	Microextracción en fase sólida
COVM	Compuestos orgánicos volátiles microbianos
IE	Impacto electrónico

TIC	Total ion current
NR	No se reporta un valor de literatura
IR	Índice de retención
OMS	Organización mundial de la salud
$\mu\text{mol.L}^{-1}$	Micromol por litro

Introducción

Colombia es un país donde la agricultura juega un papel importante en el desarrollo económico del país, pues es la fuente principal de ingresos al área rural, hace un aporte significativo al avance económico, la mitigación de la pobreza, la seguridad alimentaria y el desarrollo sostenible del país. A su vez, la agricultura colombiana es muy diversa gracias a sus pisos térmicos y el arduo trabajo que realizan sus campesinos(1).

Las últimas cifras reportadas por el ministerio de agricultura para el sector agrícola en el año 2017 reportan que éste creció 4,9% respecto al año 2016 y que se espera que para el 2018 el crecimiento este alrededor del 6,0%. Las cifras reportadas corroboran el buen trabajo de los nuevos proyectos de innovación, propuestos por el ministerio de Agricultura, como “Colombia siembra” el cual se encuentran promoviendo el desarrollo del agro en el país y así generando mayor producción agrícola(2).

Según el Banco de la República los principales productos agrícolas que aportan a la economía del país son el café, el cacao, el arroz, el maíz y otros granos (1). La producción de estos últimos es periódica, mientras que el consumo es permanente, así pues, se requiere hacer un debido almacenamiento de éstos para garantizar su abastecimiento durante todo el año. Dicho almacenamiento requiere de ciertos tipos de cuidados y condiciones ambientales. En este punto juegan un rol muy importante la humedad y la temperatura, ya que estos factores son los encargados de mantener el grano hidratado y con el menor deterioro posible. No obstante, hay otros factores que pueden influir en la preservación del grano como el ataque de hongos, insectos y roedores(3).

En Colombia las plagas de mayor importancia económica son los gorgojos, que ocasionan pérdidas de alrededor del 10% de la toda la producción en granos almacenados, conllevando a pérdidas en el peso, disminución del valor nutricional y del poder germinativo, mal olor e incluso generan condiciones para la proliferación de microorganismos. En la actualidad se ha

hecho la mayor cantidad de esfuerzos para controlar los insectos puesto que estos son una plaga, ya que presentan tasas de reproducción bastantes altas y poseen mecanismos de infestación mediado por feromonas, los cuales les permiten invadir toda una zona en muy poco tiempo(4).

Dentro de las plagas de mayor importancia económica, se destacan los insectos del género *Sitophilus* spp., considerados una plaga primaria que se caracterizan por atacar los granos en campo antes de su traslado al almacenamiento. En este ciclo de infestación suelen aparecer las plagas secundarias las cuales se alimentan de los granos dañados por plagas primarias o granos partidos. Como representante de este grupo se encuentran insectos del género *Tribolium* spp. (5)(6). En general ambos géneros de insectos tienen una capacidad de alimentación amplia y se multiplican con facilidad(7).

En la actualidad existen diferentes formas de realizar el control de dichos insectos tales como, control físico, biológico y químico, siendo este último el más efectivo. El control químico se realiza básicamente por la dispersión en el ambiente de insecticidas sintéticos, que generan una atmósfera con una concentración letal para los insectos. Otras aplicaciones usan sustancias químicas sólidas que se trituran y esparcen sobre los granos. Los insecticidas comerciales más empleados son: Nuvan50®, Malathion®, Diclorvac®, Carbaryl®, entre otros(5)(8). Dada la alta solubilidad en agua, la adsorción en la superficie del grano tratado y/o del suelo y su baja especificidad, estos insecticidas generan contaminación ambiental y resistencia (9).

Es así como surge la necesidad de encontrar nuevos compuestos con actividad insecticida. Así se ha explorado a la naturaleza como fuente de compuestos que no afecten significativamente un mismo nicho ecológico (10). En los últimos 10 años, los microorganismos aislados de ambientes marinos se han estudiado como fuente de compuestos con actividad biológica. (10)(11)(12).

El caribe colombiano ofrece una diversidad de microorganismos, que liberan compuestos orgánicos volátiles (COVs) que pueden estar asociados con procesos de comunicación, alerta y defensa contra predadores(13). Es así como en este trabajo se explora por primera vez la actividad insecticida de la fracción volátil liberada por microorganismos aislados de ambientes

marinos. Para ello se diseñó un bioensayo para evaluar y medir la actividad insecticida de los COVs liberados por bacterias frente a *Tribolium castaneum*. Así se seleccionaron las bacterias más promisorias en esta actividad para estudiar su fracción volátil (capítulo 2). Se identificaron los COVs presentes espacio de cabeza del bioensayo (capítulo 3). Finalmente, la actividad insecticida de los compuestos identificados se evaluó contra los insectos *Sitophilus zeamais*, *Sitophilus oryzae* y *Tribolium castaneum* (capítulo 4).

Los resultados obtenidos son promisorios y ofrecen una alternativa para el desarrollo de insecticidas que permitan el control químico de insectos por fumigación.

1. Capítulo 1: Marco teórico

1.1 Principales insectos plaga en granos almacenados

Los cereales se cultivan en grandes hectáreas anualmente en todo el mundo para garantizar la provisión adecuada de granos a toda la población. La producción mundial de maíz, arroz, soja y trigo durante el 2017 fue alrededor de tres millones de toneladas (14). Con el fin de garantizar la seguridad alimentaria, los granos se conservan en bodegas y almacenes para servir como fuente de suministro durante todo el año. Sin embargo, los granos son muy susceptibles a la infestación por insectos plaga(15).

A la fecha se registran 250 especies de insectos-plaga que afectan los productos almacenados de los cuales 20 son considerados de gran importancia. En la Tabla 1-1 se presentan las principales plagas encontradas en zonas tropicales.

Tabla 1-1 Principales insectos plaga que afectan el almacenamiento de granos (6)

<i>Nombre científico</i>	<i>Nombre común</i>
<i>Sitophilus zeamais</i>	Picudo del maíz
<i>Sitophilus oryzae</i>	Picudo del arroz
<i>Tribolium castaneum</i>	Gorgojo castaño de la harina
<i>Tribolium confusum</i>	Gorgojo confuso de la harina
<i>Sitotroga cerealella</i>	Polilla dorada del maíz
<i>Plodia interpunctella</i>	Polilla de la harina
<i>Acanthoscelides obtectus</i>	Gorgojo del frijol
<i>Zabrotes subfasciatus</i> Boheman	Gorgojo pinto del frijol

Los insectos-plaga varían de acuerdo con la región y el periodo de almacenamiento. Según el daño causado al grano, los insectos se clasifican en especies primarias y secundarias.

Las especies primarias se caracterizan por atacar al grano limpio y seco y generan la primera infestación. Son los más nocivos durante el almacenamiento ya que al terminar su ciclo reproductivo dejan el grano picado y lleno de huevos. Los daños de estos comienzan en campo y son trasladados a los lugares de almacenamiento. Representantes de este grupo están el gorgojo del maíz (*Sitophilus zeamais*), Polilla dorada del maíz (*Sitotroga cerealella*), el gorgojo pinto del frijol (*Zabrotes subfasciatus Boheman*), entre otros.

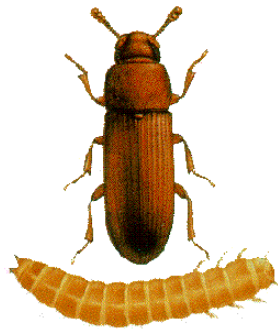
Las especies secundarias no son capaces de atravesar la barrera de protección de los granos así que se alimentan de, granos dañados por especies primarias, granos partidos, productos y subproductos de la molienda, y procesados. La capacidad de alimentación de estos insectos es bastante amplia. Se multiplican con facilidad debido a ciclos cortos de reproducción y el número de individuos generados por ciclo. De los más importantes de este grupo están el gorgojo rojo de la harina (*Tribolium castaneum*), la polilla de la harina (*Plodia interpunctella*) y el carcoma dentado (*Oryzaephilus surinamensis*), entre otros.

Las pérdidas por insectos-plagas se encuentran entre 10 y el 20% al nivel mundial, pero en zonas como los trópicos ascienden hasta el 40%, lo cual representa una gran pérdida para el PIB de países como el nuestro. Los principales efectos directos tras la alimentación de estos insectos son la pérdida en peso, pérdida de la capacidad germinativa, disminución del valor nutricional, mal olor, aumento en contenido de ácidos grasos lo cual se relaciona con la rancidez de los granos. Efectos indirectos asociados a los insectos-plaga son la generación de condiciones de humedad y temperatura para que se desarrollen otras especies de insectos, en sí, estas mismas contribuyen a generar condiciones de proliferación de hongos y otros microorganismos(5)(16)(17).

1.1.1 Insectos del género *Tribolium* sp.

El género *Tribolium* se encuentra constituido aproximadamente por 30 especies. Varias de estas especies son asociadas a plagas de almacenamiento como *T. castaneum* y *T. confusum*, comúnmente conocidos como gorgojos de la harina, los cuales generan impactos económicos bastante graves debido a su distribución cosmopolita y su afinidad al grano almacenado. Además, estos insectos poseen una larga historia de uso como organismo modelo (18).

Tribolium castaneum en forma adulta es delgado, de color rojizo marrón y forma aplanada, este mide alrededor de 3 a 4 mm, posee antenas y 3 segmentos redondeados al lado del tórax (Figura 1-1). Posee alas y vuela a distancias muy cortas. El insecto en estado larvario mide alrededor de 4 a 10 mm posee un cuerpo duro, cilíndrico y tiene un color blanco con manchas amarillas (19).



Reino: Animalia
Filo: Arthropoda
Clase: Insecta
Orden: Coleoptera
Familia: Tenebrionidae
Género: <i>Tribolium</i>
Especie: <i>Tribolium castaneum</i>

Figura 1-1 Morfología de *Tribolium castaneum*. Tomado de (20)

Ciclo de vida

El ciclo de vida incluye 4 estadios: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 1-2). Los huevos son microscópicos de color blanco brillante. La etapa de huevo dura típicamente 4-5 días en condiciones ideales de crecimiento en laboratorio. Las larvas son similares a gusanos y de color blanco amarillento. En óptimas condiciones, esta etapa tarda alrededor de 2-3 semanas. Las pupas son de color claro y blanco. Las pupas no poseen locomoción. Los sexos son dimórficos y fácilmente diferenciables como pupas, porque las hembras poseen papilas genitales más grandes en comparación a las de los machos. En un ambiente la etapa pupal puede durar 5-6 días. El ciclo de vida típico de huevo a adulto en el laboratorio puede tardar 4 semanas en

condiciones óptimas de comida, temperatura y humedad. Sin embargo, la tasa de crecimiento de desarrollo de huevo a adulto varía mucho puede ser hasta de 9 semanas. Lo adultos pueden vivir hasta 3 años, aunque la vida útil de estos es de 1-6 meses (21).

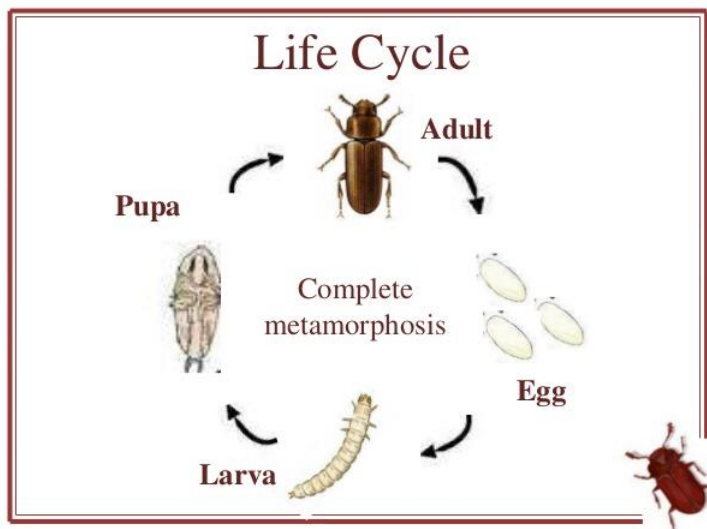


Figura 1-2 Ciclo de reproducción de *Tribolium castaneum*. Tomado de (22)

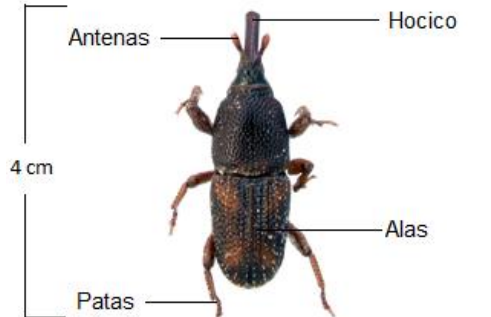

1.1.2 Insectos del género *Sitophilus* sp.

Los insectos del género *Sitophilus*, conocidos coloquialmente como gorgojos. Pertenecen a la familia curculionidae y las especies más representativas de este género son el gorgojo de arroz (*S. oryzae*), el gorgojo del trigo (*S. granarius*) y el gorgojo del maíz (*S. zeamais*). Los gorgojos del arroz y el maíz tienen una distribución casi cosmopolita y se proliferan en las zonas más cálidas del mundo, en Europa se encuentra proliferando principalmente el gorgojo del trigo(6).Estos atacan cultivos en crecimiento, así como granos almacenados entre los que se encuentran trigo, arroz, sorgo, avena, cebada, centeno, arvejas y semillas de algodón. También infesta otros tipos de productos de cereales almacenados y procesados, como la pasta, la yuca y varios granos gruesos y molidos. Incluso se sabe que ataca algunas frutas durante el almacenamiento, como las manzanas.

El insecto hembra abre un orificio al grano deposita un huevo, generalmente un huevo por grano individual. Esta sella el agujero con una secreción. La larva se alimenta y se desarrolla en el interior de grano hasta pupa. Por lo general, deja el grano completamente hueco hasta que se convierte en adulto. La infestación por *Sitophilus* spp. produce gran cantidad de calor y humedad, lo que favorece la pérdida de calidad del grano, el crecimiento de hongos y de poblaciones de otras especies de insectos(18).

El insecto *S. zeamais* tiene una longitud de 2,5 a 4 mm es de color marrón y tiene cuatro manchas de color rojizo en las cubiertas de las alas. Su vecino más cercano es *S. oryzae* y suelen confundirse entre ellos. Sin embargo, existen varias características que los diferencian entre ellos, como se muestran en la Tabla 1-2.

Tabla 1-2 Diferencias entre *S. zeamais* y *S. oryzae*. Tomado de (23) (24)

Morfología <i>Sitophilus zeamais</i>	Morfología <i>Sitophilus oryzae</i>
 <p>Tamaño 2,5-4 mm Hocico delgado (0,5 mm) Cuatro manchas de color rojizo cubiertas en las alas Antenas acodadas</p>	 <p>Tamaño 2,1-2,5 mm Hocico largo (1mm) Color marrón rojizo o negro con cuatro manchas amarillas Antenas largas y puntudas</p>

Ciclo de vida

En la Figura 1-3 se muestra el ciclo de vida de los insectos del género *Sitophilus*. Este dura alrededor de 36 días. La hembra mastica la superficie del grano, creando un agujero. A continuación, deposita un pequeño huevo blanco ovalado. Solo se pone un huevo dentro de cada grano y es capaz de depositar de 8 a 10 huevos por día. El huevo mide 0,7 mm y tiene forma ovalada y eclosiona de 3-5 días después de ser ovipositado. De este salen larvas blancas,

sin patas, de cuerpo grueso con cabeza pequeña. Estas permanecerán adentro y comenzará a alimentarse del grano. Posee 4 estadios larvales por los cuales pasa en un periodo de 19-34 días. Las larvas puparán mientras están adentro. Estas pupas son de color blanco, con algo de semejanza al adulto, con cabeza redonda, patas dirigidas hacia el cuerpo y alas cubriéndolos. Tarda de 3-6 días en pasar de ninfa a adulto. luego masticarán un orificio de salida circular, y emergerán como un escarabajo adulto. Una sola hembra puede poner de 300 a 400 huevos durante su vida. Los adultos pueden vivir de 5 a 8 meses. Las condiciones de reproducción requieren temperaturas entre 15 y 34 ° C y 40% de humedad relativa(25).

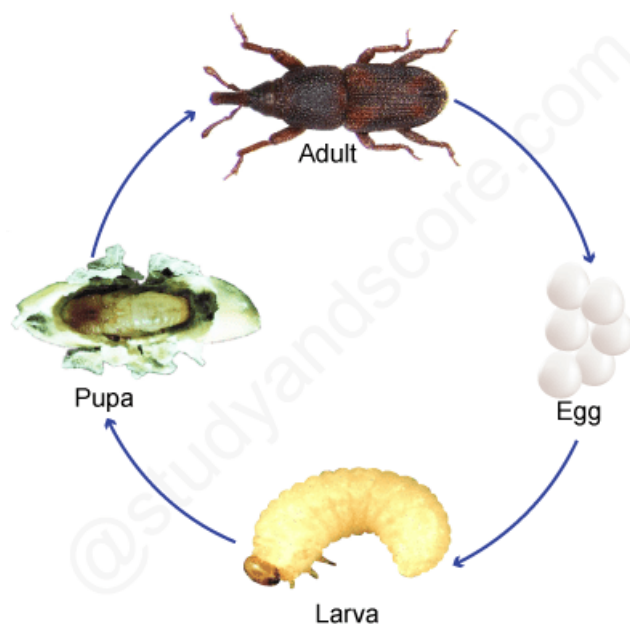


Figura 1-3 Ciclo de vida de los insectos del género *Sitophilus*. Tomado de (24)

1.2 Control químico para control de insectos en granos almacenados

Si bien existen diversas formas de control, el uso de productos químicos mediante la aspersión o difusión de polvos o líquidos con el fin de generar la mortalidad completa de los insectos y la prevención de crecimientos de insectos es la más empleada y eficaz.

Tratamiento preventivo: Se realizan sobre el grano, tratando de generar condiciones inadecuadas para el desarrollo de plagas. En esta caso, también se trata con polvos o líquidos que se espolvorean o rosean sobre el grano en movimiento. En muchos casos los sólidos que acompañan los plaguicidas en polvo pueden afectar la residualidad del mismo; además, la presión de vapor de los líquidos les da posibilidad a estos de actuar con rapidez y ejercer control parcial sobre insectos jóvenes u ocultos en el grano. Es de resaltar, que algunos de los sólidos inertes que acompañan la formulación de los polvos pueden afectar el porcentaje de humedad del grano disminuyendo así su peso. Esta afectación perjudica al trigo ya que una forma de comercializar este, establece un porcentaje de humedad, como una característica para su compra(26).

Luego de que una plaga ya ha invadido completamente una bodega o silo se debe requerir al tratamiento curativo, el cual puede ser de dos clases: **Tratamiento de insecticida por contacto:** Este consiste en cubrir el grano con una película de insecticida que actúa en contacto con los insectos, con efectos que varían en rapidez y resistencia. Estos productos vienen en diversas formas (polvos para espolvorear, polvos para mezclar con agua, concentrados líquidos o fumigantes). Para el grano que se almacenara al granel, el insecticida se espolvorea directamente en el grano por pulverización antes de que los silos se llenen. Para almacenamiento en bolsas, el grano se mezcla con el polvo y luego se embolsa. Con el fin de evitar la reinfestación en las bolsas se esparcen cantidades considerables del polvo mientras se apilan las bolsas y durante el periodo de almacenamiento. La maquinaria para remover el polvo aplicado puede ser un plumero mecánico e incluso un plumero motorizado(27). Ejemplos de este tipo de insecticidas y sus dosis recomendadas por la FAO para tratamiento por contacto son mostrados en la Tabla 1-3.

Tratamiento de insecticida por fumigación: La fumigación es un tratamiento que elimina los insectos del grano almacenado por medio de un gas venenoso llamado fumigante. Esta sustancia producida y concentrada como un gas, es letal para especies vivas específicas. A diferencia de los polvos de contacto, el fumigante penetra en el interior de la masa de los granos y alcanza las formas incipientes (huevos, larvas) en gran parte invisibles que desarrollan allí. Los fumigantes se difunden por toda el área donde fueron asperjados, por lo tanto, se usan en un recinto totalmente sellado. Así pues, cuando el grano a granel se fumiga, los contenedores deben estar completamente sellados herméticamente. Para el grano

12 control de insectos de granos almacenados mediante volátiles provenientes de bacterias marinas del caribe colombiano

almacenado en bolsas, el método habitual es cubrir la bolsa con unas lonas que permanezcan aseguradas al suelo. La eficacia de la fumigación depende de la concentración real del gas y del tiempo durante el cual se fumiga el grano. (29)

Tabla 1-3 Insecticidas recomendados y su dosis de aplicación (28)

Insecticida	Aditivo para polvo con cereales (ppm)	Tratamiento de superficie (g/m ³)	
		Paredes	Bolsas
Malatión®	8-12	1-2	1-2
Pirimifos de metilo®	4-10	0,5	0,5
Fenitrotión®	4-12	0,5	0,5-1
Clorpirifos metilo®	4-10	0,5-1	0,5-1
Diclorvos®	2-20	0,5	-
Metacrifos®	5-15	0,2	0,4
Lindano®	0,5	-	-
Piretrina®	3	0,1	-
Resmetrina®	2	-	-
Fenotrina®	5	-	-
Permetrina®	0,05-0,1	0,05-0,1	-
Carbaril®	5-10	1-2	-
Bendiocarbo®	0,1-0,2	-	-
Dixiocarbo®	0,4-0,8	-	-

Dentro de los gases más utilizados para tal fin esta fosfina, el cual puede ser aplicado por aireación y por vía de fosfuro de aluminio o fosfuro de magnesio, estos últimos son sólidos y reaccionan con la humedad de la atmosfera para producir el gas fosfina. El manejo de fosfuro de aluminio (ALP) no debe hacerse a temperaturas inferiores a 5°C o si el contenido de humedad es menor al 10%. Cuando los insectos son expuestos a este gas por suficiente tiempo es capaz de aniquilarlos en todas la etapas de crecimiento (huevos, larvas, pupa y adultos).

Desafortunadamente, la mayoría en de casos las fumigaciones se han llevado en lugares que no fueron diseñados específicamente para este método de desinfestación. Como consecuencia, la mayoría no son capaces de retener los gases lo suficientemente bien como para proporcionar un control completo de los insectos.

Los recientes programas de investigación han demostrado la posibilidad de construir recintos de almacenamiento especialmente diseñados para tal fin, donde estos pueden cerrarse herméticamente logrando una fumigación efectiva usando métodos de dosificación escalonada de fosfuro de aluminio. Los nuevos sistemas que han implementado en países desarrollados incluyen la fumigación con chimenea laminada, este consiste en ductos de ventilación que se abren y se cierran automáticamente para la liberación de fosfina en el almacén. Otro equipo muy útil es sistemas circulatorios de fosfina, este sistema consiste en tuberías en el interior del almacén que permitan liberar fosfina en el interior de cualquier parte del almacén teniendo así más acceso a los granos más profundos. Si los gases son aplicados en mayores a dosis a la recomendadas pueden dañar la germinación de los granos. La fosfina es capaz de generar corrosión en algunos metales (oro, bronce, cobre y plata) a altas temperaturas y humedad, por lo que se deben tomar precauciones dentro del almacén. Este método tiene la desventaja de ser un procedimiento riesgoso para quien lo aplique, por lo que requiere de personal capacitado que acate todas las normas de seguridad y los tiempos de ventilación para evitar cualquier tipo de accidente (5,28,30,31,33).

En la actualidad Colombia no cuenta con sistemas automatizados como los presentados en el control químico, las metodologías usadas en nuestro países son más del tipo convencional y de bajo costo. Uso de insecticidas económicos y que por lo general presentan un riesgo para la salud humana y otras especies, dado su alto grado de contaminación y toxicidad, de ahí que nazca la propuesta de generar una alternativa de bajo costo y no que genere toxicidad y daños ambientales.

1.3 Microorganismos como fuente de compuestos con actividad insecticida.

Los microorganismo son organismos microscópicos que pueden existir en forma unicelular o colonias de células. Su existencia se sospecha desde la antigüedad, pero su estudio comenzó

en 1670 por Antonie van Leeuwenhoek, hacia 1850 Pasteur, descubrió que los microorganismos eran los responsables del deterioro de los alimentos. Posterior a ellos ya vinieron investigaciones tales como microorganismos causantes de enfermedades como el ántrax, tuberculosis y cólera(33).

Así pues, nacen las investigaciones acerca de los microorganismos y su posibilidad de aplicaciones en diferentes líneas de las ciencias, de las primeras investigaciones está el aislamiento de la penicilina a partir de hongos del género *Penicillium*. Usada para combatir infecciones bacterianas provenientes de bacterias Gram positivas(34). Ya Hacia la década de los 70 se potenció el estudio de los microorganismos como fuente de compuestos con actividades biológicas interesantes (35).

Los microorganismos pueden llegar a ser una fuente promisoría de nuevos compuestos, ya que estos se caracterizan por tener un fácil crecimiento y buena capacidad para adaptarse a diferentes nichos ecológicos, con variaciones ambientales extremas en algunos casos, de ahí que produzcan compuestos agresivos que les permitan defenderse y adaptarse a un medio específico. Basados en esta premisa es posible ver a los microorganismos como una fuente inagotable de compuestos y versatilidad para ser cultivados a nivel de laboratorio ya que presentan tasas de crecimientos muy rápidas y la posibilidad de escalar a niveles de biorreactor (1000L), lo cual genera un interés biotecnológico para el desarrollo de productos comercializables(36). Siendo así, en la actualidad el estudio de los microorganismos en el campo de la medicina ha permitido reportar moléculas aisladas de estos con actividades: antivirales, antimicrobianas, anticancerígenas, entre otras. Ahora se está innovando en otros campos de la ciencia como la posibilidad de ser usado en el ámbito agrícola para el desarrollo biocontroladores de fitopatógenos e incluso productores de compuestos insecticida.

De los primeros reportes de compuestos con actividad insecticida a partir de microorganismos tuvieron sus inicios a principios del siglo XXI con la identificación de proteínas cristalina (Cry) con actividad insecticida producidas por *Bacillus thuringiensis* contra larvas de mariposas del género lepidóptera. Investigaciones como estas abrieron el paso a diferentes investigaciones e incluso la búsqueda de metabolitos secundarios con esta actividad en particular(37). Este es

el caso del bis(2-etilhexil) ftalato aislado de *Streptomyces rimosus* a partir de un medio de cultivo líquido de esta bacteria, dicha molécula tiene actividad insecticida contra el vector de enfermedades *Culex quinquefasciatus* en diferentes estadios de crecimiento del insecto(38).

Así pues, como *Streptomyces* también se encuentran microorganismos de otros géneros que producen compuestos con actividad insecticida dentro de estos están los pertenecientes a los géneros *Schizophyllum*, *Muscodor*, *Achromobacter*, *Pseudochrobactrum*, *Lysinibacillus*, *Wautersiella*, *Purpureocillium*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Phormidium*, *Proteus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*. Estos productores de compuestos como péptidos, lactonas macrocíclicas, glucolípidos entre otros(39)(40)(41)(42). Los compuestos mencionados anteriormente son aislados a partir del extracto orgánico de un medio líquido de cultivo.

1.4 Compuestos orgánicos volátiles liberados por microorganismos como solución para el control de insectos.

Anteriormente se mencionó que los compuestos con actividad insecticida son aislados de extractos orgánicos en medio líquido. No obstante, los microorganismos también presentan otro tipo de producción de compuestos orgánicos de naturaleza volátil. Los microorganismos usan los compuestos orgánicos volátiles (COVs) para diferentes funciones dentro de estas: la comunicación, la alerta, la defensa contra predadores, regulación de ciclos metabólicos, productos de degradación, entre otros. Los estudios en COVs provenientes de microorganismos son muy recientes y se reportan de menos de 15 años y en la actualidad se encuentra evaluando la posibilidad de que estos COVs presenten las mismas actividades biológicas que presentan los metabolitos aislados de extractos orgánicos. La última revisión presentada por Audrian y colaboradores reportan las últimas actividades biológicas encontradas para los COVs tales como: promotores del crecimiento y diferenciación en plantas, inducción de resistencia en plantas contra fitopatógenos, antibacteriana, antifúngica, antifouling, inhibidores del quorum sensing, nematocida, inhibidores del biofilm e insecticida(43).

En este orden de ideas, se han empezado a evaluar a los microorganismos como fuente de compuestos volátiles con actividad insecticida se han reportado moléculas con grupos funcionales cetona, alcohol, aromático; como los mostrados en la Figura 1-4. (43)(44)(45)

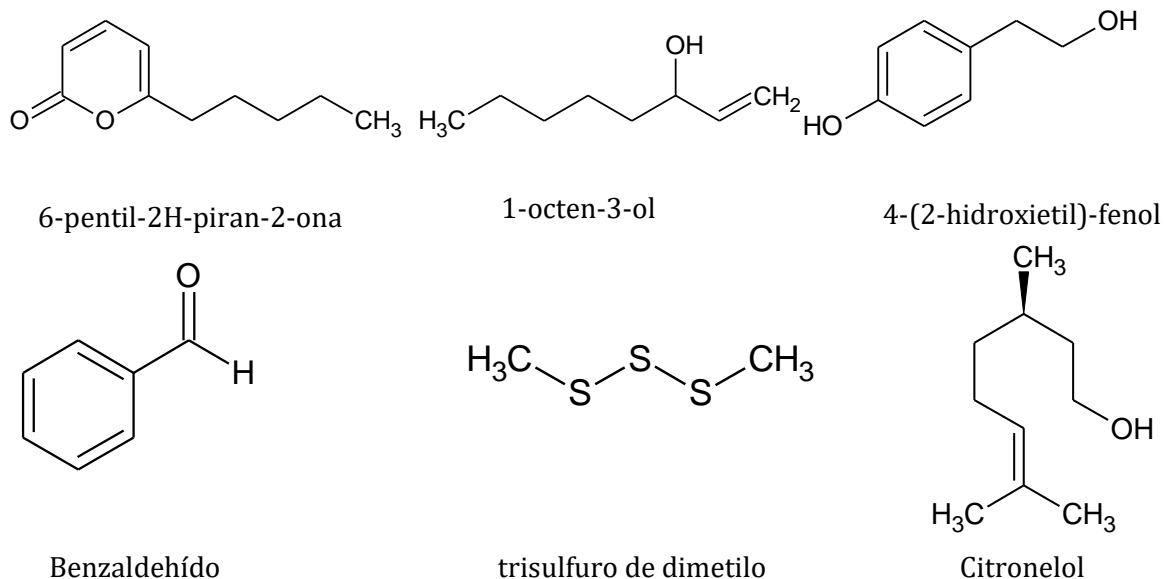


Figura 1-4 Algunos de los compuestos orgánicos volátiles insecticidas reportados

Las moléculas anteriormente presentadas poseen la capacidad de controlar insectos-plaga y de éstas, solo 1-octen-3-ol ha sido reportado con actividad insecticida contra *T. castaneum* con una concentración letal 50 (LC₅₀) de 0,13 mM. Los otros compuestos son insecticidas para otras especies de insectos(39).

El estudio en COVs en la actualidad se encuentra en auge, algunos autores han planteado diferentes métodos de extracción de estos y la identificación de los COVs la realizan por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GCMS). Los problemas que han presentados algunos de estos estudios es que han reportados COVs que son liberados por el medio de cultivo. Los compuestos detectados en el blanco de los medios de cultivo, son pertenecientes a varias clases químicas : hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, lactonas, furanos, pirranos, pirroles, pirazinas, piridinas, fenoles, tiofenos, tiazoles, tiazolinas, oxazoles y otros compuestos de nitrogenados y, corresponderían

a productos de reacciones térmicas ocasionadas durante el tratamiento de esterilización, en el que se favorecen procesos como el de Maillard, oxidación lipídica, y la degradación de la tiamina e interacciones entre los productos de estas tres vías. Ya que en el medio de crecimiento se cuenta con los sustratos necesarios para llevar a cabo dichas reacciones(46)(47).

Así pues, realizada toda la revisión anteriormente descrita demuestra que, si es posible que los COVs provenientes de microorganismos tengan la actividad objetivo, ahora bien, se debe pensar en la búsqueda de un bioensayo que permita evaluar cuales podrían ser las bacterias más promisorias para ser estudiadas en este trabajo, por lo cual nace la necesidad de la implementación de un bioensayo insecticida que permita determinar la actividad insecticida de los COVs liberados por bacterias.

1.5 Bioensayos de actividad insecticida volátil de microorganismos.

En la actualidad no se poseen bioensayos estandarizados que permitan que evaluar la actividad insecticida mediada por volátiles liberados por microorganismos, luego de realizar revisiones en la literatura que permitieran realizar adaptaciones. Se encontró un bioensayo de actividad repelente mediada por volátiles liberados de un hongo. Este se muestra en la Figura 1-5.

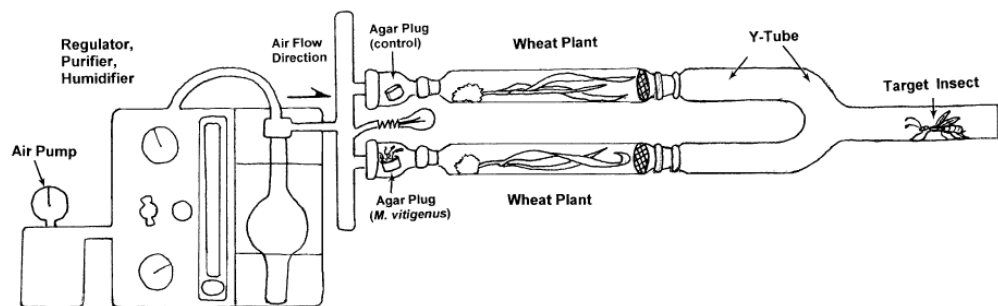


Figura 1-5 Bioensayo de actividad repelente mediada por volátiles liberados por el hongo *Muscodor vitigenus* en el insecto plaga *Cephus cintus*(41).

Este Bioensayo está compuesto por un tubo en Y, un compresor, extensiones al compresor, las muestras a analizar son inoculadas en su respectivo medio de cultivo. El bioensayo consiste

en ubicar en el inicio del tubo el insecto. Luego de la división del tubo, se conectan las extensiones las cuales irán a dos salidas de aire que presenta el compresor. En la extensión de la parte derecha se introduce una planta de trigo y se sella con una malla que permita solo el intercambio de gases. Detrás de la planta se ubica una caja de petri con el medio de cultivo sólido sin inocular, este hará las veces blanco. En la extensión izquierda de igual forma se introduce una planta de trigo y se sella con la malla y en la parte posterior la caja de petri con medio de cultivo, solo que, en este caso el medio de cultivo estará inoculado con el hongo *M. vigintineus*. Las extensiones del tubo en Y están conectados a salidas de aire del compresor.

El funcionamiento del bioensayo consiste en que se genera una corriente de aire suave por medio del compresor, es purificado, pasa por un divisor de flujo y se dirige hacia cada extremo del tubo en Y. En este orden de ideas se espera que los volátiles generados por el hongo *M. vigintineus* sean arrastrados por la corriente de aire y lleguen hasta la posición inicial del insecto y, así pues, le generen a este una respuesta y lo motiven a tomar una decisión respecto a qué lugar debe elegir. El ensayo tarda alrededor de 7 minutos y se considera positivo, es decir, repelente si el insecto toma la dirección derecha, la que no contiene hongo inoculado y negativo si toma la otra dirección o no se mueve después de algún tiempo(41).

1.6 Conclusiones

Países tropicales como el nuestro producen varias especies de frutas, verduras, legumbres y granos principalmente, estos últimos su producción es periódica en el año, de ahí que se requiera conservar parte de la producción anual para garantizar el abastecimiento. Durante el proceso de conservación, los granos son vulnerables a ser infestado por distintas plagas, Dentro de éstas se encuentran los insectos que generan un impacto importante en la economía del país de ahí que deba ser controlada su reproducción.

Las metodologías que se usan actualmente como control físico y biológico son excelentes metodologías que permiten controlar las fitoplagas sin generar mayores repercusiones al ambiente. Estas metodologías requieren cierta tecnología automatizada y construcción de

infraestructura para el caso de control físico y en el otro caso se requiere el uso de la introducción de otro organismo depredador y/o patógeno de esta plaga, la introducción de este organismo puede llegar a representar un riesgo en almacén u otro gasto su posterior eliminación.

Colombia en su mayoría no hace uso de las metodologías descritas, pues para lograr el desarrollo de estas, es necesario hacer uso de una inversión económica grande y los productores de granos que se tienen actualmente en el país en su mayoría son pequeños campesinos. Así pues, ellos recurren al uso del control químico como una alternativa más económica para el control de insectos plaga que afectan los granos almacenados.

Insectos-plaga de gran impacto económico en el país son pertenecientes a los géneros *Sitophilus* y *Tribolium*, ya que estos atacan granos en almacenamiento, los cuales serán usados para el abastecer al país durante todo el año. La metodología de control de estos insectos usada en el país es el control químico, los compuestos que se usan para este fin son muy tóxicos y terminan afectando no solo fuentes naturales, sino a insectos no objetivo e incluso la salud humana.

Los productos naturales se han propuesto como una solución para control insectos plaga sin generar mayores efectos sobre el medio ambiente, dentro de estos estudios cabe el estudio de productos naturales en microorganismos, de cuales se han obtenidos compuestos interesantes con actividad insecticida, metabolitos provenientes del metabolismo intracelular.

El estudio en la actualidad de metabolitos provenientes de microorganismos ha estado dirigido principalmente a los que son generados intracelularmente y poco estudios acerca de los generados extracelularmente como los compuestos orgánicos volátiles con miras hacia una actividad insecticida. Los compuestos orgánicos volátiles liberados por microorganismos representan papeles muy importantes en la comunicación, alerta y defensa contra otros microorganismos, de ahí que se crea en la posibilidad que estos microorganismos puedan ser usados como fuentes de compuestos volátiles con actividad insecticida.

En la actualidad los ensayos reportados que permitan evaluar la actividad insecticida mediada por COVs es casi nula solo se presenta un reporte, y este evalúa una actividad repelente, la cual

no representa la mejor opción para controlar una plaga agresiva que se encuentra en constante crecimiento, como el caso de nuestros insectos de estudio.

1.7 Referencias

1. Vargas Gaitán K. La agricultura colombiana en el contexto de la globalización. El campesino [Internet]. 2016 Mar [cited 2018 Aug 23];1. Available from: <http://www.elcampesino.co/la-agricultura-colombiana-en-el-contexto-de-la-globalizacion/>
2. MINAGRICULTURA, TICs. Informe de gestión 2017 [Internet]. bogota; 2017 [cited 2018 Sep 11]. Available from: [https://www.minagricultura.gov.co/planeacion-control-gestion/Gestin/PLANEACION/Informe_de_Gestión_\(Metas_Objetivos_Indicadores_Gestion\)/INFORME DE GESTIÓN 2017 .pdf](https://www.minagricultura.gov.co/planeacion-control-gestion/Gestin/PLANEACION/Informe_de_Gestión_(Metas_Objetivos_Indicadores_Gestion)/INFORME DE GESTIÓN 2017 .pdf)
3. FAO. Manual de manejo poscosecha de granos a nivel rural - Almacenamiento de granos en propiedades rurales [Internet]. Bogotá; 2015 [cited 2018 Aug 23]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/X5027S/x5027S0d.htm>
4. Casida JE. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. Chem Res Toxicol [Internet]. 2009 Apr 20 [cited 2018 Mar 9];22(4):609–19. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx8004949>
5. INTAGRI S. Manual de Plagas en Granos Almacenados | Intagri S.C. [Internet]. 2015 [cited 2018 Mar 5]. Available from: <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/manual-plagas-granos-almacenados>
6. García-Lara S, Carrillo E, Bergvinson DJ. Manual de Plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo y control [Internet]. México D.F.; 2007 [cited 2018 Aug 28]. 65 p. Available from: www.cimmyt.org
7. Arnaud L, Lognay G, Verscheure M, Leenaers L, Gaspar C, Haubruge E. IS Dimethyldecanal a common aggregation pheromone of tribolium flour beetles? j chem

- ecol [internet]. 2002 [cited 2018 sep 12];28(3). available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/1db0/b8bdf2b614d592e734e645873af3b3c6d2f6.pdf>
8. Agr Diego Mauricio Santa Juliana I. Proyecto Específico de Poscosecha-PRECOP II [Internet]. [cited 2018 Aug 29]. Available from: http://www.casafe.org/Manual_ODPF.pdf
 9. Puerto Rodríguez AM, Suárez Tamayo S, Palacio Estrada DE. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2014 [cited 2017 May 5];52(3):372–87. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010
 10. Imhoff JF, Labes A, Wiese J. Bio-mining the microbial treasures of the ocean: New natural products. Biotechnol Adv [Internet]. 2011 Sep 1 [cited 2019 Mar 14];29(5):468–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975011000346>
 11. Penesyan A, Kjelleberg S, Egan S, Penesyan A, Kjelleberg S, Egan S. Development of Novel Drugs from Marine Surface Associated Microorganisms. Mar Drugs [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2019 Mar 14];8(3):438–59. Available from: <http://www.mdpi.com/1660-3397/8/3/438>
 12. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochim Biophys Acta - Gen Subj [Internet]. 2013 Jun 1 [cited 2019 Mar 14];1830(6):3670–95. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416513000512>
 13. Kanchiswamy CN, Malnoy M, Maffei ME. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. Front Plant Sci. 2015;6(March):151.
 14. REUTERS T, López Lérica J. TABLA-Informe del USDA de la oferta y la demanda mundial de granos [Internet]. Reuters. 2018 [cited 2018 Sep 12]. Available from: <https://lta.reuters.com/article/businessNews/idLTAKBN1862E7-OUSLB>
 15. Askira A., Mala k., dawud m., wali as, mustapha a. a survey on the effect of pests of stored products on some cereal grains in maiduguri borno state nigeria. int j agric res.

2013;1(3):97-103.

16. grolleaud michel. pérdidas post cosecha: un concepto mal definido o mal utilizado [internet]. 2015 [cited 2017 aug 20]. p. 4. Available from: <http://www.fao.org/docrep/004/AC301S/ac301s00.htm#Índice>
17. Flórez OA, Marín HF, Zapata JA. Estudio de las prácticas de cosecha y poscosecha de la papaya (Carica papaya cv. Maradol), en el Departamento del Huila, Colombia. Rev Investig Agrar y Ambient [Internet]. 2009 [cited 2017 Aug 20];29-36. Available from: https://academia.unad.edu.co/images/investigacion/hemeroteca/RIAA/RIAA_Vol0_N1_2009/estudio de las practicas de cosecha y poscosecha de.pdf
18. Tesis de doctorado. Prieto Rodríguez JA. Estudio fitoquímico de *Componeura capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp. Bogotá; 2012. 256 p.
19. Grünwald S, Adam I V., Gurmai A-M, Bauer L, Boll M, Wenzel U. The Red Flour Beetle *Tribolium castaneum* as a Model to Monitor Food Safety and Functionality. In 2013 [cited 2017 Aug 22]. p. 111-22. Available from: http://link.springer.com/10.1007/10_2013_212
20. Breeman R, Hass S, Friesen K. *Tribolium* stock maintenance : USDA ARS [Internet]. 2015 [cited 2018 Mar 15]. Available from: <https://www.ars.usda.gov/plains-area/mhk/cgahr/spieru/docs/tribolium-stock-maintenance/>
21. Pai A. *Tribolium*. In: Encyclopedia of Animal Behavior [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2018 Sep 12]. p. 446-52. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780080453378000309>
22. Hippola A, Herath C. Red flour beetle [Internet]. 2014. [cited 2018 Mar 15]. Available from: <https://www.slideshare.net/BaranaRangana/red-flour-beetle-2>
23. Regatta. *Sitophilus zeamais* [Internet]. 2003 [cited 2018 Mar 15]. Available from: http://jcringenbach.free.fr/website/beetles/curculionidea/Sitophilus_zeamais.htm

24. Arth study. Pest of rice (*Sitophilus oryzae*): Distribution, Life cycle, Nature of damage and Control measures | Study&Score [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 15]. Available from: <http://www.studyandscore.com/studymaterial-detail/pest-of-rice-sitophilus-oryzae-distribution-life-cycle-nature-of-damage-and-control-measures>
25. Fernandes J. *Sitophilus zeamais* e *Sitotroga cerealella*: Pragas do Milho | Portal Agronegócios.eu [Internet]. 2015 [cited 2018 Mar 5]. Available from: <http://www.agronegocios.eu/noticias/sitophilus-zeamais-e-sitotroga-cerealella-pragas-do-milho/>
26. Adda C, Atachi P, Hell K, Tamò M. Potential use of the bushmint, *Hyptis suaveolens*, for the control of infestation by the pink stalk borer, *Sesamia calamistis* on maize in southern Benin, West Africa [Internet]. Vol. 11, Number 33 Downloaded from Journal of Insect Science. 2015 [cited 2019 Mar 14]. Available from: www.insectscience.org
27. SPARC (Organization) R. Julius-Kühn-Archiv. [Internet]. Julius-Kühn-Archiv. Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen; 2009 [cited 2019 Mar 14]. 126-131 p. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113401183>
28. FAO. Grain storage techniques ... - Insect control - Chemical control techniques [Internet]. Chemical control techniques. Roma; 2016 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/t1838e/T1838E1g.htm>
29. Zettler JL, Arthur FH. Chemical control of stored product insects with fumigants and residual treatments. *Crop Prot* [Internet]. 2000 Sep 12 [cited 2019 Mar 14];19(8-10):577-82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219400000752>
30. VIKASPEDIA. Stored Grain Pests and Their Control — Vikaspedia [Internet]. 2018 [cited 2018 Sep 12]. Available from: <http://vikaspedia.in/agriculture/post-harvest-technologies/technologies-for-agri-horti-crops/post-harvest-management-of-pulses/stored-grain-pests-and-their-control>
31. ERP Agrícola. Métodos para el control de plagas en granos almacenados - Software ERP Agrícola: Gestión integral de Ranchos Agrícolas [Internet]. México; 2016 [cited 2018

24 control de insectos de granos almacenados mediante volátiles provenientes de bacterias marinas del caribe colombiano

- Sep 15]. Available from: <http://sistemaagricola.com.mx/blog/control-de-plagas-en-granos-almacenados/>
32. Casini C, Santajuliana M. Control de Plagas en Granos Almacenados. - Artículo Tecnico [Internet]. 2017 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranosAlmacenados.asp>
33. April Tyrrell K. Oldest fossils ever found show life on Earth began before 3.5 billion years ago [Internet]. Wisconsin; 2017 [cited 2018 Sep 16]. Available from: <https://news.wisc.edu/oldest-fossils-found-show-life-began-before-3-5-billion-years-ago/>
34. American Chemical Society, Royal Society of Chemistry. Discovery and Development of Penicillin - [Internet]. American Chemical Society. Washington; 2015 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/flemingpenicillin.html>
35. Scopus. (TITLE-ABS-KEY (microorganism) AND TITLE-ABS-KEY (biological AND activity)) [internet]. 2018 [cited 2018 sep 15]. available from: <https://www-scopus-com.ezproxy.unal.edu.co/term/analyzer.uri?sid=b3eaa8a4f509f9c924fa276e8f22b6ba&origin=resultslist&src=s&s=%28title-abs key%28microorganism%29+and+title-abs-key%28biological+activity%29%29&sort=plf-f&sdt=b&sot=b&sl=69&count=23852&analyze>
36. Zou H, Li L, Zhang T, Shi M, Zhang N, Huang J, et al. Biosynthesis and biotechnological application of non-canonical amino acids: Complex and unclear. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2018 Nov [cited 2018 Sep 16];36(7):1917–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0734975018301320>
37. Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Oct 10 [cited 2018 Aug 29];103(41):15196–9. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005725>
38. Ganesan P, Stalin A, Gabriel Paulraj M, Balakrishna K, Ignacimuthu S, Abdullah Al-Dhabi N. Biocontrol and non-target effect of fractions and compound isolated from *Streptomyces rimosus* on the immature stages of filarial vector *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) and the compound interaction with Acetylcholinesterase (AChE1). *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2018 Oct 15 [cited 2018 Sep 16];161:120–8. Available from: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.unal.edu.co/science/article/pii/S0147651318304482?via%3Dihub>
 39. Zhao L jing, Yang X nan, Li X ying, Mu W, Liu F. Antifungal, Insecticidal and Herbicidal Properties of Volatile Components from *Paenibacillus polymyxa* Strain BMP-11. *Agric Sci China* [Internet]. 2011;10(5):728–36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60056-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60056-4)
 40. Strobel G. *Muscodor albus* and its biological promise. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006;33(7):514–22.
 41. Daisy BH, Strobel GA, Castillo U, Ezra D, Sears J, Weaver DK, et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 2002;148(11):3737–41.
 42. Cheng W, Yang J, Nie Q, Huang D, Yu C, Zheng L, et al. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 24 [cited 2018 Sep 10];7(1):16213. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-16631-8>
 43. Audrain B, Farag MA, Ryu CM, Ghigo JM. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev*. 2015;39(2):222–33.
 44. Contreras-Cornejo HA, del-Val E, Macías-Rodríguez L, Alarcón A, González-Esquivel CE, Larsen J. *Trichoderma atroviride*, a maize root associated fungus, increases the parasitism rate of the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* by its natural enemy *Campoletis sonorensis*. *Soil Biol Biochem* [Internet]. 2018 Jul [cited 2018 Sep 16];122:196–202. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0038071718301330>

45. Schalchli H, Tortella GR, Rubilar O, Parra L, Hormazabal E, Quiroz A. Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Crit Rev Biotechnol* [Internet]. 2016 Jan 2 [cited 2018 Sep 16];36(1):144–52. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/07388551.2014.946466>
46. KOSOWSKA M, A. MAJCHER M, FORTUNA T, KOSOWSKA M, A. MAJCHER M, FORTUNA T. Volatile compounds in meat and meat products. *Food Sci Technol* [Internet]. 2017 Feb 9 [cited 2019 Jan 23];37(1):1–7. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612017000100001&lng=en&tlng=en
47. Wilkins K, Schöller C. Volatile Organic Metabolites from Selected *Streptomyces* Strains [Internet]. [cited 2019 Feb 25]. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/saj/23/2/23_SAJ230202/_pdf

2. Capítulo 2: Diseño de un bioensayo insecticida *in vivo* (microorganismo-insecto) por medio de COVs

Resumen

Los bioensayos de actividad insecticida son aquellos que permiten evaluar la actividad de un compuesto, proteína o enzima sobre un insecto y ver si éste es el causal de la mortalidad. En la actualidad no existen bioensayos reportados que permitan evaluar la actividad insecticida producida por compuestos orgánicos volátiles bacterianos sobre insectos en el que se mantengan los dos organismos vivos en un mismo ambiente. Para tal fin en este trabajo se diseñó un bioensayo que permite evaluar la actividad insecticida de los COVs producidos por bacterias aisladas de ambientes marinos del caribe colombiano sobre los insectos *Tribolium castaneum* (gorgojo rojo de la harina). Este bioensayo consta de un contenedor plástico con tapa hermética en el cual se introducen los insectos con su respectivo alimento y el microorganismo a evaluar previamente inoculado en medio sólido en una caja de Petri. Todo el sistema es sellado e incubado por un tiempo de 4 días a una temperatura de 28°C y una humedad relativa del 70%. Luego de diseñado el bioensayo y asegurando su reproducibilidad se procedió a establecer las mejores condiciones en las que aumentaba la actividad y se mantenía la uniformidad de este. Se evaluaron condiciones tales como la temperatura, la cantidad de bacteria, el conteo de UFC/caja, el tiempo, el insecto, el alimento del insecto y la estrategia de esterilización.

Se preseleccionaron 21 aislamientos respecto a criterio taxonómico con reportes en literatura de un cepario de bacterias aisladas de ambientes marinos. Los aislamientos seleccionados fueron evaluados el bioensayo anteriormente descrito y se seleccionaron los 4 más activos, con el objeto de analizar su perfil metabólico volátil como una posible fuente promisoría de producción de COVs con actividad insecticida sobre el insecto *T. castaneum*. Se seleccionaron

4 bacterias PNM-39 (*Paenibacillus sp.*), PNM-123 (*Paenibacillus sp.*), PNM-143(*Streptomyces sp.*) y PNM-201(*Paenibacillus sp.*).

Palabras clave: insecticida, bioensayo, microorganismos marinos, COVs, *T. castaneum*

2.1 Introducción

Los insectos-plaga de granos almacenados en la actualidad representan un problema fitosanitario muy relevante para el control de la calidad de estos alimentos. Éstos se clasifican en dos, plagas primarias y secundarias. Las primarias se alimentan invadiendo el interior del grano generando en éste pérdida de peso, disminución del valor nutricional y su capacidad germinativa, entre otros, luego de generarse el primer ataque, se da el origen a la llegada de las plagas secundarias, éstas se alimentan de rastros dejados por las primarias y también son capaces de atacar alimentos y harinas procesadas. La tasa de reproducción de estas plagas en general se estima, como una curva exponencial 10^6 siempre y cuando haya granos, harina o alimentos procesados que permitan su reproducción. De ahí que se considere que los insectos plaga representan un grave problema para almacenes que alberguen granos y harinas en cantidades considerables (1)(2).

Los métodos de control de insectos plaga se dividen en metodologías de control biológico, físico, y químico. El control biológico consiste en el uso de agentes naturales para controlar una plaga, un ejemplo de esta metodología es la introducción de un depredador de la plaga a su mismo nicho biológico o en otros casos la introducción de parásitos específicos de ésta. También se ha hablado de controles mediados por feromonas que permitan inhibir la reproducción de los insectos o que funcionen como trampas. En el caso del control físico suelen usarse modificaciones ambientales tales como temperatura, humedad y/o atmósferas modificadas que generan la mortalidad del insecto; y por último se tiene el control químico en el que se hace uso de compuestos de origen natural o sintético los cuales son esparcidos entre los granos o asperjados en el ambiente con la finalidad de que estos tengan un efecto negativo sobre el insecto ya sea parálisis, repelencia o muerte (3)(4)(5).

En Colombia, el método más usado y con los resultados más efectivos ha sido el uso de compuestos químicos sintéticos, sin embargo, éstos representan ciertas complicaciones entre las que se destacan: el grado de toxicidad elevado el cual termina afectando incluso la población humana, la baja especificidad lo cual se traduce a la eliminación de especies no objetivo y son potenciales contaminantes ambientales dada su alta solubilidad en agua y adsorción por parte de las plantas. De allí que se piense en la búsqueda de nuevos compuestos que ayuden a mitigar este impacto ambiental y solucionar parte de los problemas anteriormente expuestos(6).

El ser humano ha visto la naturaleza como una fuente de compuestos bioactivos, se tienen algunos reportes acerca de compuestos con actividad insecticida que fueron aislados del fruto *Evodia lenticellata* sobre *T. castaneum*. Wang y colaboradores aislaron compuestos de naturaleza volátil tales como β -pineno, linalool, 3-careno, entre otros a partir de este fruto(7).

Recientes investigaciones exploran otras fuentes naturales en busca de compuestos bioactivos de naturaleza volátil como los microorganismos. Se ha visto en éstos la posibilidad de que posean actividad insecticida mediada por compuestos orgánicos volátiles (COVs). Tales como: 1-octen-3-ol, benzotiazol y citronelol liberados por *Paenibacillus polymyxa*, compuestos que resultaron ser activos contra el insecto *T. castaneum*(8). Se cree en una primera aproximación que los compuestos provenientes de fuentes naturales no afectarían significativamente un nicho ecológico específico, siempre y cuando hayan sido producidos por organismos vivos pertenecientes a este mismo nicho(9).

Con la información anteriormente expuesta se piensa en la posibilidad de utilizar microorganismos del caribe colombiano (dada su baja exploración) para el control de insectos plaga por medio de COVs. En este orden de ideas se debe diseñar un bioensayo que permita evaluar la actividad insecticida de los COVs liberados por los microorganismos sobre los insectos, de tal forma que ambos se encuentren vivos en el mismo ambiente y ofrezcan resultados reproducibles para así realizar una selección de bacterias prometedoras para ser usadas como fuente de COVs con actividad insecticida.

2.2 Materiales y métodos

Procedimientos generales

Los medios de cultivo utilizados fueron Luria Bertani (LB) e ISP2, preparados en medio sólido y en medio líquido.

Todos los bioensayos y el cultivo de las bacterias en medio sólido se llevaron a cabo en una incubadora Memmert® modelo 400 en condiciones de temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con flujo de aire. Para la crianza de los insectos *T. castaneum* se usó una incubadora E&Q® en condiciones de temperatura de $31,4 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y humedad $55,8 \pm 0,1$ H.R. Para los insectos *S. zeamais* se utilizó una incubadora Memmert® modelo 260 a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y $65 \pm 5\%$ H.R. Para la crianza de los insectos *S. oryzae* se usó un cuarto temperado a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ con una humedad relativa del $45 \pm 5\%$ H.R. Los insectos tenían una edad aproximada de 15 días en su estadio adulto y fueron ensayados sin sexar.

2.2.1 Material biológico

Crianza de insectos

Los insectos *S. zeamais* y *T. castaneum* fueron aportados por el grupo de investigación de “Estudio químico y de actividad biológica de Rutaceae y Myristicaceae colombianas” de la Universidad Nacional de Colombia y el grupo de investigación en Fitoquímica de la Universidad Javeriana. Los insectos *S. oryzae* fueron aportados por el insectario de Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Nacional de Colombia

Los insectos *T. castaneum* y *S. zeamais* fueron criados en cajas plásticas con tapa. Para *T. castaneum* con una mezcla de 500g harina y levadura al 1% como alimento, para *S. zeamais* maíz porva previamente esterilizado. Los insectos *S. oryzae* fueron criados en una botella de vidrio con arroz previamente esterilizado. La botella no poseía tapa, pero si fue protegido el cuello de la botella con vaselina. Todos los insectos criados con las condiciones de temperatura y humedad, descritas anteriormente.

Microorganismos

Los microorganismos seleccionados para el bioensayo fueron aportados por el grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia. En total se ensayaron 21 microorganismos seleccionados con base a un criterio taxonómico de literatura, éstos se presentan en la Tabla 2-1.

Tabla 2-1 Microorganismos seleccionados para ser ensayados con su respectivo medio de cultivo

Bacteria	Género	Fuente de aislamiento	Medio de cultivo
PNM-5	<i>Streptomyces</i> sp.	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	ISP2
PNM-10	<i>Lysinibacillus</i> sp.	Alga del género <i>Dictyota</i> sp.	LB
PNM-24	<i>Paenibacillus</i> sp.	Corteza de manglar	LB
PNM-32	<i>Paenibacillus</i> sp.	Arena coralina bajo pináculo	LB
PNM-39	<i>Paenibacillus</i> sp.	Fango manglar - laguna interna	LB
PNM-50	<i>Paenibacillus</i> sp.	Alga del género <i>Codium</i> sp.	LB
PNM-54	<i>Paenibacillus</i> sp.	Alga del género <i>Codium</i> sp.	LB
PNM-106	<i>Paenibacillus</i> sp.	Fango manglar - laguna interna	LB
PNM-115	<i>Paenibacillus</i> sp.	Sedimento de arrecife no muy grueso	LB
PNM-123	<i>Paenibacillus</i> sp.	Alga del género <i>Codium</i> sp.	LB
PNM-143	<i>Streptomyces</i> sp.	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	ISP2
PNM-144a	<i>Streptomyces</i> sp.	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	ISP2
PNM-145	<i>Streptomyces</i> sp.	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	ISP2
PNM-149	<i>Streptomyces</i> sp.	Primer lavado de fragmento de <i>Niphates digitalis</i>	ISP2
PNM-166	<i>Paenibacillus</i> sp.	Arena coralina bajo pináculo	LB
PNM-168	<i>Paenibacillus</i> sp.	Arena coralina bajo pináculo	LB
PNM-201	<i>Paenibacillus</i> sp.	Sedimento en pastos 20 pies del agua	LB
PNM-208	<i>Streptomyces</i> sp.	Octocoral <i>Eunicea fusca</i>	ISP2
PNM-210	<i>Paenibacillus</i> sp.	Octocoral <i>Eunicea fusca</i>	LB
PNM-216	N.I.	Alga del género <i>Dictyota</i> sp.	LB
IBUN-5.1	<i>Streptomyces</i> sp.	Rizosfera de <i>Oryza sativa</i>	ISP2

N.I. = Microorganismo no identificado

“PNM” = Código de los microorganismos asignado por el grupo de investigación

“IBUN” = Código de los microorganismos de instituto de biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia -sede Bogotá

Cultivo de microorganismos en medio líquido

A partir de los cultivos puros en medio de cultivo sólido se tomó una colonia con un haza estéril de vidrio y luego ésta fue sembrada masivamente sobre otra caja de Petri con el mismo medio de cultivo. Se incubó por 3 días a 28°C pasado dicho tiempo se tomaron 2 discos de 1cm de

diámetro de cada medio de cultivo, y se inocularon en 50 mL de medio de cultivo líquido (Según el medio seleccionado para su crecimiento Tabla 2-1). Los 50 mL de medio de cultivo se introdujeron en un erlenmeyer de 250 mL y fueron tapados, siempre conservando la esterilidad, y luego se agitaron en un shaker a 120 rpm por un tiempo de 3 días a 20°C.

Finalizado dicho tiempo se tomaron 3 alícuotas de 1mL de cada uno de los cultivos y fueron depositados en una placa de 96 pozos y se determinó el valor de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm a cada uno, por medio de un equipo de lector de placas ELISA. El valor de la densidad óptica para cada cultivo se ajustó a un valor de 0,7 para todos los microorganismos, adicionando el medio de cultivo estéril correspondiente.

Cultivo de microorganismos en medio sólido

Se tomaron alícuotas de 100µL de cada microorganismo en medio líquido con la absorbancia previamente ajustada y fueron sembradas sobre la caja de Petri con medio de cultivo sólido masivamente y por triplicado, se incubaron por 3 días a una temperatura de 28°C y luego se procedió a ser utilizados en el bioensayo.

2.2.2 Esterilidad del bioensayo

Se utilizó un contenedor plástico con tapa hermética de 320 mL, de forma cilíndrica y unas dimensiones de 10 cm de diámetro y 4 cm de altura. Estos se lavaron muy bien con su respectiva tapa, posterior a esto se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 0,5% durante 24 horas. Pasado este tiempo se secaron los contenedores con toallas previamente esterilizadas y humedecidas con una solución de etanol (CH₃CH₂OH) al 70%. Los contenedores con tapas se colocaron en el interior de una cabina de flujo laminar y se rociaron con la misma solución de etanol. Se cerró la cabina y los contenedores fueron expuestos a luz UV por un tiempo de 2 horas, pasado este tiempo se realizó el montaje del bioensayo en la misma cabina.

La esterilización del alimento (avena y harina de trigo) de los insectos se realizó introduciendo una cantidad deseada de este en un tubo de vidrio tapa rosca y luego fue sometido a un ciclo de esterilización en el autoclave(10).

Los resultados de efectividad de los métodos de esterilización fueron evaluados usando medios de cultivos sin inocular introduciéndolos en los contenedores plásticos con 10 insectos *T. castaneum* y 200 mg de hojuelas de avena. Todo el sistema fue cerrado e incubado por 4 días, al pasar los 4 días se observó que no hubiese crecido ningún microorganismo sobre el medio de cultivo.

2.2.3 Ensayo de supervivencia de los insectos a temperatura de crianza

Se tomaron 30 contenedores plásticos de un volumen de 320 mL y 100 insectos *S. oryzae*, *S. zeamais* y *T. castaneum* de cada especie. Se introdujeron 10 insectos por especie en cada contenedor por separado, de tal forma que se tuviera 10 réplicas de cada insecto. Todos los contenedores contenían el alimento (200mg de avena) y el medio de cultivo, estos se cerraron herméticamente y se incubaron a 25°C, 28°C y 32°C por un tiempo de 4 días. Pasado este periodo se contó el número de insectos muertos en cada contenedor y se calculó el porcentaje de mortalidad con la Ec. 1.

$$\%Mortalidad = \frac{\%Mortalidad\ tratadas - \%Mortalidad\ del\ control}{100 - \%Mortalidad\ del\ control} \quad Ec. 1$$

2.2.4 Bioensayo de actividad insecticida caja cerrada mediada por COVs

Materiales

Se usaron contenedores plásticos marca Persal® de un volumen de 320 mL y 127 mL que poseían tapas con seguros ajustables los cuales le generaban hermeticidad al contenedor. Tapas de crioviales las cuales cumplieron la función de soportes de la caja Petri en el interior del contenedor. Avena en hojuelas y todo el material previamente esterilizado como se describió anteriormente. Cajas de Petri de 9 y 5cm en material de vidrio.

Montaje general del bioensayo

Teniendo previamente estériles los materiales a utilizar, se introdujeron 10 insectos en cada contenedor con 200 mg de avena y las tapas de los crioviales (ubicadas de tal manera que formen un triángulo) sobre las tapas se colocó la caja de Petri sin tapa que contenía el microorganismo a evaluar de tres días previos de crecimiento. El sistema se cerró herméticamente con la tapa de cada contenedor y se incubó a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ y $65\pm 5\%$ H.R (Ver Figura 2-1). El sistema se mantuvo así por 4 días y al final de dicho tiempo los contenedores se destaparon, se realizó el conteo del número de muertos y se estableció el porcentaje de mortalidad con la Ec. 1.

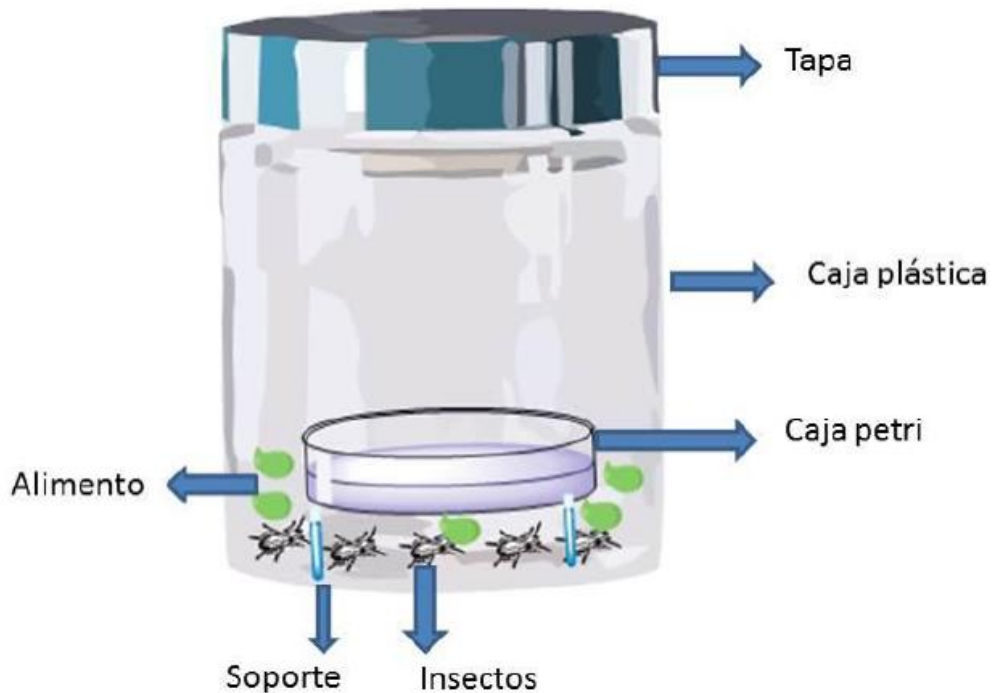


Figura 2-1 Bioensayo de actividad insecticida de COVs liberados por bacterias sobre insectos plaga.

Variación en el volumen del contenedor

Se realizó el montaje general del bioensayo, pero en este caso se evaluaron contenedores con un volumen de 127 mL herméticos con tapa. El proceso de esterilización es el mismo descrito anteriormente, igual cantidad de insectos, soportes y alimento. Se realizó un cambio en el tamaño de la caja de Petri siendo este de 5cm de vidrio, la cantidad de bacteria en medio líquido inoculada siendo 50 μ L y se estableció el porcentaje de mortalidad con la Ec. 1.

Cantidad de microorganismo inoculado en medio sólido

Con el fin de obtener condiciones iguales para todas las bacterias se determinó la cantidad de material biológico inoculado, para ello se determinó el número unidades formadoras de colonia (UFC) haciendo uso del protocolo manual utilizado por Sieuwerts y colaboradores (11) con algunas variaciones. Esta metodología consiste en tomar una alícuota de un medio de cultivo líquido de cantidad conocida, realizarle diluciones y sembrar dichas diluciones en cajas de Petri, incubar y contar el número de unidades formadoras de colonia (UFC)/mL.

Selección de los microorganismos de trabajo

La selección de los microorganismos de trabajo se realizó usando como criterio la actividad biológica del bioensayo que se describe en este capítulo con todas las condiciones evaluadas y ajustadas del conjunto de microorganismos de la Tabla 2-1.

Variación de la mortalidad en función de los días

Se realizó el mismo bioensayo de caja cerrada descrita anteriormente, con miras a observar cuál era el comportamiento del porcentaje de mortalidad de los insectos en el bioensayo y empezar a establecer un tiempo que permitiera, pasar al segundo paso que sería la extracción de los COVs.

2.3 Resultados y discusión

2.3.1 Selección de los aislamientos más promisorios

Como se mencionó se hizo uso del cepario aportado por el grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de frutas naturales y frutas de Colombia”, del departamento de química de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá. Este cepario cuenta con 203 microorganismos (41 hongos y 162 bacterias) de los géneros más representativos en este cepario están los *Paenibacillus*, *Streptomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micorbacterium*, *Micrococcus*, *Fusarium*, *Lysinibacillus*, *Purpureocillium*, principalmente(12).

Como se describió en la primera sección, el montaje del bioensayo representa un grado de complejidad y tiempo que no permitiría ensayar 203 microorganismos en un tiempo corto. Así que se debía hacer una preselección de cuáles microorganismos se debían ensayar, para esto se realizó uso de bases de datos especializadas como SciFinder, Scopus y Google scholar. La información aportada de estas bases de datos es que, en la actualidad es muy poco lo que se ha estudiado sobre microorganismos que produzcan COVs con miras a evaluar una actividad insecticida, ya que es un campo en el cual hace menos de 20 años se está empezando a explorar, dicha revisión aportó información acerca de los géneros de los microorganismos que reportaban producción de COVs con actividad insecticida, estos géneros fueron: *Schizophyllum*, *Muscodor*, *Achromobacter*, *Pseudochrobactrum*, *Lysinibacillus*, *Wautersiella*, *Proteus*, *Arthrobacter*, *Paenibacillus* y *Streptomyces*(8)(13)(14)(15).

El conocimiento de esta clase de géneros ayudó a realizar un filtro en el cepario de 203 microorganismos, quedándose con 21 bacterias, éstas pertenecientes a géneros *Streptomyces*, *Paenibacillus* y *Lysinbacillus*. Se adicionó a este grupo el aislamiento PNM-216, el cual ya había sido estudiado su perfil volátil en investigaciones posteriores, como productora de compuestos volátiles con diferentes actividades biológicas. Cabe la posibilidad de que los COVs identificados en el perfil metabólico volátil de éste aislamiento posean actividad insecticida dada la gran cantidad de compuestos que libera(16).

Dichas bacterias crecen en medios de cultivo diferentes, ya que estos le confieren un mejor crecimiento, dicho crecimiento fue evaluado por Betancourt, Naranjo y colaboradores en trabajos anteriores (12)(16).

2.3.2 Diseño del bioensayo insecticida caja cerrada

Todo tipo de bioensayo ya sea directo o indirecto debe garantizar ciertas condiciones tales como: reproducibilidad en los resultados, rangos de incertidumbre bajos, baja variabilidad en condiciones ambientales, entre otras. Todas estas orientadas a que sin importar el tipo de bioensayo que se realice, siempre se pueda obtener el mismo resultado bajo las mismas condiciones y sin importar el lugar donde se realice. Así pues, de este modo lograr establecer un patrón de actividad del organismo, compuesto y/u hormona que se esté evaluando (17). Teniendo en cuenta estas consideraciones en el bioensayo que se pretende implementar, se debe partir en primera instancia de cuál sería la actividad biológica a evaluar en el bioensayo, para nuestro caso es la mortalidad generada por los COVs liberados por bacterias sobre los insectos, es decir una actividad insecticida.

Ahora bien, se debe tener en cuenta cuales son las condiciones que puedan influenciar en la actividad biológica de este bioensayo. Es de resaltar que el bioensayo que se quiere establecer está evaluando la actividad insecticidas de COVs liberados por bacterias sobre insectos de granos almacenados tales como: *T. castaneum*, *S. zeamais*, *S. oryzae*. El modelo diseñado debe cumplir la condición que los COVs sean netamente los responsables de la actividad insecticida. Entonces se sugiere mantener los dos organismos vivos (bacteria-insecto) en el mismo ambiente y privados del intercambio gaseoso al exterior, ya que la bacteria a medida que realiza su ciclo de vida produce los COVs y los libera extracelularmente. Estos metabolitos por ser de naturaleza volátil se deben tener confinados en un espacio cerrado para asegurar su actividad y concentración. En este orden de ideas se plantea un bioensayo de caja cerrada. El resultado de este bioensayo dependerá primordialmente del metabolismo de la bacteria, el cual se encuentra variando debido a condiciones de humedad, pureza, temperatura y medio de cultivo. También es de tener en cuenta que las condiciones de humedad, temperatura y volumen en el bioensayo, ya que estas pueden llegar a afectar la supervivencia del insecto.

Esterilidad de la unidad

En este bioensayo la esterilidad juega un rol muy importante en todo el proceso, de ahí la necesidad de asegurar la esterilidad de todos los implementos utilizados incluyendo el alimento de los insectos. El incorrecto procedimiento puede llevar a la generación de contaminaciones en los medios de cultivo sólido, los cuales afectan directamente el microorganismo que se esté evaluando y por ende el resultado de la actividad biológica.

Se debía garantizar la esterilidad de este contenedor ya que en el interior de este era donde ocurriría todo el bioensayo. Para ello por ser un elemento plástico que contenía un cierre hermético, no era posible recurrir a un ciclo de esterilización normal en una autoclave, dado que podría generar daños en el cierre hermético e incluso el daño del contenedor. Por tal razón se recurrió a realizar un método de esterilización que hace uso de desinfectantes y luz UV (ultravioleta).

En primer lugar, el alimento utilizado fue trigo con base en la dieta de los insectos, pero este representó un problema en la esterilidad del bioensayo ya que, dadas las condiciones de confinamiento, se generaba un ambiente húmedo el cual promovía la hidratación de la harina de trigo, generando así un ambiente propicio para el crecimiento de hongos. Estos crecían y por su modo de reproducción mediado por esporas, estas conllevaban a la contaminación del medio de cultivo en la caja de Petri. Se atribuye esta generación de hongos a los microorganismos que los insectos suelen llevar en sus patas.

Para solucionar este problema se intentó suprimir el alimento, lo cual resultó en la muerte de los insectos antes de terminar el bioensayo, así que se realizó el cambio de dieta de los insectos por hojuelas de avena. Se tomó esta decisión ya que la avena presenta mejor capacidad de absorción de agua que la harina de trigo y esta ayudaría a la disminución del ambiente húmedo. Adicional a esto la avena ayudó a fijar el tiempo de desarrollo del bioensayo siendo de 4 días, ya que al quinto día el alimento se saturaba y se volvía a tener un escenario para la proliferación de hongos.

No existe la posibilidad de esterilizar los insectos ni someterlos a cualquiera de los procesos anteriormente mencionados ya que esto los conllevaría a la muerte. Así que desde su crianza se debe procurar que estos sean en las condiciones más asépticas posibles, como incubadoras estériles, alimento previamente esterilizado y trabajo en cabina de flujo laminar.

Transcurrido el tiempo establecido ninguna caja de Petri presentaba contaminación alguna. Esto quiere decir que el proceso de esterilización fue exitoso ya que no se generó contaminación. Este paso fue crucial para seguir con el proceso de diseño del bioensayo.

Ensayo de Supervivencia de los insectos

Los insectos diana utilizados en éste bioensayo fueron *T. castaneum*, *S. zeamais*, *S. oryzae*, para los cuales su temperatura óptima de crecimiento reportada en literatura es 32, 28 y 25 °C respectivamente (18)(19)(20). Con la información anteriormente expuesta se escogió una temperatura promedio en los 3 insectos de tal forma que fueran las adecuadas para el bioensayo. Adicional a esto se tuvo en cuenta que el rango de temperatura de crecimiento de los microorganismos utilizados que era 28°C-37°C (12). En este orden de ideas, se estableció como temperatura promedio para el bioensayo de 28°C.

La información presentada en la Tabla 2-2. muestra los resultados del porcentaje de mortalidad dependiendo la especie de cada insecto en el bioensayo. De este hecho, lo que se puede inferir es que la mortalidad presenta alguna relación con el género del insecto, ya que al ensayarse los insectos *T. castaneum* la mortalidad presentada fue nula, caso contrario a insectos del género *Sitophilus* spp.. Ahora bien, está explicación se reafirma con la capacidad que poseen los insectos *T. castaneum* a sobrevivir en bajos niveles de saturación de oxígeno en un ambiente confinado. Los insectos del género *Tribolium* poseen la capacidad de sobrevivir en ambientes con poco intercambio gaseoso con niveles de saturación de hasta solo el 5% de oxígeno. De ahí que no se observe mortalidad alguna de este insecto en el bioensayo que tiene una duración de 4 días. Ahora bien, en el caso de insectos del género *Sitophilus* spp. no presentan la misma particularidad. Para estos solo se reporta un valor mínimo de saturación de oxígeno del 50% en supervivencia al estar en un mismo ambiente cerrado(21). Como se presentan valores más altos de saturación de oxígeno para *Sitophilus* spp. al ser expuesto a

niveles más bajos es posible inducirle la mortalidad en estos insectos, lo cual concuerda con los resultados del bioensayo

Tabla 2-2 Supervivencia de los insectos a la temperatura y humedad del bioensayo.

Insecto	% Mortalidad
<i>T. castaneum</i>	0
<i>S. zeamais</i>	65±3
<i>S. oryzae</i>	83±2

Media ± 1DE de las diez repeticiones

Dado los resultados anteriores se encuentra que en el bioensayo solo podrían obtener resultados reproducibles y fiables cuando se realice con insectos *T. castaneum*. Entonces, de aquí en adelante para todos los ensayos posteriores solo se efectuaron con el insecto *T. castaneum*. De igual forma, los resultados obtenidos pueden llegar a ser extrapolados a otros insectos plaga de almacén, ya que hay reportes de compuestos volátiles que tienen actividad insecticida para varios géneros(22).

Bioensayo de actividad insecticida caja cerrada con variación de volumen y UFC

Se realizó el conteo de insectos muertos y se calculó el porcentaje de mortalidad para el contenedor de 320 mL y 127 mL representando así una variación en el volumen y la cuarta columna corresponde a la mortalidad en el contenedor de 127 mL teniendo en cuenta la misma cantidad de bacteria inoculada por caja de Petri siendo esta 1×10^7 UFC/caja, dicho resultados se presentan en la Tabla 2-3.

La concentración de los COVs liberados por los microorganismos se encuentra sujetos al tamaño del contenedor. Así que se pensó variar el tamaño de este con el fin de ver si aumentaba la actividad, ya que cabe la posibilidad de que algunos COVs no presenten actividad sobre los insectos, debido que la concentración no es lo suficientemente alta para generar la muerte de éstos. Se observa en la tercera columna de la Tabla 2-3 que la actividad biológica aumenta en todos los casos, así pues, se puede asegurar que, la premisa propuesta acerca de la relación de la actividad biológica con la concentración es totalmente válida para este caso.

Tabla 2-3. Porcentaje de mortalidad de *T. castaneum* en el bioensayo con variación de volumen y cantidad UFC/caja estándar.

Bacteria	% Mortalidad a 320 mL	%Mortalidad 127 mL	%Mortalidad a 127 mL y UFC constante
PNM-5	42±6	64±7	45 ± 4
PNM-143	40±8	60±8	62 ± 4
PNM-201	37±7	58±6	58 ± 3
PNM-149	41±7	55±7	43 ± 6
PNM-210	34±6	55±4	43 ± 5
PNM-39	28±5	50±8	50 ± 9
PNM-123	30±6	48±6	54 ± 7
PNM-216	23±7	45±3	40 ± 7
PNM-145	21±5	40±7	38 ± 4
PNM-10	20±6	38±5	40 ± 9
PNM-144a	18±7	37±3	33 ± 5
PNM-50	15±6	36±5	25 ± 6
PNM-166	12±4	35±6	23 ± 7
PNM-106	8±4	27±6	17 ± 9
PNM-208	6±3	20±4	15 ± 8
PNM-24	0	11±5	6 ± 3
PNM-115	0	0	0
IBUN 5.1	0	0	0
PNM-32	0	0	0
PNM-168	0	0	0
PNM-54	0	0	0

Media ± 1DE de las tres repeticiones

* Bioensayo de mortalidad del insecto *T. castaneum* en contenedores de 127 mL con 1×10^7 UFC/caja Petri inoculada

La metodología mencionada para la determinación de UFC/mL mencionada como una unidad de absorbancia, presenta algunos errores respecto a la cuantificación, dado que no es posible saber con exactitud cuál es la cantidad de colonias que se están inoculando, ya que el valor que se registra para la densidad óptica hace referencia a una medida de la cantidad de luz que es absorbida por el medio de cultivo con las bacterias.

Como se mencionó anteriormente dicha absorción de la luz se atribuye a las colonias formadas en medio de cultivo líquido, pero la apreciación que no se tiene en cuenta es que las colonias muertas también van a generar absorción de la luz que incide sobre el medio de cultivo, generando así valores incorrectos a un valor aproximado del número de colonias. Por otro lado, las curvas de crecimiento de cada microorganismo son diferentes, por consiguiente, no

podría compararse la actividad en varios microorganismos si la misma cantidad de colonias no fueron inoculadas. Así pues, se hizo uso de una metodología que permitiera realizar el conteo de las colonias que serían inoculadas. 1×10^7

Con los valores ya determinados de UFC se tomó como valor inicial para todas las bacterias en el bioensayo 1×10^7 UFC/caja de Petri. Es de aclarar que este valor se estableció para este conjunto de bacterias. Si se tuviese que usar otro conjunto de bacterias se les debe realizar el mismo procedimiento de conteo de UFC iniciales. Si fuera el caso que se tuviera un crecimiento muy diferente, que variara en más de dos órdenes de magnitud ya se debería recurrir a variar la cantidad de μL que se inoculan en el medio de cultivo líquido, de ahí la importancia de conocer cuál era el punto de partida de UFC iniciales.

Los resultados de la columna 4 de la Tabla 2-3 presentan variaciones del valor del porcentaje de mortalidad respecto a los otros ensayos (320 mL y 127 mL), esto puede deberse a que en este caso se tuvo un valor de concentración bacteria fijo, con el fin de establecer condiciones iguales y reproducibles para los ensayos realizados. Los cambios más relevantes son una disminución en la actividad y algunas variaciones en la posición decreciente de la actividad, esto puede deberse a que la cantidad de bacteria inoculada puede encontrarse relacionada con la producción de COVs con actividad insecticida en ese rango de cantidad de UFC, ya que no es posible asegurar si a mayor cantidad de bacteria será mejor la actividad. Algunos investigadores proponen que la producción de metabolitos secundarios activos no tiene relación con la cantidad de bacteria, sino con la presencia de predadores o parásitos que generan una competencia por nutrientes(23).

De los resultados ya directamente comparables dentro de la Tabla 2-3 se puede inferir en primer lugar que 9 de los 22 aislamientos presentaron una actividad superior al 40%, dichos aislamientos pertenecen al género *Paenibacillus*, *Streptomyces* y *Lysinibacillus*. Los otros 13 géneros que no presentaron actividad biológica pertenecen a *Streptomyces* y *Paenibacillus*. A partir de este resultado se puede decir que el género no presenta una relación estrecha en la actividad biológica, ya que para el caso de algunos de los géneros de *Streptomyces* y *Paenibacillus*, se poseen bacterias activas como inactivas en ambos casos.

Ahora bien, si se analiza la fuente de la cual provienen las bacterias, algunas del género *Streptomyces* (PNM-5, PNM-143, PNM-144a, PNM-145, PNM-149) aisladas del primer lavado del fragmento de la esponja *Niphates digitalis* producen COVs con actividad insecticida, lo cual puede estar relacionado con la fuente de aislamiento. Hasta el momento no es posible establecer qué clase de compuestos se están produciendo, pero puede que los perfiles metabólicos volátiles tengan mucho en común, dada su actividad biológica cercana. Las otras bacterias que sus COVs generaron actividad insecticida provienen de fuentes de aislamiento diferente, así que no es posible sugerir una relación entre la actividad y la fuente de aislamiento.

Se seleccionó como fuente productora de COVs con actividad insecticida a las bacterias que presentaran una actividad biológica superior al 50%. Se estableció este valor porque quintuplicaba el valor del control negativo que era del 10% en algunos casos, lo cual aseguraría que en efecto sí se tratase de una fuente prometedora de COVs con la actividad objetivo. Así pues, para tal fin los aislamientos PNM-143, PNM-201, PNM-39 y PNM-123 eran los que cumplían con esta característica.

2.3.3 Variación de la mortalidad en función de los días

Con el objetivo de determinar cuáles podían ser los posibles compuestos que estaban generando la muerte del insecto, y ver la posibilidad de reducir el tiempo del ensayo, ya comparado con otros ensayos insecticidas con compuestos puros (22) algunos de estos tardan alrededor de 24 horas y el planteado en este trabajo 96 horas. Se realizó el bioensayo insecticida de caja cerrada y se observó cuál era la mortalidad de los insectos a las 24, 48, 72 y 96 horas, dichos resultados se muestran en la Figura 2-2.

Los resultados mostrados en la Figura 2-2 se muestra un comportamiento creciente en la mortalidad del insecto al transcurrir los días del bioensayo, lo que era de esperarse en el caso en que los aislamientos se encuentren produciendo COVs activos durante todo su crecimiento hasta el final del bioensayo. Dicho comportamiento también está relacionado con el crecimiento de la bacteria en forma ascendente ya que para algunas bacterias a medida que

realizan su división celular producen COVs ya sea de comunicación y/o defensa contra predadores(16).

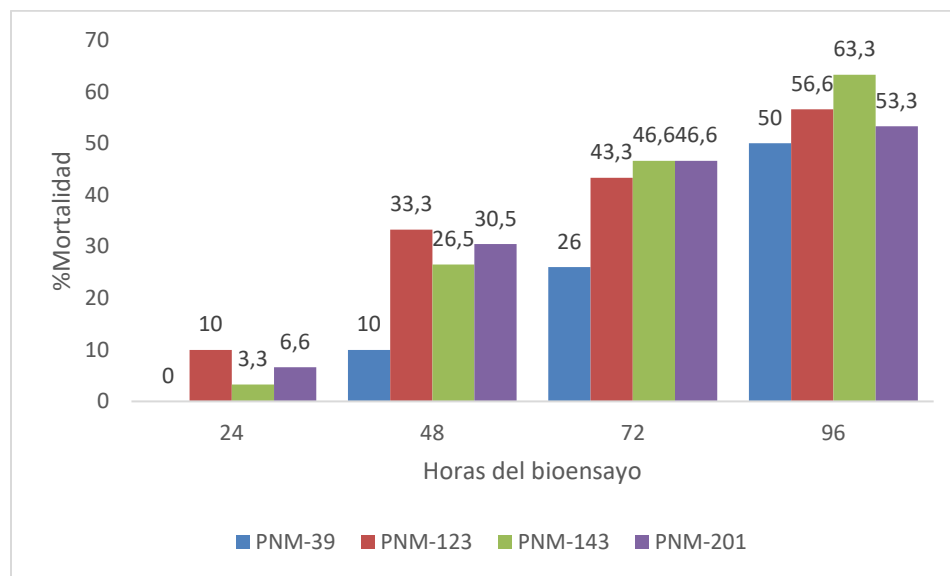


Figura 2-2 Variación del porcentaje de mortalidad de *T. castaneum* en función del tiempo en el bioensayo insecticida caja cerrada para los aislamientos PNM-39 (*Paenibacillus sp.*), PNM-123 (*Paenibacillus sp.*), PNM-143 (*Streptomyces sp.*) y PNM-201 (*Paenibacillus sp.*).

Otra apreciación a tenerse en cuenta es que cabe la posibilidad que el perfil metabólico volátil se encuentre variando cada 24 horas ya que algunos de los compuestos volátiles son producidos en estadios de crecimiento de algunos microorganismos. En el caso de los microorganismos pertenecientes al género *Streptomyces* ellos pasan por ciclos de esporulación y durante su crecimiento, experimentando dos esporulaciones en sus 15 primeros días de crecimiento(12), en otros casos estos son subproductos del metabolismo secundario e incluso intermediarios para la producción de otros metabolitos (24). Se pensó tomar el perfil metabólico volátil a las 96 horas, pero en vista de que no es posible asegurar que solo los COVs producidos en ese el último día del ensayo puedan ser los responsables de la actividad dado que se estaba generando actividad insecticida días antes. Se decidió tener en cuenta todos los días ya que puede que a las 24 horas no haya la concentración necesaria para generar la muerte del insecto, pero si a las 48, 72 y/o 96 horas.

2.4 Conclusiones

Los materiales seleccionados para el bioensayo fueron un recipiente hermético con un volumen de 127mL, cajas de Petri de vidrio de 5 cm, soportes de 1cm de altura, 200 mg de avena como alimento, 10 insectos *T. castaneum*, 50 µL de bacteria con una concentración 1×10^7 UFC/caja Petri. Los parámetros determinados fueron, un tiempo de 4 días, y temperatura de 28°C.

Los 4 aislamientos bacterianos que presentaron mejor actividad fueron PNM-39 (*Paenibacillus* sp.), PNM-123 (*Paenibacillus* sp.), PNM-143 (*Paenibacillus* sp.) y PNM-201 (*Paenibacillus* sp.). A las 96 h del bioensayo se observa la mayor actividad fumigante sobre *T. castaneum*, alcanzando valores de mortalidad cercanos al 50% en los insectos.

2.5 Referencias

1. Breeman R, Hass S, Friesen K. Tribolium stock maintenance : USDA ARS [Internet]. 2015 [cited 2018 Mar 15]. Available from: <https://www.ars.usda.gov/plains-area/mhk/cgahr/spieru/docs/tribolium-stock-maintenance/>
2. FAO. Guide to implementation of phytosanitary standards in forestry [Internet]. 2012 [cited 2018 Dec 11]. Report No.: 164. Available from: <http://www.fao.org/3/a-i2080e.pdf>
3. ERP Agrícola. Métodos para el control de plagas en granos almacenados - Software ERP Agrícola: Gestión integral de Ranchos Agrícolas [Internet]. México; 2016 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <http://sistemaagricola.com.mx/blog/control-de-plagas-en-granos-almacenados/>
4. FAO. Grain storage techniques ... - Insect control - Chemical control techniques [Internet]. Chemical control techniques. Roma; 2016 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <http://www.fao.org/docrep/t1838e/T1838E1g.htm>
5. Casini C, Santajuliana M. Control de Plagas en Granos Almacenados. - Artículo Técnico [Internet]. 2017 [cited 2018 Sep 15]. Available from: <http://www.cosechaypostcosecha.org/data/articulos/postcosecha/ControlPlagasGranosAlmacenados.asp>
6. Puerto Rodríguez AM, Suárez Tamayo S, Palacio Estrada DE. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Rev Cubana Hig Epidemiol [Internet]. 2014 [cited 2018 Aug 29];52(3):372-87. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010

7. Cao J-Q, Guo S-S, Wang Y, Pang X, Geng Z-F, Du S-S. Toxicity and repellency of essential oil from *Evodia lenticellata* Huang fruits and its major monoterpenes against three stored-product insects. *Ecotoxicol Environ Saf* [Internet]. 2018 Sep [cited 2018 Oct 8];160:342–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651318304366>
8. Zhao L jing, Yang X nan, Li X ying, Mu W, Liu F. Antifungal, Insecticidal and Herbicidal Properties of Volatile Components from *Paenibacillus polymyxa* Strain BMP-11. *Agric Sci China* [Internet]. 2011;10(5):728–36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60056-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60056-4)
9. Hansen J. Natural product chemistry and environmental chemistry. 2018 [cited 2018 Aug 29]; Available from: <http://agro.au.dk/en/research/research-areas/natural-product-chemistry-and-environmental-chemistry/>
10. Organización mundial de la salud O. Organización Mundial de la Salud Ginebra [Internet]. Ginebra; 2002 [cited 2019 Jan 2]. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4932s/s4932s.pdf>
11. Sieuwerts S, de Bok FAM, Mols E, de Vos WM, van Hylckama Vlieg JET. A simple and fast method for determining colony forming units. *Lett Appl Microbiol* [Internet]. 2008 Oct 1 [cited 2019 Jan 7];47(4):275–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x>
12. Betancourt Jaramillo LA. Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos. Universidad Nacional de Colombia; 2017 (Tesis de Doctorado).
13. Daisy BH, Strobel GA, Castillo U, Ezra D, Sears J, Weaver DK, et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*. 2002;148(11):3737–41.
14. Strobel G. *Muscodor albus* and its biological promise. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2006;33(7):514–22.
15. Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy AS, Savchuk SC. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol Biochem*. 2005;37(5):955–64.
16. Naranjo Gaybor SJ. Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS) como estrategia de control de agentes fitopatógenos. Universidad Nacional de Colombia; 2018 (Tesis de doctorado).
17. Cuevas Díaz M del C, Pinette Medina G, Lopez Hidalgo AM, Cruz Sánchez JS, Nieto Peña M de L. Requerimientos de control de calidad en bioensayos. 2015;(April):127–35. Available from: <http://www.publicaciones.inecc.gob.mx/libros/665/requerimientos.pdf>
18. Regatta. *Sitophilus zeamais* [Internet]. 2003 [cited 2018 Mar 15]. Available from: http://jcringenbach.free.fr/website/beetles/curculionidea/Sitophilus_zeamais.htm
19. Artth study. Pest of rice (*Sitophilus oryzae*): Distribution, Life cycle, Nature of damage and Control measures | Study&Score [Internet]. 2017 [cited 2018 Mar 15].

- Available from: <http://www.studyandscore.com/studymaterial-detail/pest-of-rice-sitophilus-oryzae-distribution-life-cycle-nature-of-damage-and-control-measures>
20. Hippola A, Herath C. Red flour beetle [Internet]. 2014. [cited 2018 Mar 15]. Available from: <https://www.slideshare.net/BaranaRangana/red-flour-beetle-2>
 21. Emekci M, Navarro S, Donahaye E, Rindner M, Azrieli A. Respiration of *Tribolium castaneum* (Herbst) at reduced oxygen concentrations. *J Stored Prod Res.* 2002;38(5):413–25.
 22. Prieto Rodríguez JA. Estudio fitoquímico de *Compsoeura capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp. Bogotá; 2012. 256 p.
 23. Pinu FR, Villas-Boas SG, Aggio R. Analysis of intracellular metabolites from microorganisms: Quenching and extraction protocols. *Metabolites.* 2017;7(4).
 24. Audrain B, Farag MA, Ryu CM, Ghigo JM. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev.* 2015;39(2):222–33.

3. Capítulo 3: Análisis de compuestos volátiles con actividad insecticida

Resumen

Los microorganismos producen compuestos orgánicos volátiles (COVs) que usan como intermediarios de comunicación, alerta, defensa entre otros. La producción de dichos COVs depende de varios factores como el medio de crecimiento, el estrés generado por temperatura, humedad y el tiempo de inoculación. En este trabajo se estudió la producción COVs de 4 aislamientos de bacterias del caribe colombiano identificadas como PNM-123 (*Paenibacillus sp.*), PNM-201(*Paenibacillus sp.*), PNM-39 (*Paenibacillus sp.*) y PNM-143 (*Streptomyces sp.*).

La extracción mediante microextracción en fase solida (SPME) y el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS), permitió determinar el perfil metabólico volátil (PMV) a las 24, 48, 72 y 96 horas.

Entre los COVs identificados para la batería PNM-143 se encuentran acetofenona, limoneno, esteroides y compuestos aromáticos. Los aislamientos PNM-123 y PNM-201 producen principalmente cetonas y compuestos aromáticos, mientras la bacteria PNM-39 es la única que produce compuestos azufrados.

Palabras clave: Compuestos orgánicos volátiles, bacterias, *Paenibacillus*, *Streptomyces*, SPME.

3.1 Introducción

El estudio de compuestos orgánicos volátiles microbianos (COVM) ha estado en auge en los últimos 20 años. Se han identificado moléculas de no más de 20 carbonos y un peso molecular entre 100 y 500 Daltons, con grupos funcionales como alquenos, cetonas, alcoholes, ésteres, éteres y ácidos carboxílicos(1). La mayoría de estos compuestos son productos del metabolismo primario y secundario.

Los COVs son los responsables de múltiples actividades biológicas y llevan una relación muy estrecha entre diferentes organismos. Ejemplos de estas actividades biológicas están en las que los compuestos median la interacción entre bacterias como mecanismo de comunicación (*quorum sensing*) (2) o como mecanismo de defensa; en la defensa contra hongos (actividad antifúngica) (3) o con plantas como promotores del crecimiento o para defensa contra depredadores (relación simbiote) (4) y en la relación bacteria-insecto(5).

En este orden de ideas en este trabajo se evaluaron tres metodologías de extracción de los COVs y con la más eficiente y reproducible se realizó la identificación tentativa de los compuestos liberados por los cuatro asilamientos bacterianos seleccionados por su actividad insecticida.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Materiales y reactivos

Los medios de cultivo utilizados fueron Luria Bertani (LB) e ISP2, preparados en medio sólido. Los reactivos 5-metil-2-hexanona, 2-nonanona, 2-heptanona, 2-feniletanol, 2-pentanona, 4-metil-2-pentanona fueron de marca Alfa Aesar®, benzoato de metilo, alcohol bencílico, limoneno, diclometano (DCM), benzonitrilo marca Toronto research chemicals®, antranilato de metilo de International Fragrances and Flavor®, alcohol furfurílico marca Sigma Aldrich®. La 2-octanona fue obtenida por síntesis a partir de 2-octanol marca Panreac® y oxidación con $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ marca Merck® y posterior lavado con éter etílico (Merck) (Ver material suplementario).

Los microorganismos seleccionados para el bioensayo fueron aportados por el grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales y frutas de Colombia” de la Universidad Nacional de Colombia. Estos aislamientos se recolectaron el 22 de enero de 2016 en la isla de Providencia y Santa Catalina coordenadas 13° 18'0.00" N con 81° 23'41.41"O (6). En la tabla 3-1 se presentan su identificación y fuente(7).

Tabla 3-1. Microorganismos a estudiar su perfil metabólico volátil

Código	Vecino cercano	Fuente
PNM-143	<i>(Streptomyces sp.)</i>	<i>Niphates digitalis (Porifera)</i>
PNM-39	<i>(Paenibacillus sp.)</i>	Fango manglar - laguna interna
PNM-123	<i>(Paenibacillus sp.)</i>	<i>Alga Codium sp.</i>
PNM-201	<i>(Paenibacillus sp.)</i>	Sedimento en pastos a 20 pies del agua

3.2.2 Métodos de extracción de COVs

Extracción con Tenax®

Para cada ensayo de extracción se pesaron 100 mg de resina Tenax® que se colocaron dentro de un vial de 2 mL. El vial permaneció durante 4 días en la caja diseñada para el bioensayo (ver capítulo 2). La elución de los compuestos retenidos se realizó con 1 mL de diclorometano y ultrasonido por 10 minutos. Se obtuvieron extractos por triplicado.

Extracción con MonoTrap™

Una celda de monoTrap se introdujo en un vial de 2 mL que se dejó en la caja del bioensayo durante 4 días. Los volátiles se eluyeron con 2mL de diclorometano y ultrasonido por 10 minutos. La extracción se realizó por triplicado.

Microextracción en fase sólida (HS-SPME)

Una fibra compuesta por divinilbenceno/carboxen/polidemilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (30um, 50um Supelco, USA), fue expuesta en el espacio de cabeza (headspace HS) del bioensayo durante 20 minutos con un holder manual marca Sigma-Aldrich Referencia 713-1344 a las 24, 48, 72 y 96 horas del bioensayo (Figura 3-1). La desorción térmica de los

compuestos retenidos se realizó directamente en el puerto de inyección cromatógrafo de gases durante 5 minutos a 250°C. Este procedimiento se realizó por triplicado.

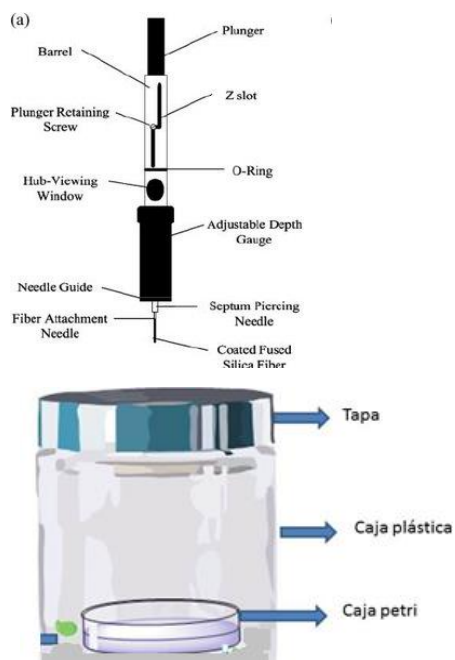


Figura 3-1. Microextracción en fase sólida del espacio de cabeza del bioensayo insecticida de COVs liberados por bacterias.

3.2.3 Separación e identificación

El análisis de los COVs se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas GCMS Agilent 7820 equipado con una columna SLB®-5ms- 28471-U (Sigma-Aldrich) 30 m × 0,25 mm, df 0,25 µm. Para el caso de la fibra de SPME la inyección se hizo en modo splitless a 250°C. Para los extractos Tenax y MonoTrap, se inyectó 1µL en modo Split relación 1 a 10 a 250°C.

El programa de temperatura empleado fue: temperatura inicial de 50°C, luego calentamiento hasta 70°C a una velocidad de 4°C/min. Luego con una rampa de 6°C/min se calentó hasta 120°C y finalmente a una velocidad de 12°C/min calentamiento hasta 240°C.

La detección se realizó en modo de Impacto electrónico (IE) a una energía de ionización de 70eV en un rango de masas de 40 a 250 um.

El análisis de una mezcla de parafinas C8-C40 marca Supelco® y la base de datos NIST 14 fueron empleadas para la identificación tentativa de los COVs, mediante la comparación de los índices de retención y los espectros de masas. Para la identificación inequívoca se emplearon disoluciones de patrones (1mg/mL) en diclorometano que se analizaron bajo las mismas condiciones.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Comparación de métodos de extracción de COVs

Mediante la evaluación de tres métodos de extracción, se buscó establecer la metodología más eficiente y reproducible para la extracción de COVs. La comparación de los TICs permitió establecer que la extracción de COVs empleando Tenax y MonoTrap como materiales sorbentes, es poco eficiente. Esto puede atribuirse a que, al confinar estos materiales en viales, para evitar su daño por los insectos, se impide la exposición completa del material en el espacio de cabeza (*headspace*). Así, los TICs resultaron pobres en información y con baja reproducibilidad entre las réplicas.

De otra parte, el uso de la fibra DVB/CAR/PDMS para Microextracción Fase Sólida (HS-SPME), permitió la obtención de un perfil de volátiles muy complejo, dado por el metabolismo de la bacteria, el medio de cultivo y el insecto. Con el fin de disminuir la cantidad de COV detectados, se realizó la extracción en ausencia de los insectos y teniendo en cuenta los COVs liberados por el blanco (medio de cultivo). Este método es sencillo, sensible y reproducible. Por ello se seleccionó para establecer el perfil metabólico volátil de las bacterias.

3.3.2 Perfil metabólico del aislamiento PNM-143 (*Streptomyces sp.*)

En la Figura 3-2 se presenta el perfil metabólico volátil de PNM-143 a las 48 horas y en la Tabla 3-2 los compuestos volátiles identificados en cada momento de extracción.

Al comparar los perfiles cromatográficos, es posible evidenciar que en el perfil de la bacteria se pueden identificar compuestos liberados por el medio de cultivo y el material plástico de la

caja del ensayo. Una vez depurada la información, los esfuerzos de identificación se enfocaron hacia aquellos compuestos presentes únicamente en el TIC de la bacteria PNM-143.

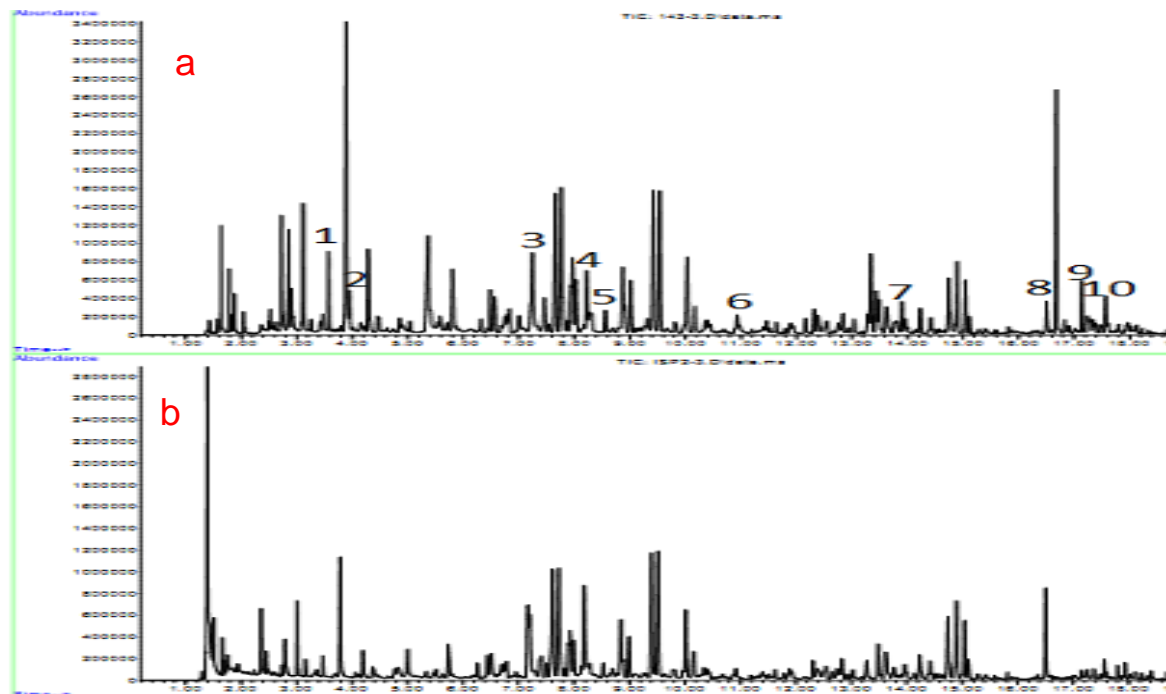


Figura 3-2 a) TIC del HS-SPME para la bacteria PNM-143 a 48h del bioensayo, **b)** TIC del HS-SPME del blanco de medio de cultivo ISP2 a las 48h

En las primeras 24 horas, solo se producen cantidades detectables de isobutirato de etilo y benzoato de metilo. A las 48 horas, alcohol furfurílico, acetofenona y limoneno son liberados, pero no detectados en tiempo posterior. Caso contrario para tiglato de metilo, metilpirrol-2-carboxilato y germacreno-D que son detectados hasta las 96 horas de ensayo. Los compuestos antranilato de metilo, β -gurjuneno y α -cubebeno, se producen con intermitencia de 24 horas, lo cual se puede asociar con los dos ciclos de esporulación que presenta esta bacteria(8).

La presencia de benzoato de metilo, limoneno y sesquiterpenos como germacreno D, β -cubebeno, β -gurjuneno, α -cubebeno y α -ylangeno entre los volátiles liberados por la bacteria PNM 143, coincide con otros trabajos para bacterias del género de *Streptomyces* (9)(10) lo cual concuerda con la asignación de género hecha para esta bacteria (7). El benzoato de metilo, el antranilato de metilo y el limoneno, también han sido identificados como COVs bacterianos en el género *Streptomyces*(9)(10).

Tabla 3-2. Compuestos orgánicos volátiles identificados del aislamiento PNM-143 (*Streptomyces sp.*)

No.	IR exp DB-5	IR teo DB-5	Compuesto	PNM-143			
				24	48	72	96
1a	739	743	Isobutirato de etilo				
1	848	851*	Alcohol furfurílico				
2	866	873	Tiglato de metilo				
3	1024	1027*	Limoneno				
3a	1038	1026	2-metil-2-borneno				
4	1059	1065	Acetofenona				
5	1088	1084*	Benzoato de metilo				
6	1112	1123	Metilpirrol-2-carboxilato				
6a	1392	1390	β -cubebeno				
7	1407	1402*	Antranilato de metilo				
8	1432	1432	β -gurjuneno				
9	1460	1463	α -cubebeno				
10	1474	1479	Germacreno D				
10a	1493	1491	α -ylangeno				

NR = No se reporta un valor de literatura

* = Identificación inequívoca por comparación del espectro de masas e índice de retención con sustancias de referencia.

Al tener en cuenta el ensayo de mortalidad del insecto, se observó que cumplidas 96 horas del bioensayo se obtiene una tasa de mortalidad del 50%, que puede estar asociada con la presencia de β -cubebeno que se genera justo en ese momento o a la acumulación por parte de los insectos de dosis letales de otros compuestos volátiles.

Al comparar estos resultados con otras publicaciones, se encontró que el alcohol furfurílico y el metilpirrol-2-carboxilato se detectan por primera vez como volátiles de bacterias, mientras que la acetofenona ha sido detectada en bacterias del género *Burkholderia* (11).

3.3.3 Perfil metabólico volátil de los aislamientos PNM-123, PNM-201, PNM-39 (*Paenibacillus* sp.)

Los perfiles metabólicos de volátiles de las bacterias del género *Paenibacillus* sp. identificadas como PNM-123, PNM-201 y PNM-39 son similares entre sí. En la Figura 3-3 se muestra el perfil metabólico volátil de estos aislamientos a las 96 horas, dado que es el tiempo en el que se presenta la mayor producción de compuestos volátiles. En la Tabla 3-3 se presenta la identificación de COVs liberados por las bacterias a las 24, 48, 72 y 96 horas de crecimiento. Los criterios de identificación se basaron en la comparación de índices de retención (IR) y espectros de masas de bases de datos o de sustancias de referencia cuando se encontraban disponibles.

La producción de COVs se evaluó durante 4 días consecutivos, observando que para las bacterias del género *Paenibacillus*, la cantidad y variedad de analitos volátiles incrementa con el tiempo de crecimiento. Así, para las primeras 24 horas, se observan pocas señales, mientras que el perfil se enriquece principalmente entre las 48 y 72 h y permanece constante hasta las 96 horas.

Al correlacionar el perfil metabólico volátil con el ensayo de mortalidad (sección 2.3.3), se puede estimar que los COVs liberados entre 48 y 72 horas de crecimiento son responsables de la mortalidad observada para *T. castaneum*.

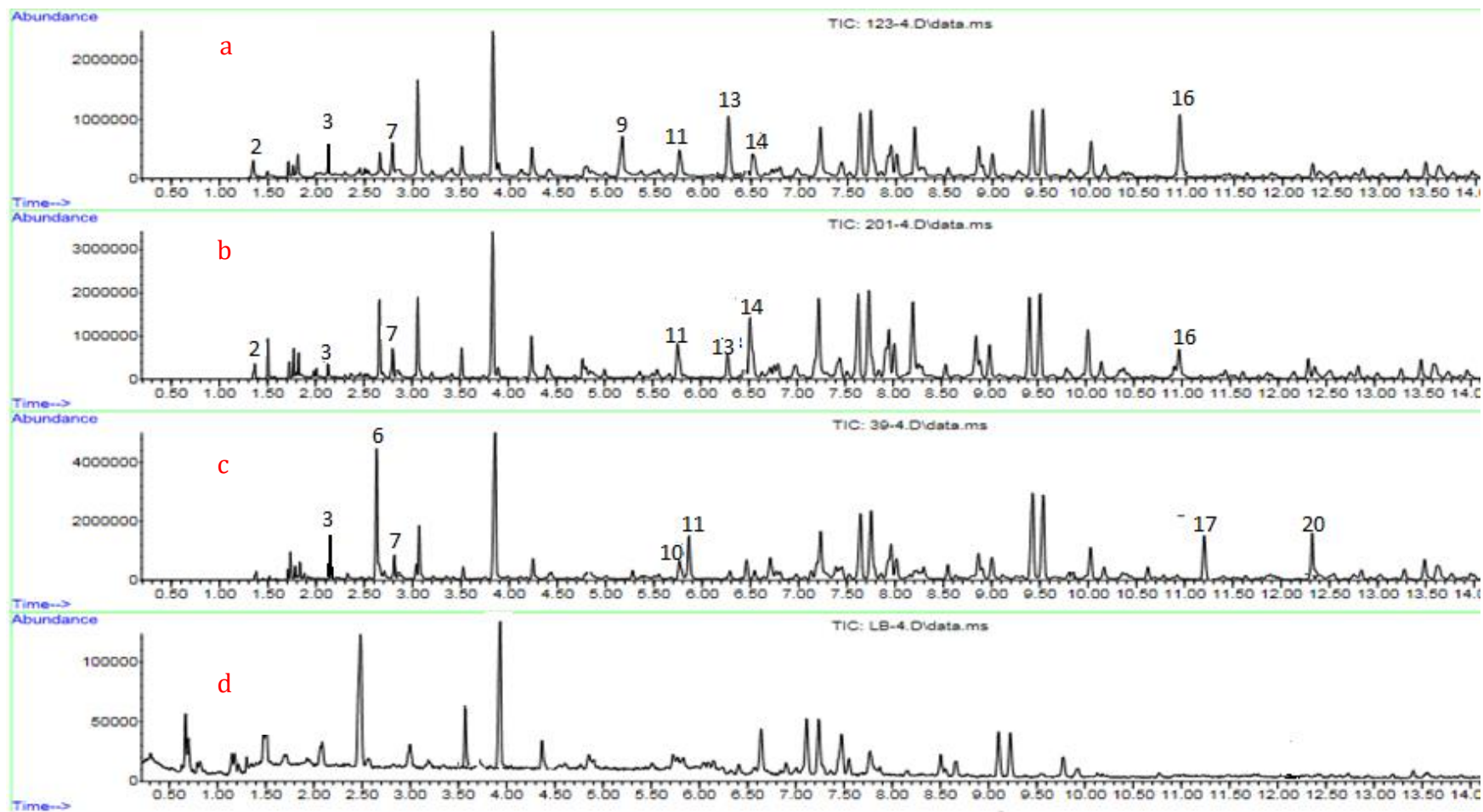


Figura 3-3. TIC del HS-SPME para las bacterias a las 96 h del bioensayo **a)** PNM-123, **b)** PNM-201, **c)** PNM-39 y **d)** blanco (LB)

Tabla 3-3. COVs identificados en los aislamientos *Paenibacillus* spp.

No.	IR exp DB-5	IR teo DB-5	Compuesto	PNM-39				PNM-123				PNM-201			
				24	48	72	96	24	48	72	96	24	48	72	96
1	<600	400	Metanotiol												
2	<600	503	Acetona												
3	678	686*	2-pentanona												
4	698	706	Tioacetato de metilo												
5	700	704	2,4-dimetilfurano												
6	728	734	Disulfuro de dimetilo												
7	738	747	3-metil-2-pentanona												
8	740	736	metil-isobutil-cetona												
9	849	857*	5-metil-2-hexanona												
10	889	885	3-heptanone												
11	880	889*	2-heptanona												
12	915	908	2,5-dimetilpirazina												
13	948	956*	2-octanona												
14	955	965*	5-metil-2-heptanona												
15	963	963	Trisulfuro de dimetilo												
16	1003	992*	Benzonitrilo												
17	1020	1012*	alfa-felandreno												
18	1029	1023*	Alcohol bencílico												
19	1092	1090*	2-nonanona												
20	1108	1114*	2-feniletanol												
21	1178	1190*	2-decanona												
22	1188	1168	2-metilisoborneol												
23	1247	1251*	1-decanol												

* = Identificación inequívoca con sustancias de referencia

Este trabajo es pionero en este tipo de correlación. Así se identificaron como potenciales insecticidas los siguientes compuestos: 5-metil-2-hexanona, 3-heptanona, 2-heptanona, 5-metil-2-heptanona, benzonitrilo, alcohol feniletílico y 1-decanol, por cuanto son producidos por las 3 bacterias en este intervalo de tiempo.

El aislamiento PNM-39 es el más diverso en cuanto a la composición de los COVs generados, pues produce compuestos azufrados, metilcetonas, cetonas, una pirazina e isoborneol. Las bacterias PNM 123 y PNM 201 producen principalmente metilcetonas y cetonas alquílicas. Todas las bacterias producen benzonitrilo, un compuesto altamente tóxico con dosis letales de 100mg en ratas y 500mg en conejos (12).

Todos los aislamientos producen metilcetonas y cetonas alifáticas como 2-heptanona, 2-octanona, 2-nonanona, 2-decanona y 2-docecanona que también han sido identificados en recientes investigaciones para el género *Paenibacillus* con actividad antifúngica (13). Algunas cetonas más pequeñas como acetona e isobutil-metilcetona se han encontrado recientemente en bacterias del mismo género con actividad promotora del crecimiento en plantas(14).

Así mismo, se han identificado alcoholes alifáticos y aromáticos (15); cetonas(13) y compuestos azufrados (16) como volátiles liberados por bacterias del género *Paenibacillus*, que están acorde con los resultados aquí encontrados. Compuestos como la 2-pentanona, 2,5-dimetilpirazina, α -felandreno, 3-metil-2-pentanona, 2-octanona, 5-metil-2-heptanona, 5-metil-2-hexanona y benzonitrilo, han sido identificados por primera vez como COVs producidos por bacterias del género *Paenibacillus* sp.

3.4 Conclusiones

El método de extracción de COVs más eficiente y reproducible fue HS-SMPE con una fibra de DVB/CAR/PDMS, en el bioensayo de caja cerrada y el muestreo a lo largo de las 96 horas. El análisis del blanco permitió diferenciar los compuestos volátiles liberados por el medio de cultivo.

Las bacterias del género *Paenibacillus* sp liberan COVs semejantes entre sí. Se identificaron principalmente cetonas y metilcetonas como posibles responsables de la actividad insecticida observada entre 48 y 72 horas.

La bacteria del género *Streptomyces* sp. puede diferenciarse de las bacterias del género *Paenibacillus* sp. dada su composición volátil. La bacteria PNM-39 fue la única que produjo compuestos azufrados.

Tentativamente se puede decir que las cetonas alifáticas son responsables de la actividad insecticida observada para las bacterias del género *Paenibacillus* spp., mientras que los sesquiterpenos liberados por la bacteria del género *Streptomyces* sp. puede atribuirse la actividad observada.

3.5 Referencias

1. Kai M, Haustein M, Molina F, Petri A, Scholz B, Piechulla B. Bacterial volatiles and their action potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;81(6):1001–12.
2. Naranjo Gaybor SJ. Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS) como estrategia de control de agentes fitopatógenos. Universidad Nacional de Colombia; 2018 (Tesis de doctorado).
3. Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy AS, Savchuk SC. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biol Biochem.* 2005;37(5):955–64.
4. Schulz-Bohm K, Martín-Sánchez L, Garbeva P. Microbial volatiles: Small molecules with an important role in intra- and inter-kingdom interactions. *Front Microbiol.* 2017;8(DEC):1–10.
5. Daisy BH, Strobel GA, Castillo U, Ezra D, Sears J, Weaver DK, et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. *Microbiology.* 2002;148(11):3737–41.

6. Rey Ángel C agosto, Romero Isaza CM. Contrato marco de acceso a recursos genéticos y sus productos derivados N° 121 del 22 de enero de 2016 suscrito entre el ministerio de ambiente y desarrollo sostenible de la Universidad Nacional de Colombia. bogota; 2018.
7. Betancourt Jaramillo LA. Actinobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica para el control de fitopatógenos. Universidad Nacional de Colombia; 2017.
8. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2016 Mar 25 [cited 2019 Feb 25];80(1):1–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26609051>
9. Yamada Y, Arima S, Nagamitsu T, Johmoto K, Uekusa H, Eguchi T, et al. Novel terpenes generated by heterologous expression of bacterial terpene synthase genes in an engineered *Streptomyces* host. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. 2015 Jun 21 [cited 2019 Feb 25];68(6):385–94. Available from: <http://www.nature.com/articles/ja2014171>
10. Wilkins K, Schöller C. Volatile Organic Metabolites from Selected *Streptomyces* Strains [Internet]. [cited 2019 Feb 25]. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/saj/23/2/23_SAJ230202/_pdf
11. Groenhagen U, Baumgartner R, Bailly A, Gardiner A, Eberl L, Schulz S, et al. Production of Bioactive Volatiles by Different *Burkholderia ambifaria* Strains. *J Chem Ecol* [Internet]. 2013 Jul 7 [cited 2019 Feb 25];39(7):892–906. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10886-013-0315-y>
12. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). RTECS:AM1400000 - Acetonitrile, phenyl- - The Registry of Toxic Effects of Chemical Substances | CDC/NIOSH [Internet]. [cited 2019 Mar 28]. Available from: <https://www.cdc.gov/niosh-rtecs/AM155CC0.html>
13. Cheng W, Yang J, Nie Q, Huang D, Yu C, Zheng L, et al. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. *Sci Rep* [Internet]. 2017 Dec 24 [cited 2018 Sep 10];7(1):16213. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-16631-8>

14. Lee B, Farag MA, Park HB, Kloepper JW, Lee SH, Ryu C-M. Induced Resistance by a Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation of Plant Systemic Defense by a C13 Volatile Produced by *Paenibacillus polymyxa*. [cited 2019 Feb 25]; Available from: www.plosone.org
15. Passera A, Venturini G, Battelli G, Casati P, Penaca F, Quaglino F, et al. Competition assays revealed *Paenibacillus pasadenensis* strain R16 as a novel antifungal agent. *Microbiol Res* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 Feb 25];198:16–26. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501316309338>
16. Lee J-W, Jin C-L, Jang KC, Choi G-H, Lee H-D, Kim JH. Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction. *J Agric Chem Environ* [Internet]. 2013 [cited 2018 Aug 29];2(4):81–5. Available from: <http://dx>.

4. Capítulo 4: Ensayos de actividad fumigante sobre insectos *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus zeamais*

Resumen

En la actualidad los insecticidas se han convertido en un problema de salud pública latente, ya que éstos han traído consecuencias toxicológicas a la fauna y flora a distintos niveles tróficos y también consecuencias negativas al medio ambiente. Se han explorado nuevas fuentes de origen natural dentro de estas los compuestos volátiles provenientes de bacterias. Anteriormente se identificaron COVs de bacterias aisladas de ambientes marinos PNM-39, PNM-123, PNM-201 y PNM-143. Los compuestos puros fueron utilizados en un bioensayo de actividad fumigante sobre los insectos *S. zeamais*, *S. oryzae* y *T. castaneum*, encontrando los mejores resultados con los compuestos benzotiazol con un valor LC_{50} 33,5 y 3,3 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ para los insectos *T. castaneum* y *S. zeamais* respectivamente, y para el caso de *S. oryzae* el compuesto de mayor actividad fue la 2-heptanona con LC_{50} 27,96 $\mu\text{mol. L}^{-1}$. Se obtuvieron buenos resultados con otros compuestos con valores menores a 100 $\mu\text{mol. L}^{-1}$, para los cuales no se había reportado previamente en la literatura la actividad insecticida. Este trabajo presenta nuevas propuestas de compuestos volátiles que pueden ser usados para el control de plagas de granos almacenados como *S. zeamais*, *S. oryzae* y *T. castaneum*.

Palabras clave: Productos naturales, insecticidas, COVs, *Sitophilus* spp., *T. castaneum*.

4.1 Introducción

Un gran porcentaje de los insecticidas comerciales que se usan actualmente en Colombia, son importados y los otros se fabrican aquí en el país(1) y estos se clasifican según su composición química en aceites minerales, insecticidas inorgánicos, insecticidas orgánicos sintéticos e insecticidas de nueva generación. Adicional a esto la OMS (Organización mundial de la salud) los clasificó según su toxicidad en: a) extremadamente peligrosos, b) altamente riesgosos, c) moderadamente peligrosos y d) ligeramente peligrosos(2). En actualidad estos insecticidas se han convertido en problema de salud pública por ser sustancias tóxicas persistentes, que se bioacumulan en las cadenas alimenticias y logran moverse a grandes distancias. Al contaminar los alimentos, se concentran especialmente en la leche y la carne por el proceso de la biomagnificación biológica.

Como parte de la solución a estos problemas se ha visto a los productos naturales como una fuente de compuestos bioactivos con diferentes actividades biológicas, dentro de estas la actividad insecticida(3). Se han aislado moléculas y extractos con dicha actividad, por ejemplo piretrinas y limonoides, extracto de neem y aceites esenciales aislados de fuentes de origen vegetal(4)(5). También se han aislados moléculas de otras fuentes naturales como las de origen de marino ejemplo briatenina, calicina y telfairina aisladas de octocorales, esponjas y algas respectivamente(6)(7). Otra fuente de productos naturales son los microorganismos, en la actualidad los estudios de productos naturales obtenidos a partir de éstos se encuentran en auge y se han hecho esfuerzos por obtener nuevas moléculas como péptidos, lactonas macrocíclicas, proteínas cristalinas entre otros(8)(9). Estos estudios siempre han estado dirigidos hacia metabolitos secundarios extracelulares que poseen propiedades fisicoquímicas que les confieren estabilidad respecto a su estado físico ya sea sólido o líquido(10). No obstante, aún no se han realizado muchos estudios acerca de la actividad biológica de compuestos orgánicos volátiles (COVs) producidos por microorganismos que son empleados en la comunicación, alerta y defensa contra predadores(11).

En la actualidad con miras a búsqueda de nuevas actividades biológicas, se consideró la actividad insecticida, dada la relación biológica que presenta los microorganismos con las plantas y sus depredadores.

Con la información anteriormente expuesta este capítulo se centrará en evaluar la actividad insecticida de los compuestos puros identificados anteriormente en los aislamientos seleccionados, y también se ensayarán COVs adicionales, los cuales fueron previamente identificados en otros microorganismos aislados de ambientes marinos.

4.2 Materiales y métodos

Procedimientos generales

Todos los bioensayos insecticidas se llevaron a cabo en una incubadora Memert® modelo 400 en condiciones de temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ con flujo de aire. Se utilizaron los insectos *S. zeamais*, *S. oryzae* y *T. castaneum* criados como se mencionó en el capítulo 2.

Reactivos

2-dodecanona, 5-metil-2-hexanona, 2-undecanona, 2-decanona, 2-nonanona, 2-heptanona, 2-feniletanol, 2-pentanona, 4-metil-2-pentanona, acetato de n-butilo, 2-butoxietanol, alcohol bencílico, benzotiazol, *trans*-2-nonel-1-ol, 1-octen-3-ol, alcohol furfurílico marca Alfa Aesar®, *p*-cimeno, cumeno, acetato de isoamilo, acetato de isopropilo, alcohol isoamílico, acetyl acetona, 1-hexanol, 1-octanol, 1-heptanol, propilenglicol, 2-octanol, marca merk, fenilacetotrilo marca Toronto reseach chemicals®, antranilato de metilo marca International Fragrances and Flavor®, limoneno, benzoato de metilo marca Sigma Aldrich, nuvan 50EC marca sanigral y 2-octanona obtenida por vía sintética a partir de 2-octanol.

4.2.1. Ensayo fumigante in vivo de compuestos puros determinados

Para este ensayo se probaron algunos de los compuestos puros previamente identificados. Este ensayo es una adaptación de un ensayo fumigante de aceites esenciales [17]. Este consiste en tomar discos de papel filtro de 2cm de diámetro, viales de 1,5 mL, frascos con tapa de 22 mL. Se introdujeron 10 insectos al frasco de 22mL, luego se tomaron los discos de papel y se introdujeron dentro del vial de 1,5 mL, posterior a eso se aplicaron alícuotas de 2-0,5µL (90,9-

22,7 μ L. L⁻¹) de los compuestos puros sobre los discos de papel filtro y para terminar se colocó el vial de 1,5mL en el interior del frasco de 22mL, también se manejaron concentraciones más bajas usando frascos de un volumen de 130mL con la misma cantidad de alícuotas 2-0,5 μ L (15,4-3,8 μ L. L⁻¹) se cerró todo el sistema y se incubó por 24 horas a 28°C. Se usó como blanco todo el sistema anteriormente descrito sin compuestos, como control positivo se usó Nuvan50EC® a una concentración de 100 μ L.L⁻¹ de igual manera los ensayos fueron hechos por triplicado. Pasadas las 24 horas se realizó el conteo de las muertes en cada unidad y se calculó el porcentaje de mortalidad con la Ec. (1).

$$\% \text{Mortalidad} = \frac{\% \text{Mortalidad tratada} - \% \text{Mortalidad del control}}{100 - \% \text{Mortalidad del control}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Los valores de LC₅₀ e intervalos de confianza para los compuestos puros fueron calculados con el software estadístico SPSS versión 22.

4.3 Discusión y resultados

El objetivo principal del trabajo de investigación siempre fue buscar compuestos orgánicos volátiles provenientes de bacterias que tuvieran actividad insecticida sobre los 3 insectos, infortunadamente el bioensayo solo arrojó resultados reproducibles para el insecto *T. castaneum*, sin embargo los compuestos que se lograron identificar del perfil metabólico volátil de los aislamientos seleccionados, podían ofrecer la posibilidad de controlar no solo la especie que dio activa en el bioensayo sino otras especies de insectos, tal afirmación se encuentra relacionada con los mecanismos de acción que se reportan hoy en día para los insecticidas que son similares entre los insectos(17). Adicional a esto, los insectos que se requieren controlar han generado vías de comunicación y relaciones interespecíficas que les permiten convivir en un mismo ambiente(18), así pues, si se controla a *T. castaneum* es posible controlar los otros insectos que viven en su mismo ambiente con los mismos compuestos. Todo lo anterior se reafirma con varios artículos de autores que reportan actividad insecticida de compuestos en ambos géneros(19)(20).

En el capítulo anterior se realizó la identificación inequívoca de algunos compuestos correspondientes a los aislamientos PNM-123, PNM-201, PNM-39 y PNM-143. A este grupo de compuestos se sumaron los COVs que habían sido identificados del perfil metabólico volátil de aislamientos previamente estudiados por nuestro grupo de investigación, que presentaron actividad insecticida en el screening, siendo estos PNM-50, PNM-166 y PNM-216(14)(15)(16). Los compuestos pertenecientes a esos aislamientos fueron 1-octen-3-ol, benzotiazol, 2-undecanona, 2-docecanona, 2-undecanona, 4-metil-2-pentanona, acetato de n-butilo, 2-n-butoxietanol, trans-2-nonen-1-ol, *p*-cimeno, cumeno, acetato de isoamilo, acetato de isopropilo, alcohol isoamílico, propilenglicol, 1-hexanol, 1-heptanol, 1-octanol y 2-octanol. En total se ensayaron 33 compuestos puros sobre las 3 especies de insectos (*Tribolium castaneum*, *Sitophilus zeamais* y *Sitophilus oryzae*), de los cuales solo un conjunto de esos generó una actividad insecticida superior al 60%. Los resultados se presentan en la Tabla 4-1. En esta tabla se muestran los resultados de los ensayos preliminares de los compuestos con respecto cada especie de insecto, se muestran resultados como porcentaje de mortalidad.

De los 33 compuestos ensayados, a modo de tamizaje preliminar se encontró que solo 26 compuestos presentaron una actividad superior al 60% los cuales se consideraron como activos, y los compuestos que no superaron ese valor se consideraron como no promisorios de la actividad, en las 3 especies de insectos. En algunos casos algunos compuestos mostraron actividad en las 3 especies y para otros casos solo en dos o una de estas. 23 compuestos de los 33 tuvieron un efecto insecticida sobre los insectos *S. oryzae*, 22 compuestos activos contra *T. castaneum* y 15 compuestos fumigantes sobre *S. zeamais*. Esta es una primera aproximación al comportamiento de la actividad biológica de los COVs que están siendo ensayados, ya que con los resultados expresados muestran que los insectos *S. oryzae* son más susceptibles a la acción insecticida de los compuestos, mientras los insectos *S. zeamais* presentan una mayor resistencia a los compuestos evaluados.

Al relacionar los COVs que estaban produciendo los aislamientos seleccionados a las 24, 48, 72 y 96 con la actividad insecticida de este capítulo sobre el insecto *T. castaneum*, la mayoría de los compuestos que presentaron la actividad se encuentran presentes entre las 48 y 72 horas, esta relación se confirma con el estudio que se hizo del porcentaje de actividad insecticida en el bioensayo caja cerrada (sección 2.3.3).

Tabla 4-1. Porcentaje de mortalidad en el modelo fumigante de los compuestos evaluados a una concentración de 90,1 $\mu\text{L.L}^{-1}$ sobre los insectos *T. castaneum*, *S. zeamais*, *S. oryzae*.

Compuesto	<i>T. castaneum</i>	<i>S. zeamais</i>	<i>S. oryzae</i>
2-dodecanona	0,0	0,0	0,0
5-metil-2-hexanona	100,0	100,0	100,0
2-undecanona	50,0±6	0,0	0,0
2-decanona	96,7±4	0,0	0,0
2-nonanona	100,0	90,0±6	100,0
2-heptanona	100,0	100,0	100,0
2-feniletanol	33,3±6	0,0	0,0
2-pentanona	60,0±6	100,0	100,0
4-metil-2-pentanona	100,0	0,0	100,0
Acetato de n-butilo	26,7±4	0,0	100,0
2-n-butoxietanol	90,0±10	100,0	100,0
Benzotiazol	100,0	100,0	100,0
trans-2-nonel-1-ol	0,0	0,0	0,0
1-octen-3-ol	83,3±8	100,0	100,0
Alcohol furfurílico	96,7±6	100,0	100,0
p-cimeno	100,0	40,0±10	80,0±10
Cumeno	80,0±10	60,0±4	93,3±6
Acetato de isoamilo	100,0	96,7±6	80,0±6
Acetato de isopropilo	50,0±6	27,0±6	80,0±10
Alcohol isoamílico	100,0	100,0	80,0±6
Acetil acetona	100,0	100,0	100,0
1-hexanol	33,3±6	23,3±6	60,0±6
1-octanol	33,3±4	13,3±4	80,7±6
1-heptanol	40,0±7	13,3±4	66,7±6
propilenglicol	26,7±10	0,0	40,0±6
2-octanol	66,7±6	26,7±6	80,0±7
Antranilato de metilo	20,0±6	0,0	0,0
2-octanona	93,3±6	83,3±7	100,0
Benzonitrilo	100,0	100,0	100,0
Limoneno	100,0	0,0	0,0
Benzoato de metilo	100,0	100,0	100,0
alfa-felandreno	100,0	0,0	40,0±5
Alcohol bencílico	90,0±4	0,0	0,0

Media ± 1DE de las tres repeticiones

Los compuestos benzotiazol, 1-octen-3-ol (13), limoneno y α -felandreno(21) ya han sido reportados actividad insecticida sobre el insecto *T. castaneum*, pero los compuestos 5-metil-2-hexanona, 2-nonanona, 2-decanona, 2-octanona, p-cimeno 2-heptanona, 2-pentanona, 4-metil-2-pentanona, 2-butoxietanol, alcohol furfurílico, cumeno, acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, acetyl acetona, 2-octanol, 2-octanona, benzonitrilo, benzoato de metilo y alcohol bencílico, no habían tenido reportes de la actividad insecticida sobre *T. castaneum* anteriormente.

Los compuestos con actividad insecticida sobre *S. zeamais*, encontrados en esta investigación no han sido reportados con la actividad biológica de interés sobre este insecto hasta ahora.

El compuesto p-cimeno(22) de todo el conjunto de compuestos activos contra *S. oryzae* es el único que tiene reportes en literatura de su actividad. Los demás compuestos no presentan ningún reporte de la actividad insecticida sobre dicho insecto.

Así pues, teniendo en cuenta los pocos reportes en la literatura de los COVs con la actividad insecticida sobre los 3 insectos de este trabajo, se infiere que los resultados presentados aportan nuevo conocimiento acerca de otros compuestos que pueden ser usados para contralar dichas plagas.

Ahora específicamente se debe observar cual es la clase de compuestos que generan la actividad en cuanto a estructura química se refiere en cada especie, así que se decidió agruparlos en 4 grupos según su grupo funcional y el insecto en el que fue ensayado como se muestran en la Figura 4-1

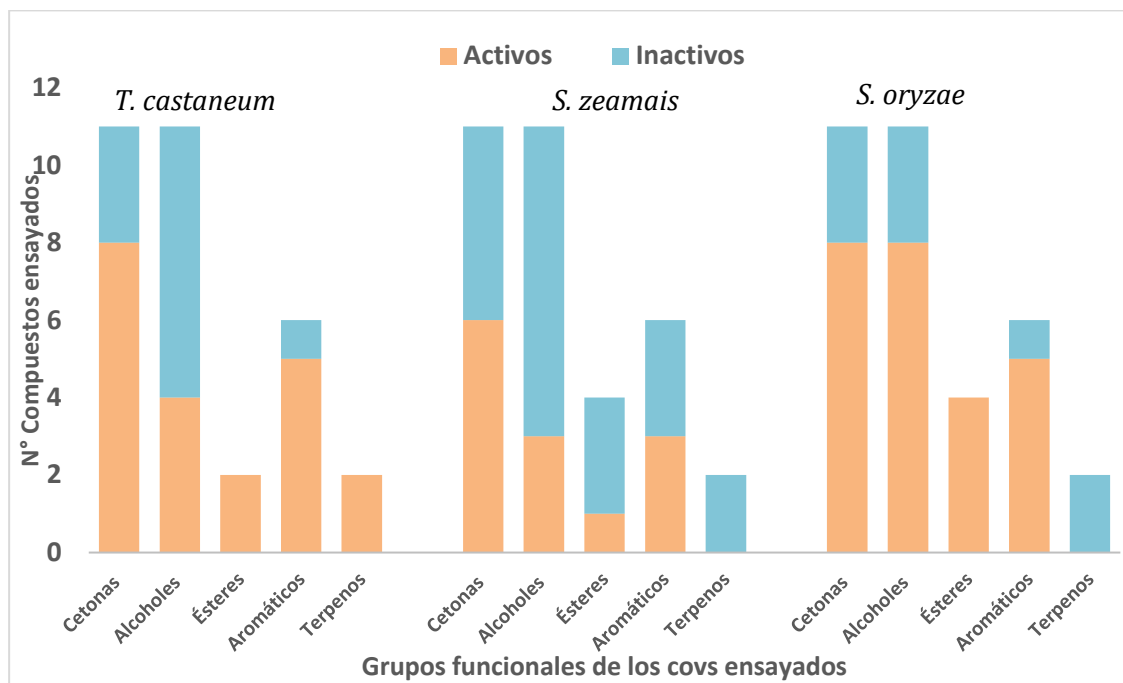


Figura 4-1. Número de compuestos activos por grupo funcional para *T. castaneum*, *S. zeamais* y *S. oryzae*.

En la Figura 4-1 se muestra cual es la influencia del grupo funcional del compuesto que se está ensayando respecto a si se clasifica como activo o inactivo en cada especie de insecto. En general se ve que los compuestos que presentan grupo funcional cetona son activos ya que en los 3 insectos la barra correspondiente a activos representa más de la mitad de todas las cetonas ensayadas, el caso de los alcoholes si presenta algunas diferencias en el número de alcoholes activos ya que para los insectos *T. castaneum* y *S. zeamais* son menos de 4 alcoholes activos de los compuestos presentan una actividad preliminar. De los 4 compuestos que pertenecen al grupo de los ésteres se consideraron todos activos preliminarmente en los insectos *T. castaneum* y *S. oryzae*, pero para *S. zeamais* solo uno de estos fue activo. Los compuestos aromáticos presentaron muy buenos resultados de actividad para los insectos *T. castaneum* y *S. oryzae*, pero para *S. zeamais* solo la mitad del número total de los compuestos, y por último el grupo de compuestos de terpenos identificados en este trabajo solo presentaron actividad en los insectos *T. castaneum*.

En general, los grupos de compuestos que presentaban una buena actividad en *T. castaneum* la presentaban en *S. oryzae*. Para el caso *S. zeamais* ningún grupo supero la mitad de los

compuestos activos, lo cual apoya la discusión anterior acerca de que se requieren concentraciones más altas para generar la muerte de dicho insecto.

Tabla 4-2. Concentración letal 50 (LC₅₀) para los compuestos activos de la fase preliminar en los insectos *T. castaneum*, *S. zeamais*, *S. oryzae*

Compuesto	<i>T. castaneum</i>	<i>S. zeamais</i>	<i>S. oryzae</i>
Cetonas			
5-metil-2-hexanona	98,1(70,4-13,18)	83,3(72,2-95,3)	32,5 (28,5-37,4)
2-decanona	163,5(63,5-430,2)	-	-
2-nonanona	81,7(68,7-96,3)	251,1(213,0-229,3)	52,9(46,9 -59,2)
2-heptanona	97,8(84,8-112,9)	82,2(68,9-99,2)	27,9(24,6-32,0)
2-pentanona	155,2(118,1-201,7)	359,1(313,3-424,6)	86,0(76,4-96,3)
4-metil-2-pentanona	-	-	65,77(58,4-73,68)
2-octanona	136,9(116,8-161,2)	276,2(230,5-331,5)	340,8(309,7-374,8)
Acetil acetona	220,3(187,5-259,2)	-	465,3(415,4-520,3)
Alcoholes			
2-n-butoxi-etanol	134,8(109,5-163,8)	84,2-(74,0-97,6)	55,1(40,7-71,5)
1-octen-3-ol	180,4(157,4-209,8)	7,6(6,2-9,2)	149,2(127,0-174,7)
Alcohol isoamílico	278,4(238,9-331,2)	261,6(217,9-319,4)	675,3(623,6-737,3)
1-hexanol	-	-	619,2(560,6-703,2)
1-octanol	-	-	433,5(394,5-480,4)
1-heptanol	-	-	517,9(465,7-589,6)
2-octanol	-	-	383,6(345-427,1)
Ésteres			
Acetato de n-butilo	-	-	135,1(119,2-151,9)
Acetato de isoamilo	220,6(194,3-253,9)	133,4(118,4-154,7)	411,0(363,6-469,3)
Acetato de isopropilo	-	-	622,1(567-691,9)
Benzoato de metilo	79,6(66,7-100,0)	223,4(211,3-243,2)	102,3(94,4-123,5)
Aromáticos			
Benzotiazol	33,5(19,3-36,6)	3,3(1,9-3,5)	52,0(26,1-62,4)
Alcohol furfurílico	304,5(259,5-361,4)	14,7(11,7-18,2)	44,7(38,3-52,7)
p-cimeno	131,8(109,9-158,3)	-	383,9(341,3-432,6)
cumeno	292,2(220,1-390,1)	564,0(492,1-666,5)	413,1(375,1-454,9)
Alcohol bencílico	383,9(301,9-488,7)	-	-
Terpenos			
Limoneno	136,9(116,8-161,2)	-	-
α-felandreno	155,2(135,4-175,6)	-	-
Nuvan 50EC	19,1(17,4-21,9)	12,3(11,5-12,9)	3,4(2,9-4,2)

LC₅₀ = μmol. L⁻¹aire Entre paréntesis se encuentra el rango del límite de confianza del 95%

Hasta el momento no es posible establecer un patrón de actividad biológica ya que esto solo es una primera aproximación según el grupo funcional. Para entrar a una discusión más profunda se debe tener en cuenta valores de concentración letal 50 (LC₅₀), la estructura completa del compuesto y sus propiedades fisicoquímicas. En este orden de ideas y para continuar con los

objetivos de la investigación, se redujo la concentración de todos los compuestos ya seleccionados como activos y se determinó su LC_{50} , resultados que se muestran en la Tabla 4-2.

Para el compuesto benzonitrilo, a pesar de ser uno de los más activos, no se decidió seguir ensayando después de las pruebas preliminares, ya que reportes en la literatura demuestran que es un compuesto altamente tóxico y nocivo al contacto con la piel y vapores, presenta informes de estudio carcinogénicos en células mamíferas e intoxicación de artrópodos terrestres(23). Dadas las complicaciones que presenta el compuesto no es viable que pueda funcionar como un futuro principio activo de un insecticida. Los otros compuestos no presentaban reportes de toxicidad elevada en concentraciones bajas o algunos no reportaban estudios. Sin embargo, es importante aclarar que para todos los compuestos que sean postulados como futuros insecticidas se requiere realizar ensayos de toxicidad en otros organismos y evaluar capacidades de bioacumulación, de igual forma se espera en principio que los compuestos se usen como barreras de protección en los almacenes y no lleguen a tener contacto con los granos almacenados.

Los compuestos que ya se conoce su actividad insecticida sobre el insecto *T. castaneum* como el benzotiazol tiene un reporte de LC_{50} de $25,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$, el valor encontrado por este trabajo fue de $33,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ valor que se encuentra muy cercano al ya reportado por Zhao y colaboradores en la misma investigación realizado también reportaron el compuesto 1-octen-3-ol con un valor de LC_{50} de $131,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (13), para el caso de este trabajo si reporto un valor de $180,4 \mu\text{mol.L}^{-1}$, este valor si se encuentra un poco más alto que el reportado por los autores, en algunos esta variación influye el origen del insecto, ya que en algunos casos cuando se tienen crías salvajes, es decir extraídas directamente de un silo y/o almacén a tenerlas criadas controladamente en laboratorio, los resultados pueden llegar a variar respecto a la efectividad de un insecticida(24). El compuesto α -felandreno presenta reportes de un valor de $LC_{50} = 188,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ en el caso de este trabajo fue de $LC_{50} = 155,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de igual manera a los anteriores análisis se encuentra un valor cercano al reportado por literatura, también reportan un valor de $LC_{50} = 167,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para el caso del limoneno(21), en el caso de la investigación presente se obtuvo un valor de $LC_{50} = 136,9 \mu\text{mol.L}^{-1}$ lo cual también estaría cerca, dados los resultados

obtenidos se puede inferir que los resultados si tienen concordancia con los reportes ya hechos.

Ahora bien, se quiere resaltar cual fue el compuesto que presentó la mejor actividad insecticida sobre *T. castaneum*, siendo este benzotiazol con un valores de LC_{50} 33,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, valor que representa dos veces el valor del control positivo usado actualmente Nuvan 50 ($LC_{50} = 19,1\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Los compuestos que presentaron la mejor actividad sobre el insecto *S. zeamais* fueron 1-octen-3-ol, benzotiazol y alcohol furfurílico, estos 3 compuestos con valores de LC_{50} inferiores a $15\mu\text{mol.L}^{-1}$, estos resultados son más prometedores dado que al compararlos con el valor del LC_{50} del control positivo Nuvan 50 ($LC_{50} = 12,3\mu\text{mol.L}^{-1}$), resultan están cercanos e incluso dos compuesto por debajo de este valor.

Los COVs evaluado en el último insecto *S. oryzae* presentaron resultados en los que el insecto fue el menos resistente a la acción de los COVs, ya que en éste su mayoría este moría. En la Tabla 4-2 se observa claramente que los valores de LC_{50} son mayores para dicho insecto y adicional a esto algunos de esos compuestos no presentaron actividad en los otros insectos, por tal razón se podría decir que quizás se debió usar un valor más alto de concentración para obtener una respuesta positiva en los demás. Con respecto a los compuestos con mejor actividad están 5-metil-2-hexanona, 2-heptanona y alcohol furfurílico, con valores de LC_{50} inferiores al $50\mu\text{mol.L}^{-1}$, en este caso el control tiene el valores más bajo de LC_{50} con respecto a los obtenidos en los otros ensayos siendo este $3,4\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Se tienen varias compuestos con grupo funcional cetona activas en los 3 insectos con valores bajos de LC_{50} , adicional a esto los compuesto son metilcetonas, estas presentan reportes de actividad insecticida y acaricida contra otros targets(25), lo cual podría inferir poseen un mecanismo de acción similar.

El compuesto que posee la mejor actividad en las tres especies fue el benzotiazol dado sus bajos valores de LC_{50} y su cercanía con el control, dicho compuesto puede ser pensado en propuesta para el control de los tres insectos.

Como se evidencia todos los resultados de la Tabla 4-2 son variables y estos van a depender netamente del insecto que se esté ensayando, las propuestas de compuestos como futuros principios activos de insecticidas comerciales que se han hecho aún no han tenido en cuenta los valores de toxicidad en otras especies, así que sería relevante realizar ensayos con los compuestos en diferentes modelos biológicos. También evaluar el posible costo de producción de los compuestos y por último si cabe la posibilidad evaluar mezclas de estos que generen un efecto sinérgico en la actividad insecticida, con miras a tratar problemas de resistencia y disminución en las concentraciones.

4.4 Conclusiones

Los COVs identificados posteriormente en este trabajo y en trabajos anteriores son capaces de generar un efecto insecticida sobre los targets propuestos, dependiendo de la clase de compuestos y el insecto, estos pueden generar un efecto activo o inactivo en este. Los insectos *S. zeamais* fueron más resistentes a la acción de los compuestos respecto a los otros insectos, el grupo de compuestos más grande activo en los 3 insectos fue el perteneciente a las cetonas.

Los compuestos que generaron la mejor actividad insecticida sobre el insecto *T. castaneum* fueron benzotiazol, 2-nonanona y 2 heptanona con un valores de LC_{50} 33,5, 81,7 y 97,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{aire}$ respectivamente.

Para el caso el paso del insecto *S. zeamais* los compuestos más activos fueron benzotiazol, 1-octen-3-ol y alcohol furfurílico con valores de LC_{50} 3,3, 7,6 y 14,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{aire}$ respectivamente.

Por último, los compuestos más activos sobre el insecto *S. oryzae* fueron 2-heptanona, alcohol 5-metil-2-hexanona, y furfurílico con valores de LC_{50} 27,9, 32,5 y 44,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}\text{aire}$ respectivamente.

Se tienen compuestos con excelente actividad, mezclas de estos pueden llegar a ser una posible solución para combatir plagas de los insectos ya mencionados, propuestas de éstas serían la que se evidenciaron a las 48 y 72 del PMV de las bacterias en el bioensayo .

4.5 Referencias

1. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial CESAR AUGUSTO BUITRAGO GÓMEZ COORDINADOR NACIONAL DEL PROYECTO REPCar COLOMBIA MARTHA LILIANA GÓMEZ GARCÍA ASISTENTE NACIONAL DEL PROYECTO REPCar COLOMBIA [Internet]. 2004 [cited 2019 Feb 26]. Available from: www.minambiente.gov.co
2. Ramírez JA, Lacasaña M. Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición [Internet]. Vol. 4, Arch Prev Riesgos Labor. 2001 [cited 2019 Feb 26]. Available from: https://www.invima.gov.co/images/pdf/intranet/Dir_operaciones/review_plaguicidas.pdf
3. Ferreira M, Cantrell C, Duke S, Ali A, Rosa L. New Pesticidal Diterpenoids from *Vellozia gigantea* (Velloziaceae), an Endemic Neotropical Plant Living in the Endangered Brazilian Biome Rupestrian Grasslands. *Molecules* [Internet]. 2017 Jan 21 [cited 2017 May 8];22(1):175. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28117710>
4. Leyva M, Marquetti C, Tacoronte JE, Scull R, Tiomno O, Mesa A, et al. Actividad larvicida de aceites esenciales de plantas contra *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). *Rev Biomed* [Internet]. 2009 [cited 2017 May 1];20:5–13. Available from: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revbio/bio-2009/bio091b.pdf>
5. Lee J-W, Jin C-L, Jang KC, Choi G-H, Lee H-D, Kim JH. Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction. *J Agric Chem Environ* [Internet]. 2013 [cited 2018 Aug 29];2(4):81–5. Available from: <http://dx>.
6. Aqil F, Zahin M, El Sayed KA, Ahmad I, Orabi KY, Arif JM. Antimicrobial, antioxidant, and antimutagenic activities of selected marine natural products and tobacco cembranoids. *Drug Chem Toxicol* [Internet]. 2011 Apr 12 [cited 2017 May 25];34(2):167–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21314466>
7. Peng J, Shen X, El Sayed KA, Dunbar DC, Perry TL, Wilkins SP, et al. Marine natural products as prototype agrochemical agents. *J Agric Food Chem*. 2003;51(8):2246–52.

8. Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant Soil* [Internet]. 2005 Jan [cited 2018 Aug 29];266(1-2):77-89. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11104-005-5945-6>
9. Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Oct 10 [cited 2018 Aug 29];103(41):15196-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17005725>
10. Kanchiswamy CN, Malnoy M, Maffei ME. Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Front Plant Sci*. 2015;6(March):151.
11. Bitas V, Kim H-S, Bennett JW, Kang S. Sniffing on microbes: diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Mol Plant Microbe Interact* [Internet]. 2013;26(8):835-43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23581824>
12. Zunino MP, Herrera JM, Pizzolitto RP, Rubinstein HR, Zygodlo JA, Dambolena JS. Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus *Fusarium verticillioides* and the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *J Agric Food Chem*. 2015;63(35):7743-9.
13. Zhao L jing, Yang X nan, Li X ying, Mu W, Liu F. Antifungal, Insecticidal and Herbicidal Properties of Volatile Components from *Paenibacillus polymyxa* Strain BMP-11. *Agric Sci China* [Internet]. 2011;10(5):728-36. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927\(11\)60056-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1671-2927(11)60056-4)
14. Naranjo Gaybor SJ. Estudio de bioprospección de compuestos inhibidores de la comunicación celular (QS) como estrategia de control de agentes fitopatógenos. Universidad Nacional de Colombia; 2018 (Tesis doctoral).
15. Perez A. Extracción, Identificación y Evaluación de la Actividad Antifúngica de Compuestos Orgánicos Volátiles Liberados por *richoderma viride*. 2014. Universidad Nacional de Colombia; 2017.(tesis pregrado)

16. Carolina L, Guio C. Estudio de compuestos volátiles con actividad antifúngica a partir de bacterias de origen marino. Universidad Nacional de Colombia; 2017.(tesis pregrado)
17. Rattan RS. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Prot* [Internet]. 2010 Sep [cited 2019 Mar 22];29(9):913–20. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219410001365>
18. Nansen C, Flinn P, Hagstrum D, Toews MD, Meikle WG. Interspecific associations among stored-grain beetles. *J Stored Prod Res* [Internet]. 2009 Oct 1 [cited 2019 Mar 22];45(4):254–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022474X09000496>
19. Huang Y, Ho S-H, Lee H-C, Yap Y-L. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Stored Prod Res* [Internet]. 2002 Jan 1 [cited 2019 Mar 22];38(5):403–12. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022474X0100042X>
20. Saroukolai AT, Moharramipour S, Meshkatalasadat MH. Insecticidal properties of *Thymus persicus* essential oil against *Tribolium castaneum* and *Sitophilus oryzae*. *J Pest Sci* (2004) [Internet]. 2010 Feb 2 [cited 2019 Mar 22];83(1):3–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10340-009-0261-1>
21. Prieto Rodríguez JA. Estudio fitoquímico de *Compsonaura capitellata* (Myristicaceae), *Zanthoxylum rigidum* (Rutaceae) y *Ocotea longifolia* (Lauraceae) y evaluación de su posible aplicación como biocontroladores de *Sitophilus* sp. Bogotá; 2012. 256 p (Tesis doctoral).
22. Khani A, Asghari J. Insecticide Activity of Essential Oils of *Mentha longifolia* *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* Against Two Stored Product Pests, the Flour Beetle, *Tribolium castaneum*, and the Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus*. *J Insect Sci* [Internet]. 2012 Jul 1 [cited 2019 Mar 22];12(73):1–10. Available from: <https://academic.oup.com/jinsectscience/article-lookup/doi/10.1673/031.012.7301>
23. Phenylacetone nitrile - Registration Dossier - ECHA [Internet]. [cited 2019 Feb 28]. Available from: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered->

dossier/10522/6/4/3

24. Alemán J. CN de SA, Richards, M.L.; Ministerio de la Agricultura SV and TG, Plana L. CN de SA, Llanez, G.; Centro de Referencia Nacional para el Control Biológico ” Pablo Noriega” LH, Fernández M. CN de SA, Vidal, M.; Centro de Referencia Nacional para el Control Biológico ” Pablo Noriega” LH. Comportamiento de indicadores de calidad en poblaciones salvajes y de laboratorio de *Lixophaga diatraeae* Townsend (Diptera: Tachinidae).. Rev Protección Veg [Internet]. 2001 [cited 2019 Mar 22];15-9. Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=pubs.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=001447>
25. Antonious GF, Dahlman DL, Hawkins LM. Insecticidal and Acaricidal Performance of Methyl Ketones in Wild Tomato Leaves. Bull Environ Contam Toxicol [Internet]. 2003 Aug 1 [cited 2019 Feb 28];71(2):400-7. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00128-003-0178-y>

5. Recomendaciones y perspectivas

Con respecto al bioensayo implementado, se recomienda su aplicación para la evaluación insecticida de COVs frente a insectos pequeños (2-4mm).

La extracción de COVs es un reto experimental, que fue superado en este trabajo mediante el uso de condiciones estándar que pueden ser empleadas en la exploración de otros COVs de fuentes microbianas.

Este trabajo permitió identificar compuestos volátiles con actividad insecticida que deben ser evaluados en mezcla y en campo, para evidenciar su efectividad y posible obtención de un producto insecticida efectivo, económico, seguro y amigable con el medio ambiente.

Se recomienda, evaluar la actividad insecticida de otros compuestos identificados en este estudio y con otros insectos.

A. Anexo: Información adicional capítulo 2

Tabla IA2.1. Unidad formadora de colonia para el criovial de partida y unidad formadora de colonia en el bioensayo por caja de Petri.

Bacteria	UFC/mL en el criovial	UFC/caja bioensayo
PNM-5	$3,9 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
PNM-143	$2,6 \times 10^8$	$3,9 \times 10^7$
PNM-201	$2,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
PNM-149	$6,3 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$
PNM-210	$1,2 \times 10^8$	$4,0 \times 10^8$
PNM-39	$4,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$
PNM-123	$1,6 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
PNM-216	$4,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
PNM-145	$1,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
PNM-10	$2,2 \times 10^8$	$6,0 \times 10^8$
PNM-144a	$1,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$
PNM-50	$3,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$
PNM-166	$5,0 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$
PNM-106	$8,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$
PNM-208	$1,7 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$
PNM-24	$2,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
PNM-115	$1,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
IBUN-5.1	$2,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
PNM-32	$1,6 \times 10^8$	$1,8 \times 10^8$
PNM-168	$4,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$
PNM-54	$8,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^8$

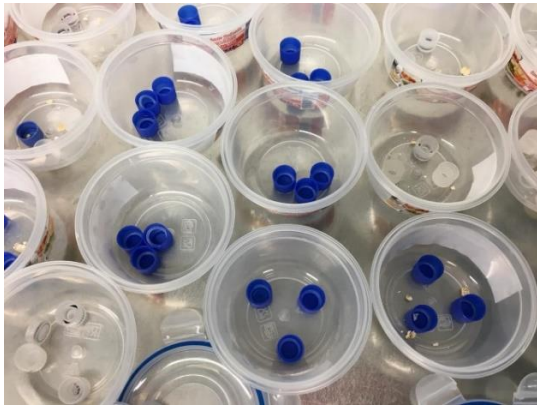
Esquema del diseño del bioensayo

Figura IA2.1 Recipientes plásticos con los soportes **Figura IA2.2** Conteo de los insectos

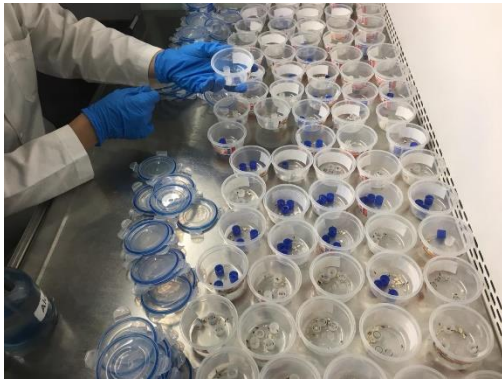
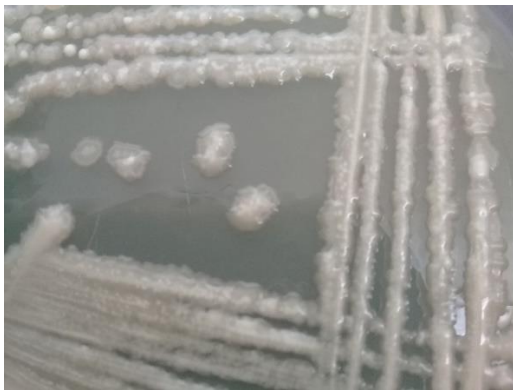


Figura IA2.3 Introducción insectos en el recipiente **Figura IA2.4** Cierre del compartimento



Figura IA2.5 Montaje de microextracción en fase sólida (SPME-HS)



Aislamiento PNM-39 (*Paenibacillus* sp.)



Aislamiento PNM-123 (*Paenibacillus* sp.)



Aislamiento PNM-143 (*Streptomyces* sp.)



Aislamiento PNM-201 (*Paenibacillus* sp.)

B. Anexo: Información adicional capítulo 3

Síntesis de 2-octanona

En un balón de 50 mL con tapa se adicionó 39 mmoles de 2-octanol y una mezcla de 56,4 mmoles de $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ en 25 mL de DCM. Se tapó y se colocó en agitación por 24 horas. Pasado el tiempo la mezcla de reacción fue puesta sobre un papel filtro el cual estaba en un embudo buchner con un erlenmeyer de desprendimiento lateral conectado a una bomba de vacío. La bomba fue encendida y la mezcla se lavó con 50 mL de éter etílico. El filtrado fue puesto en un balón de 100 mL y fue sometido a rota evaporación por 30 minutos a una presión de 250 torr, 120 rpm y 40°C. El producto final fue chequeado por GC-