



BÚSQUEDA DE ALCALOIDES EN HONGOS DE INTERÉS BIOLÓGICO

JUAN CARLOS RUIZ SAMBONÍ

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA
EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

POPAYÁN, 20 ABRIL 2007



BÚSQUEDA DE ALCALOIDES EN HONGOS DE INTERÉS BIOLÓGICO

JUAN CARLOS RUIZ SAMBONÍ

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial
Para optar el título de Químico**

Directora: M.Sc. ISABEL BRAVO REALPE

Codirector: ÁLVARO GAITAN BUSTAMANTE
Microbiólogo P.D.
Investigador Científico III.
Disciplina de Fitopatología



Nota de Aceptación

Director: _____

MSc ISABEL BRAVO REALPE

Codirector: _____

Doctor: ÁLVARO GAITAN BUSTAMANTE
CENICAFE

Jurado : _____

Doctor FABIO A CABEZAS FAJARDO

Jurado: _____

Doctor JUAN CARLOS ARGOTI

Fecha de sustentación: Popayán, Abril 20 del 2007



TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| LISTA DE TABLAS | 7 |
| LISTA DE FIGURAS | 8 |
| RESUMEN | 11 |
| 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 12 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE | 14 |
| 3.1 La Broca de las Cerezas del Café | 14 |
| 3.2 Manejo Integrado de la Broca (MIB) | 14 |
| 3.2.1 Control cultural | 15 |
| 3.2.2 Control químico | 15 |
| 3.2.3 Control biológico | 16 |
| 3.2.4 Hongos entomopatógenos | 17 |
| 3.2.3.2 Acción patogénica y periodo de infección letal | 17 |
| 3.2.3.2 <i>Beauveria bassiana</i> | 18 |
| 3.3 Micotoxinas | 22 |
| 3.3.1 Agentes Antitumorales y Antiviricos producidos por hongos | 22 |
| 3.4 Los alcaloides | 23 |



| | |
|---|-----------|
| 3.41 Clasificación de los alcaloides | 23 |
| 3.4.1 Alcaloides Aislados de hongos: Alcaloides del Ergot | 24 |
| 3.5 Análisis Fitoquímico Preliminar | 26 |
| 3.6 Separación de metabolitos por cromatografía en columna | 26 |
| 3.7 Análisis Instrumental | 27 |
| 3.7.1 Ultravioleta | 27 |
| 3.7.2 Infrarojo | 28 |
| 3.7.3 Espectrometría de Masas | 28 |
| 3.7.4 RMN ¹H | 28 |
| 3.7.5 RMN ¹³C | 29 |
| 4. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 4.1 Ubicación | 30 |
| 4.2 Materiales | 30 |
| 4.2.1 Medio de Cultivo | 30 |
| 4.2.2 Rotavapor | 30 |
| 4.2.3 Liofilizador | 30 |
| 4.2.4 Agitador Mecánico | 30 |
| 4.2.5 Cromatógrafo de Gases/Masas | 30 |
| 4.2.6 Viales | 30 |
| 4.3 Obtención del micelio de las dos cepas | 31 |
| 4.4 Extracción de metabolitos | 31 |
| 4.5 Análisis Fitoquímico Preliminar | 32 |
| 4.6 Extracción y Purificación | 33 |
| 4.6.1 Cromatografía en Columna | 33 |
| 4.6.2 Cromatografía en capa fina | 34 |



| | |
|--|-----------|
| 4.6.2.1 Revelado del Trabajo Fitoquímico | 34 |
| 4.6.3 HPLC | 34 |
| 4.6.4 Cromatografía en Capa Fina con Patrones | 34 |
| 4.6.5 Análisis del Contenido de Micotoxina por HPLC | 34 |
| 4.6.6 Análisis de los Extractos por CG/EM | 35 |
| 4.6.6.1 Determinación del flujo según curva de Van Deemter | 35 |
| | |
| 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS | 37 |
| 5.1 Obtención del Micelio de las cepas | 38 |
| 5.2 Análisis Fitoquímico Preliminar | 38 |
| 5.3 Separación Metabolitos Secundarios por Cromatografía en Columna | 46 |
| 5.4 Análisis del Contenido de Micotoxina Mediante HPLC | 49 |
| 5.4.1 Cuantificación de la Micotoxina por HPLC | 49 |
| 5.5 Análisis de la Curva de Van Deemter | 55 |
| 5.6 Análisis de Muestras por CG/EM | 56 |
| | |
| 6. CONCLUSIONES | 63 |
| | |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 65 |



LISTA DE TABLAS

| | Página |
|--|---------------|
| TABLA 1. Extracciones del Micelio | 38 |
| TABLA 2. Extractos en medio líquido | 39 |
| TABLA 3. Extracciones de Micelio, cultivado nueve días | 39 |
| TABLA 4. Resultados de R_f en cromatografía en capa fina | 47 |



LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|---|---------------|
| FIGURA 1. Estructura de la Beauvericina | 20 |
| FIGURA 2. Estructura de la Oosporeina | 21 |
| FIGURA 3. Estructura de la Bassianolida | 21 |
| FIGURA 4. Estructura Ocratoxina A | 23 |
| FIGURA 5. Núcleo Ergolina | 24 |
| FIGURA 6. Estructura Ácido Lisérgico | 25 |
| FIGURA 7. Estructura Ergotamina, Ergosin, Ergovalina | 25 |
| FIGURA 8. Núcleo Ergolina en el U.V. | 27 |
| FIGURA 9. RMN ¹H de una Aporfina | 30 |
| FIGURA 10. Micelio cepa Bb9205 | 32 |
| FIGURA 11. Micelio cepa Bb 9024 | 41 |
| FIGURA 12. Estructura del Oxyoduro Mercuriamónico | 40 |
| FIGURA 13. Matriz de Bb 9024 | 41 |
| FIGURA 14. Cristales de Ácido Pírico | 42 |
| FIGURA 15. Bb 9024 + Ácido Pírico | 42 |



| | |
|--|-----------|
| FIGURA 16. Bb 9205 + Ácido Pírico | 43 |
| FIGURA 17. Reacción de Urk | 43 |
| FIGURA 18. Micelio, extracto CH₂Cl₂ Bb 9205 | 44 |
| FIGURA 19. Vista posterior de los tubos con reactivos para Alcaloide | 44 |
| FIGURA 20. Micelio extracto Etanólico B.b.9024 | 45 |
| FIGURA 21. Vista posterior de el extracto Etanólico Bb 9024 | 45 |
| FIGURA 22. Corrido de los extractos a diferentes mezclas de solventes | 46 |
| FIGURA 23. Cromatograma en C.C.D. de extractos de las cepas | 47 |
| FIGURA 24. Cromatograma Patrón Beauvericina 0.1 µg/mL | 49 |
| FIGURA 25. Cromatograma Patrón Beauvericina 0.25 µg/mL | 50 |
| FIGURA 26. Cromatograma Patrón Beauvericina 0.5 µg/mL | 50 |
| FIGURA 27. Cromatograma Patrón Beauvericina 0.75 µg/mL | 51 |
| FIGURA 28. Cromatogrma Fracción de B.b. 9205 | 51 |
| FIGURA 29. Cromatograma Fracción de B.b. 9024 | 52 |
| FIGURA 30. Unión inicial de las cepas B.b. 9205 y B.b. 9024 | 53 |
| FIGURA 31. Curva de Calibración de la Beauvericina | 54 |
| FIGURA 32. Curva de Van Deemter para la columna DB5 | 56 |



| | |
|--|-----------|
| FIGURA 33. Cromatograma del medio líquido Bb 9205 | 57 |
| FIGURA 34. Espectros de masas de los principales esteroides | 58 |
| FIGURA 35. Cromatograma de el micelio de Bb 9024 | 59 |
| FIGURA 36. Cromatogramas micelio de cepas Bb 9205 y Bb 9024 | 59 |
| FIGURA 37. Membrana plasmática | 68 |



RESUMEN

El control biológico del insecto broca del café, *Hypothenemus hampei*, con el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, en el programa de manejo integrado de la broca en CENICAFE, tiene como requerimiento la obtención de formulaciones biológicas que presenten una adecuada eficiencia en condiciones de campo. Para esto es indispensable el conocimiento bioquímico de la composición de las esporas por medio de las cuales se reproduce.

Para que el hongo ataque la broca, sus esporas deben entrar en contacto con el cuerpo del insecto, reproducirse mediante el micelio y en ese momento generar la muerte de la plaga. Finalmente bajo condiciones de alta humedad produce sus cuerpos fructíferos sobre el cuerpo del insecto y dispersa las conidias para ampliar su infección a otras poblaciones que se encuentran en los cafetales.

El *B.bassiana* produce la beauvericina, una toxina bioactiva de naturaleza peptídica, a la que se le atribuyen propiedades insecticidas y antimicrobiales. Este ciclo péptido juega un papel importante en la patogenicidad de *Beauveria bassiana*, dado que al parecer, determina la capacidad real del hongo para afectar de manera negativa al insecto y bloquear sus mecanismos de respuesta inmunológica.

Los metabolitos secundarios juegan un papel importante según su acción biológica, ya que pueden actuar dependiendo de la clase de compuesto como fitotóxicos, insecticidas, antibacteriales y fungicidas; también como precursores de otros compuestos como vitaminas y provitaminas.

Por lo tanto la identificación de diferentes metabolitos secundarios en el hongo permitirá tener un criterio para la selección de esporas de alta calidad. Además la determinación de su estructura química será de gran utilidad para la realización de estudios posteriores sobre los mecanismos de adherencia de la espóra *Beauveria bassiana* a la cutícula del insecto.

Por las razones anteriores, CENICAFE adelanta un programa de investigación de control biológico de la broca del café dentro del cual se enmarca este proyecto en donde se plantea como objetivo primordial el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios tales como la micotoxina beauvericina y ergosteroles a partir de las cepas de *Beauveria bassiana* 9205 (altamente patogénica) y 9024 (poco patogénica), sembradas a 9 días en un medio de cultivo de 10% Pectosa y 40% Glucosa.

También se plantea una nueva metodología para el aislamiento de la Beauvericina, la cual es la principal toxina responsable de la muerte de la broca. A



la vez esta técnica se aprovecha para establecer diferencias en cuanto la concentración de la micotoxina en las dos cepas.



1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cultivo del cafeto en Colombia representa un importante renglón generador de divisas y empleo rural para el país. La broca del fruto del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae), insecto introducido a Colombia en 1998, es la plaga más significativa que afecta en este momento su producción severamente, tanto en calidad como en cantidad. Ataca la cereza y se reproduce internamente en el endospermo, causando la pérdida total del grano y la caída prematura de los frutos. Actualmente infesta cerca de 800.000 hectáreas de cafeto, afectando el patrimonio de más de medio millón de familias cafeteras. ^{(1),(2)}

En diversos centros de investigación del mundo se han llevado a cabo estudios relacionados con el control biológico a través del hongo *Beauveria bassiana* el cual ataca al insecto a través de la cutícula, lugar donde germinan las esporas, que producen hifas invasoras penetrando los tejidos del hospedante. Las hifas se ramifican, colonizan y llegan hasta la cavidad homocélica, donde se produce una masa micelial por el crecimiento del hongo, y se liberan toxinas que están implicadas en el bloqueo del desarrollo fisiológico del insecto. ⁽³⁾ Sin embargo, no se conocen la totalidad de las toxinas implicada en tal proceso infeccioso. Tampoco tiene una clara comprensión del mecanismo de infección involucrado en el proceso de patogenicidad que explique las diferencias encontradas en CENICAFE en estudios realizados con diferentes cepas de este hongo

Hipótesis de trabajo:

El estudio químico o el conocimiento total de las estructuras de todas las toxinas generadas por el Hongo *Beauveria bassiana*, contribuirá al conocimiento y comprensión del mecanismo de infección, involucrado en el proceso de patogenicidad sobre la broca del café, pudiendo ser utilizados para seleccionar y producir masivamente aislamientos eficientes en el campo, como alternativa de control biológico en programas de manejo integrado de la plaga (MIB).



2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

- Aislar y estudiar las estructuras química de metabolitos producidos por el hongo *Beauveria bassiana*.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1. Evaluar si en los metabolitos producidos por el hongo *Beauveria* existen alcaloides u otro tipo de metabolitos secundarios que expliquen la diferencia de patogenicidad entre las dos cepas.

2.2.2. Determinar si hay relacion con la diferencia de patogenicidad sobre la broca del café encontrada entre las cepas 9205 y 9024



3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

3.1 La Broca de las Cerezas del Café

Hypothenemus hampei (ferrari) (Coleoptera: Scolitydae), es un insecto originario de África Ecuatorial, descubierto por J. A. Graft ferrari en 1867⁽⁴⁾ y es considerado como la plaga que mayor daño causa al cultivo del café en el mundo.⁽⁵⁾ La biología del insecto ha sido estudiada por diferentes autores. Es un insecto de hábitos gregarios⁽⁶⁾ cuya hembra fecundada perfora los frutos por el ostiolo⁽²⁾, y construye en el endospermo una cámara de postura.⁽⁷⁾ El insecto inicia la oviposición cuando el fruto alcanza un 20% de peso seco,⁽⁸⁾ en frutos de 100 a 150 días de desarrollo.⁽²⁾

Entre los 105 y 120 días de desarrollo del fruto, se prepara una relación directa entre peso seco del fruto y el nivel de infestación por broca.⁽⁹⁾ Durante los periodos secos el insecto no abandona los frutos, generando una gran descendencia que emerge una vez inician las lluvias (Centro Nacional de Investigaciones del Café, 1998).

3.2 Manejo Integrado de la Broca (MIB)

Según la organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), el manejo integrado de plagas MIP, es: "Un sistema de manipulaciones de las plagas que, en el contexto del ambiente relacionado y dinámica de población de la especie dañina, utiliza todas las técnicas y métodos apropiados de la manera más compatible posible y mantiene la población de la plaga a niveles inferiores a los que causarían daño económico".⁽¹⁰⁾

El programa del manejo integrado de la broca desarrollado por Cenicafé, incluye medidas de tipo biológico, químico y cultural.⁽¹¹⁾

3.2.1 Control cultural. Aún cuando se requiere del concurso de diferentes medidas para un manejo satisfactorio de la broca del café, el control cultural podría considerarse un pilar fundamental en el Manejo Integrado de Plagas,



mediante labores que empíricamente constituyen un 80% del éxito en el control global de la plaga, ⁽¹¹⁾ están dirigidas a minimizar la disponibilidad de alimento y refugio para la plaga, ⁽¹²⁾ e incluyen para el caso de la broca las siguientes prácticas: Registro de floraciones, ubicación de los sitios de cafetal con mayor daño (focos), manejo de focos, ataque de frutos caídos al suelo, precaución de frutos cosechados de focos y control del escape de adultos en labores de cosecha y postcosecha. El Re-Re, la práctica que más se destaca, consiste en mantener los cafetales sin frutos maduros, sobremaduros ni secos. ⁽¹³⁾

3.2.2 Control químico. El control de la broca mediante el uso de insecticidas debe ser considerado como una estrategia dentro del MIB (manejo integrado de la broca). ⁽¹⁵⁾ Su uso debe hacerse solo cuando las poblaciones de la broca causen infestaciones superiores al 2% en la época crítica del fruto verde y cuando el porcentaje de brocas vivas en posiciones A+ B supere el 50%.⁽¹⁾ Las aplicaciones deben ser dirigidas a adultos en el momento en que estos emergen de los frutos y vuelven a producir nuevas infestaciones, esto es, cuando las brocas han iniciado la perforación de la pulpa pero no del endospermo.

Desde la segunda década de el siglo pasado, se vienen realizando evaluaciones de productos para el control de la broca. ⁽¹⁶⁾ Estudios adelantados por CENICAFÉ en los que se evaluaron 35 formulaciones de insecticidas para el control de la broca, demuestran que existen sustitutos de menor peligrosidad (categoría III) y tan eficaces como el endosulfan; estos son basados en los ingredientes activos: pirimifos metil, fenitrothion, clorpirifos y fention. En lo referente a la residualidad de estos productos, ninguno mostró efectos después de los 7 días. ⁽¹⁷⁾ Se considera un insecticida ideal para el control de la broca aquél que siendo de categoría toxicológica III ó IV, sea altamente eficaz sobre adultos, que no deje residuos en los frutos ni en el ambiente, que sea selectivo y compatible con las demás medidas de control. ⁽¹⁾

Los insecticidas organoclorados como el endosulfan, se consideran venenos potentes pero de gran impacto ambiental, se clasifican en DDT y sus derivados, ciclodienos y hexaclorociclohexanos. Todos actúan sobre la transmisión axonal en el sistema nervioso central, son químicamente inertes, lipofílicos y no sistémicos. Los hay de contacto y por ingestión, en general muy persistentes.

Los insecticidas organofosforados como el clorpirifos, fenitrothion y metil pirimifos, constituyen el grupo más grande de insecticidas y los más ampliamente usados en el mundo (aproximadamente un 45 % del mercado), se derivan del ácido fosfórico. Estos insecticidas son inhibidores de la colinesterasa, algunos actúan por ingestión, otros por contacto y muchos presentan acción traslaminar y/o sistemática. Son más biodegradables que los organoclorados y presentan corto efecto residual, generalmente de una semana. ⁽¹⁸⁾



3.2.3 Control biológico. El uso racional de insecticidas y la biodiversidad que caracteriza el agroecosistema cafetero en Colombia, ha permitido el desarrollo de una fauna benéfica que ha mantenido en equilibrio ataques esporádicos de insectos chupadores, defoliadores y minadores. ⁽¹⁾ La política de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, con respecto a las plagas, tiene como fundamento disminuir el impacto económico que estas pueden causar a los caficultores y defender a largo plazo el bienestar agroecológico. ⁽¹⁹⁾ Es por ello y por las condiciones de manejo y ambientales en que se desarrolla la caficultura colombiana, por lo cual Cenicafé ha diseñado una estrategia de Manejo Integrado de la Broca (MBI) con énfasis en el control biológico. ⁽¹⁾

El control biológico representa la alternativa más recomendable para la regulación de la broca sin que se amenace el equilibrio del ecosistema cafetero, ⁽²⁰⁾ considera este control como un complemento dentro del MIB a la actividad del Re-Re. El entomopatógeno *B.bassiana* y los parasitoides *P.nasuta*, *C. sthephanoderis*, *Heterospilus coffeicola* (Schmiendeknecht) y *P. coffea* son considerados en el sitio de origen de la broca como sus enemigos naturales mas importantes. En 1990 se presenta una lista de los enemigos naturales de la broca registrados en diferentes regiones del mundo, la detallan para Colombia donde se registran 17 reguladores biológico de la plaga: 8 entomopatógenos, 1 parasitoide y 8 depredadores, 7 grupos de organismos compiten por el nicho de la misma. ⁽¹⁾

Desde la llegada de la broca al país, la Federación Nacional de Cafeteros inició un programa de investigaciones en control biológico con la introducción de parasitoides, el desarrollo de un micopesticida a partir de *B. bassiana* y la búsqueda de alternativas de insecticidas de menor categoría toxicologica a las existentes en el mercado. Con el fin de evaluar sus posibilidades dentro de un programa de MIB, fueron introducidos al país los parasitoides *Cephalonomia sthephanoderis* Betrem en diciembre de 1989, *P. nasuta* en diciembre 1990 y *Phymastichus coffea* La Salle en diciembre de 1991. ⁽²¹⁾

3.2.3.1 Hongos entomopatógenos. Aunque el conocimiento del uso de hongos entomopatógenos para el control de las plagas es antiguo, solo en los últimos años ha recibido mayor atención. El promotor de la patología de insectos fue Agustino Bassi, quien en 1934 realizó un estudio sobre el agente causal de la enfermedad conocida como muscardina blanca del gusano de seda, y que fuera denominada *B. bassiana* por Vuillemin en 1912. Los hongos entomopatógenos son considerados como una herramienta importante en programas de MIP que tengan como finalidad la preservación del medio ambiente y la racionalidad en el uso de insecticidas químicos. Es así como se considera que *B. bassiana* y



Metarhizium anisopliae (Metschnikoff) Sorokin pueden jugar un papel muy importante en el control de *H. Hampei* bajo condiciones de los ecosistemas permanentes con sombrero o autosombrero del café, que protegen al hongo de los rayos solares, al tiempo que garantizan adecuadas humedades relativas. ⁽²²⁾

3.2.3.2 Acción patogénica y periodo de infección letal. Después de la penetración, el hongo prolifera dentro del cuerpo del hospedero. El resultado de la infección depende del potencial genético del patógeno para crecer rápidamente luego de penetrar la berrera del hospedero y de su resistencia a químicos tóxicos. ⁽²³⁾

Estas cualidades pueden estar relacionadas con la defensa del hospedero y la velocidad o magnitud de la respuesta inducible. La inmunidad del insecto es un área poco estudiada y se tiene poco conocimiento de cómo el insecto reconoce un hongo para que se inicie la respuesta inmune del insecto.

En los insectos se han descrito factores aislados que estimulan la fagocitosis, reducen los plasmotocitos, estimulan la formación de nódulos, y movilizan hemocitos. Una opsonina (galactosa unida a una lectina), por ejemplo, induce el reconocimiento celular de las blastosporas en la hemolinfa de *Nomuraea rileyi*. ⁽²⁴⁾

La principal defensa celular del insecto contra el hongo es la encapsulación y la melanización rápida. Durante la encapsulación, los granulocitos del insecto son atraídos por el hongo, después los plasmotocitos se reúnen y forman un pseudotejido en capas concéntricas, de este modo se diferencia un granuloma en el cual pueden ser degradados los hongos.

El desarrollo exitoso de *B. bassiana* dentro del hospedero se basa en que el hongo vence la respuesta del hemocito y el número de granulocitos se reduce fuertemente tres días después del ataque. ⁽²⁵⁾ *M. anisopliidae* produce sustancias inmunodepresivas, tales como la destruxina E, que inhibe la formación de nódulos por parálisis de los hemocitos. Aunque las reacciones celulares contra hongos están documentadas, las respuestas de inmunidad hacia los mecanismos de hongos en insectos no están muy claras.

Los factores antifúngicos además de los inhibidores de proteasas pueden presentarse en la hemolinfa de insectos afectados y prevenir las infecciones letales encontraron componentes tóxicos en la cutícula de los insectos, con efectos negativos sobre la germinación y el crecimiento de *B. bassiana*. ⁽²⁶⁾



3.2.3.2. *Beauveria bassiana*. Este hongo presenta un alto polimorfismo de la expresión de su potencial genético, lo que hace fácilmente adaptable a diversas condiciones bióticas y abióticas del desarrollo y reproducción. ⁽²⁷⁾

Este microorganismo infecta cerca de 200 especies de diferentes órdenes de insectos, tanto en zonas templadas como tropicales. En Colombia se ha registrado en diferentes géneros del orden Lepidoptera, Coleoptera, Himenoptera y Hemiptera. ⁽²⁸⁾

Debido a la importancia económica potencial de este género como agente de control biológico y productor de nuevos metabolitos tóxicos, su taxonomía es de interés práctico. *Beauveria bassiana* se ha encontrado naturalmente afectando la broca. El hongo sólo es efectivo para el control de la broca cuando el insecto al tratar de penetrar los frutos, entra en contacto con las conidias. ⁽²²⁾

A medida que incrementa la dosis del hongo sus efectos son mayores sobre la broca. La dosis más eficaces están entre 1×10^8 y 1×10^9 esporas / árbol, donde unas dosis de 5×10^8 esporas/ árbol se considera apropiada desde el punto de vista económico y de eficacia. ⁽⁵⁾

Al evaluar diferentes aislamientos de *B. bassiana* sobre la broca del café, encontró que Bb 9212 y Bb 9205 son los que mas rápidamente causan mortalidad a la broca, lo que ocurre en un tiempo promedio de 2,63 +/- 0.79 y 4,16 +/-1,14 días respectivamente. Sintomatológicamente, la micosis por el género *Beauveria* se caracteriza además de los movimientos lentos de la broca (larva o adulto), por reducciones en el apetito y en la oviposición, presentándose una momificación paulatina. A las 48 horas después de ocurrida la invasión, el hongo circula en la hemolinfa y desarrolla su micelio al interior del insecto sin que las células sanguíneas puedan detener la infección; el hospedero muere por la producción de micotoxinas, acción histolítica, bloqueo mecánico del aparato digestivo y otros daños físicos debido al crecimiento micelial interno. El hongo segrega un gran rango de metabolitos tóxicos, lo cual lo hace muy estudiado en cuanto a patogenicidad, por ser fuente de metabolitos secundarios.

El hongo entomopatógeno *B. bassiana* ha sido utilizado como agente microbial de control de muchas plagas de insectos y enfermedades ocasionadas por bacterias en muchas partes del mundo. La especie *B. bassiana* se utiliza comercialmente en Rusia con el nombre de Boverina, para combatir el escarabajo de la patata (*L. decollineata*) y el gusano de las manzanas y peras (*Cydea pommonella*). En China, se produce, en pequeñas instalaciones, para comunas y se usa contra las plagas del maíz *Ostrinia nubilalis* y del pino *Dendrolimus punitatus*. En Estados Unidos se experimenta en gran escala contra el escarabajo de la patata y el *Ostrinia furnacalis*, y en Suiza contra larvas de *Melolontha*. ⁽²⁹⁾

Figura 2: Estructura de la Oosporeina

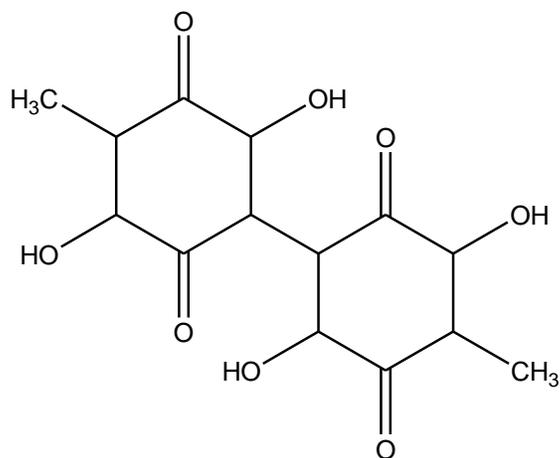
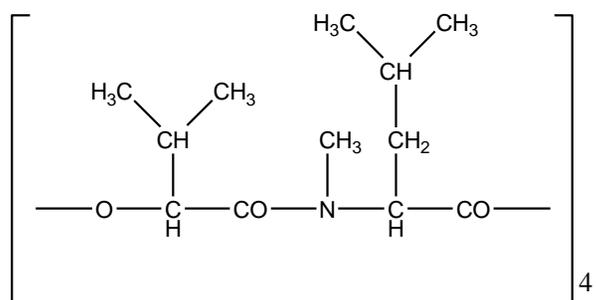


Figura 3. Estructura de la Bassianolida



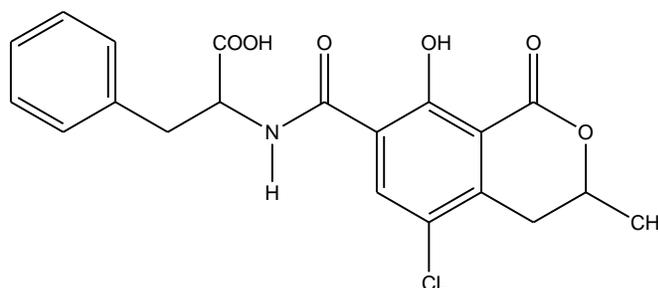
3.3. MICOTOXINAS.

Ciertas especies fúngicas son capaces de producir unos metabolitos secundarios con carácter tóxico llamadas micotoxinas. Los metabolitos o micotoxinas de estos hongos al ser ingeridas causan síntomas tóxicos o carcinogénicos en hongos o en animales. Hongos micotoxigénicos han sido aislados de muchos alimentos que están sometidos a deterioros por hongos. Los principales géneros de hongos asociados con la producción de micotoxinas incluyen especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps*, *Alternaria*, *Pithomyces*, *Stachybotrys* y *Phoma*.

3.3.1. Agentes Antitumorales y Antivíricos producidos por hongos. Los antibióticos en virtud de los efectos dramáticos sobre bacterias e infecciones de hongos, han revolucionado la medicina. Sin embargo, nos encontramos todavía en la necesidad urgente de una cura para la mayor parte de los cánceres así como de un agente antiviral, no tóxico, auténticamente efectivo.

Las micotoxinas como la Ocratoxina A (Figura 4), producida por *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasitus*, aunque son carcinogénicas, paradójicamente tienen efectos antitumorales débiles. Las micotoxinas llamadas esterigmatocistinas producidas por *A. vesicular*, aunque carcinogénicas son mucho menos tóxicas que las aflatoxinas y tienen actividades inhibitorias significativas sobre leucémias implantadas a ratones. Las micotoxinas verrucarinas y roridinas aisladas de especies de *Myrothecium* también tienen fuerte actividad antifúngicas e inhiben el crecimiento de varios sarcomas experimentales en ratones. ⁽³⁰⁾

Figura 4: Estructura de la Ocratoxina A





3.4. LOS ALCALOIDES

Los alcaloides son bases nitrogenadas, presentes en las plantas, que fundamentalmente producen respuestas fisiológicas al ser administradas a los animales. Son el resultado del metabolismo de aminoácidos; su principal función es reguladora y de protección a la planta contra insectos y parásitos.

En general no existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado, derivados generalmente de aminoácidos, mas o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación. ⁽³¹⁾

3.4.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ALCALOIDES

Habitualmente los alcaloides se han clasificado en función de su estructura, distinguiéndose principalmente los compuestos heterocíclicos de los no heterocíclicos, actualmente existen varias formas de clasificarlos.

De acuerdo a sus propiedades farmacológicas.

De acuerdo a su distribución botánica.

De acuerdo a su origen biosintético.

En cuanto su origen biosintético, se pueden agrupar todos los alcaloides naturales conocidos por ser originarios por un restringido número de aminoácidos o de precursores biogénicos. Esta aproximación biogénica es indispensable como ayuda quimiotaxonómica y esta aplicada especialmente para la química estructural en asignaciones de posiciones oxigenadas y para la síntesis biomimética de sustancias. ⁽³¹⁾

Se pueden distinguir:

Alcaloides alifáticos

Derivados de la ornitina (pirrolidinas, tropánicos, pirrolizidínicos).

Derivados de la lisina (piperidinas, quinolizidínicos).

Alcaloides aromáticos

Derivados del ácido nicotínico (piridinas).

Derivados de fenil alanina y tirosina (isoquinoleinas)

Derivados del triptófano (indólicos, quinoleinas)

Derivados de la histidina (imidazoles)

Alcaloides de origen diverso

Alcaloides terpénicos y esferoidales.

Alcaloides diversos (purinas, macrocíclos etc). ⁽³¹⁾

3.4.1. Alcaloides Aislados de hongos: Alcaloides del Ergot. Durante la edad media existía una frecuente enfermedad epidémica, a la cual se le dio el nombre de fuego santo o fuego de San Antonio. Los pacientes sufrían de gangrena, convulsiones calambres y alucinaciones.

La presencia de estos síntomas se relacionó pronto con el consumo de pan de centeno que había sido contaminado con ergot, el esclerocio negro del hongo *Claviceps purpurea*. El principal efecto de los alcaloides es, en primer lugar, de tipo simpático que resulta de la inhibición de las hormonas adrenalina, noradrenalina y esclerotina, lo que causa la dilatación de las venas y un descenso de la presión sanguínea.

Los alcaloides del ergot tienen una estructura característica, la ergolina, que consiste en un sistema de anillos tetracíclicos que contiene el indol (Figura 5). Hay dos grupos de alcaloides que pueden ser incluidos, bien en el tipo ácido lisérgico (Figura 6) o en el tipo de la clavina, dependiendo de las sustituciones de la ergolina. La ergotamina (Figura 7) fue el primer alcaloide que se extrajo del ergot y subsecuentemente se convirtió en el más utilizado de estos agentes terapéuticos. ⁽³⁰⁾

Figura 5: Núcleo Ergolina

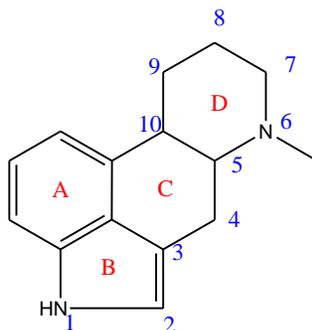


Figura 6: Acido Lisérgico

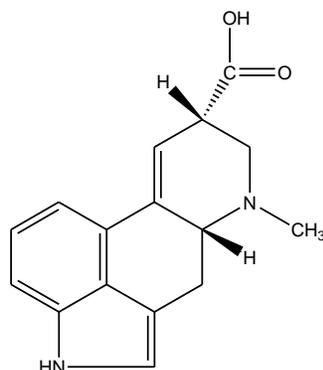
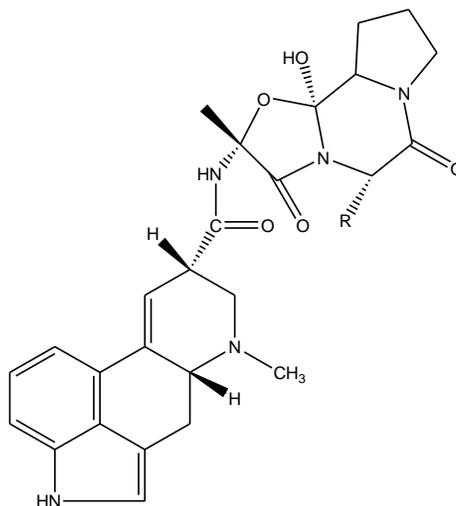


Figura 7 Estructura de la Ergotamina



3.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

La prueba fitoquímica preliminar es una prueba química de caracterización, consistente en una reacción química que produce alteración rápida en la estructura molecular del compuesto, por ejemplo la modificación de un grupo funcional, la apertura de un sistema anular, la formación de un aducto o un complejo, lo cual da por resultado una manifestación sensible como el cambio de color, la formación de un precipitado o el desprendimiento de un gas. ⁽³²⁾



Un ejemplo de este tipo de pruebas esta relacionado con los alcaloides, los cuales presentan reacciones, coloridas con ciertos reactivos como:

Reactivo de Mayer, forma precipitado color blanco.

Reactivo de Wagner, forma precipitado color marrón.

Reactivo de Schleiber, forma cristales amorfos de coloración café.

Reactivo de Urk, genera una coloración azul o violeta.

Reactivo de Dragendorff, forma precipitados naranja- marrón.

La gran mayoría de estas pruebas están asociadas a la interacción con el nitrógeno de este tipo de compuestos.

3.6 SEPARACIÓN DE METABOLITOS POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA.

En la cromatografía en columna, el sólido adsorbe pequeñas capas de moléculas de componente sólido de una mezcla. Por cromatografía líquido –sólido pueden separarse dos solutos que difieran en coeficientes de adsorción hacia cierto sólido. Esta cromatografía emplea un líquido, fijado por adsorción a manera de película fina, sobre un soporte sólido. La película adherida se comporta como una fase líquida estacionaria y la mezcla que se agregue para separar, se distribuirá entre las dos fases líquidas: la de la película y la del solvente.

Los absorbentes comúnmente utilizados son oxido de aluminio (Al_2O_3), para compuestos no polares o de polaridad media y sílica gel ($SiO_2 \cdot H_2O$) para compuestos orgánicos polares.

Los solventes usados para desalojar los compuestos absorbidos en la columna deben hacerse progresivamente más polares. Los compuestos polares se absorben con más fuerza por las superficies de óxidos metálicos, por lo tanto, deben eluirse o lavarse de la columna con solventes polares. La velocidad de elusión debe controlarse para obtener una buena separación. ⁽³²⁾

3.7 ANÁLISIS INSTRUMENTAL.

Existen diferentes técnicas que permiten la identificación de moléculas correspondientes a los diferentes metabolitos secundarios encontrados en los hongos, tales como:

3.7.1. Ultravioleta U.V. El espectro U.V. (Ultravioleta) de los alcaloides, depende de su estructura, naturaleza, tipo y posición de los sustituyentes. Hay grupos de alcaloides que, careciendo de cromóforos, no absorben en esta región, como es el

caso de la mayoría de los alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos y algunos derivados del metabolismo terpénico.

En forma general, los alcaloides que tienen átomos con electrones solitarios, dobles o triples enlaces aislados (grupos cromóforos) absorben con cierta intensidad en la región de 150 a 200nm (ultravioleta lejano); Si hay conjugación de estos grupos, los máximos de absorción se desplazan hacia la región visible (efecto batocrómico) e incrementan la intensidad de la absorción (efecto hiperocrómico).

Los alcaloides del grupo indólico contienen el núcleo de ergolina, el cual presentan la mayoría de los alcaloides aislados de hongos, reciben gran información de sus sustituyentes cuando son sometidos a análisis con el espectro de ultravioleta, en especial sobre la parte aromática de la molécula así: Los que no tienen sustituyentes en el anillo bencénico absorben a 226 y 229 nm (Figura 8a), y los que si poseen sustituyentes muestran dos máximos hacia 245 y 295 nm (Figura 8b).⁽³¹⁾

Figura 8a: Núcleo Ergolina con sustituyentes

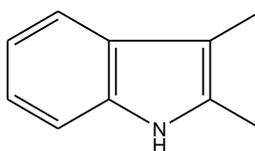
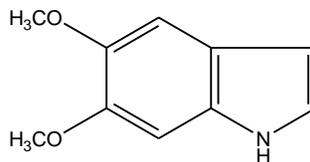


Figura 8b: Núcleo Ergolina sin sustituyentes



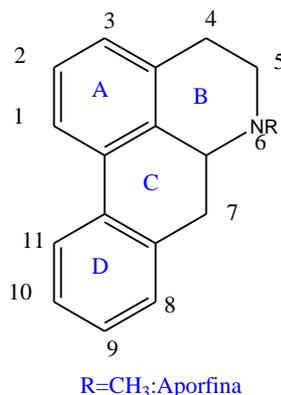
3.7.2. Espectroscopía de Infrarrojo (IR). Aún cuando el IR de los alcaloides al igual que el de la mayoría de los compuestos, carece de absorciones que les permita identificarlos, proporciona importante información sobre la presencia o no

de ciertos sustituyentes o grupos funcionales. Las absorciones más útiles son entre 3200 y 3700 cm^{-1} en la que absorben los grupos hidroxilos (los fenólicos se ubican entre 3650 y 3500 cm^{-1} , los alcohólicos entre 3200 y 3500 cm^{-1} y los grupos amino entre 3200 y 3400 cm^{-1}) y en la región entre 1620 y 1780 cm^{-1} donde absorben los grupos carbonilo. ⁽³¹⁾

3.7.3. Espectrometría de Masas EM. Debido a la gran variedad estructural de los alcaloides dificulta la generalización para la interpretación de los espectros de masas. En general las masas moleculares de los alcaloides son impares si el número de nitrógenos es impar y pares si este es par, así como la señal del pico molecular es generalmente intensa, a menos que no tenga insaturaciones como en el caso de los alcaloides alifáticos. ⁽³¹⁾

3.7.4. Espectroscopía de Resonancia Magnética Protónica RMN ^1H . La técnica de resonancia magnética protónica, es una de las más utilizadas para la elucidación estructural de estos compuestos. Dos regiones del espectro son de una importancia particular, la de los protones aromáticos y la de los grupos metilos ligados a heteroátomos. Los protones aromáticos resuenan entre 6.70 y 7.40 ppm, para el caso de las aporfinas, el protón en posición 3 es el más blindado hacia 6.60 ppm y el protón en 11 es el mas desprotegido entre 7.60 y 8.30 ppm, debido al efecto anisotrópico del anillo A (Figura 9). ⁽³¹⁾

Figura 9: Estructura de la Aporfina



3.7.5. Espectroscopía de Resonancia Magnética de Carbono-13 RMN ^{13}C . Los espectros de RMN de carbono 13 de cierto número de alcaloides, ya han sido descritos. En general, es fácil atribuir las señales de los átomos alifáticos (sp^3), Pues las señales se encuentran a campo alto, en el caso de aporfínas, serian los



carbonos de los ciclos B y C así: el C₄ resonará entre 28 y 30 ppm (aproximadamente 23 si el C₃ es sustituido), el C₅ entre 42 y 53 ppm, el C_{6a} cerca de 62 ppm y C₇ hacia 35 ppm.

Los carbonos aromáticos no sustituidos resuenan en la región entre 105 y 112 ppm; los carbonos aromáticos *ipso* (conteniendo a un grupo oxigenado) OH, OCH₃, o OCH₂O son los mas desprotegidos entre 140 y 151 ppm; los carbonos aromáticos sp² cuaternarios resuenan entre 119 y 130 ppm. Los carbonos unidos a N hacia 43 ppm, los carbonos de metoxilos entre 56 y 62 ppm, aquellos que son *orto* sustituidos resonaran a campo mas bajo que 60 ppm. Los metilendioxiido resonarán entre 100 y 102 ppm. ⁽³¹⁾



4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Ubicación Geográfica

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se utilizaron técnicas de análisis químico, físico y espectroscópico en fitoquímica. La investigación se realizó en las instalaciones del programa de Fitopatología del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), localizado en Chinchiná, Caldas.

4.2 Materiales y Equipos

4.2.1. Medio de Cultivo: (para la reproducción de las distintas cepas de los hongos): soluciones al 40% de glucosa y 10% pectosa, previamente esterilizadas.

4.2.2. Rota evaporador BÜCHI VAC V- 515.

4.2.3. Liofilizador: LAB CONCO.

4.2.4. Agitador Mecánico: Serie 25 D New Brunswick. Scientific Edison, N.J; USA.

4.2.5. Cromatógrafo de gases Hewlet Packard 6890, acoplado al espectrómetro de masas Hewlet packard 5973. Gas de arrastre Helio (AGA Fano S.A. 99.99%).

4.2.6. Viales con tapa antifuga de gases



4.3 Obtención del micelio de las cepas 9205 y 9024 del hongo *Beauveria bassiana*.

Con el propósito de reproducir las conidias de las dos cepas del hongo *Beauveria bassiana*, se utilizó la técnica Rombach (1998), que consiste en:

- Tomar una muestra de esporas presentes en medio Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), suministrado por la disciplina de Entomología del Centro Nacional de Investigaciones del Café (Cenicafé).
- Preparar una solución madre de esporas con agua destilada estéril (10 mL) en presencia de Tween 80 al 0.1% (dispersador de esporas).
- Realizar diluciones de la solución madre anteriormente preparada, de 10^3 y conteo en la cámara de Neubauer para obtener la concentración de esporas deseada.
- Tomar la cantidad de volumen de solución de esporas con base al conteo anterior y sembrar en el medio líquido constituido por: soluciones al 40% de glucosa y 10% pectosa, previamente esterilizadas, e incubar durante un período de 9 días, a una temperatura máxima de 26 °C, agitando a 90 r.p.m.
- Separar el micelio obtenido mediante filtración
- Liofilizar tanto el filtrado como el residuo
- Obtención del micelio y del medio líquido seco

4.4 EXTRACCIÓN DE METABOLITOS

Para obtener los metabolitos presentes en el micelio seco proveniente del residuo de la filtración, se realizaron extracciones con solventes de diferente polaridad a saber: Diclorometano, metanol, y etanol, mediante extracción Soxhlet.

Los metabolitos presentes en el medio líquido liofilizado (proveniente del filtrado), se obtuvieron mediante agitación continua en un agitador mecánico, con los mismos solventes.



4.5 ANÁLISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Para identificar los metabolitos obtenidos del micelio y de los medios líquidos previamente liofilizados, se realizó un análisis fitoquímico preliminar que consistió en la Identificación de grupos de alcaloides. Para ello, los extractos de los hongos, obtenidos anteriormente, conocidos como el crudo de alcaloides, fueron sometidos a diferentes pruebas con reactivos para alcaloides, los cuales formaron precipitados de coloraciones características.

Los reactivos fueron los siguientes:

Reactivo de Mayer: Se disuelven 1.36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua, se adicionan 5 g KI y se afora a 100 mL. "(Color inicial amarillo).

Se debe acidular los extractos con HCl o H_2SO_4 , la solución no debe contener ácido acético o etanol porque redisuelven el precipitado. El color del precipitado formado es blanco".⁽³²⁾

Reactivo de Hager:(Reacción del ácido pícrico). Es una solución acuosa saturada de ácido pícrico. Da precipitados cristalinos de forma que permiten la caracterización microquímica de los alcaloides. En un porta objetos se coloca una gota de la solución del alcaloide estado clorhidrato y se agrega una gota de solución saturada de ácido pícrico.⁽³²⁾

Reactivo de Wagner: Se disuelven 1.27 g de yodo (resublimado) y 2 g de KI en 20 mL de agua destilada. (Color inicial marrón)

La mayoría de las soluciones aciduladas de alcaloides forman precipitados floculentos color marrón.⁽³²⁾

Reactivo de Schleiber: (Reactivo de ácido fosfotúngstico): Se disuelven 50 mL de agua más 10 g de túngtato de sodio y 7 g de fosfato disódico. La solución se acidula con ácido nítrico. El reactivo forma precipitados amorfos al mezclarse con soluciones de alcaloides en ácido sulfúrico diluido. Es un reactivo muy sensible, especialmente para la estricnina y la quinina. Se pueden recobrar los alcaloides, tratando el precipitado con carbonato de sodio y luego un solvente adecuado.⁽³²⁾

Reactivo de Urk: (Reacción del ácido ρ -dimetilaminobenzaldehído en ácido sulfúrico al 65%)._Se utiliza para determinación de compuestos de núcleo indólico. Se considera positiva la reacción si dentro de los 30 minutos da una coloración entre azul y violeta.⁽³²⁾

Reactivo de Dragendorff: Comprende dos soluciones: Solución **a**: 0.85 g de subnitrito de bismuto en una mezcla de 10 mL de ácido acético y 40 mL agua. Solución **b** 8 g de yoduro de potasio disueltos en 20 mL de agua._Se mezclan 5 ml



de la solución **a** y 5 mL de la solución **b** y 20 mL de ácido acético para luego completar con 100mL con agua. Este reactivo forma precipitado naranja marrón con la mayoría de los alcaloides. Se usa sobre soluciones aciduladas.

Al evaluar los extractos crudos con los reactivos de precipitación se encontraron resultados positivos, se procedió a aislar los alcaloides presentes en el micelio de las cepas del hongo *Beauveria bassiana*.⁽³²⁾

4.6. Extracción y Purificación de Alcaloides.

Para extraer y purificar los alcaloides identificados en los extractos de las cepas del hongo, se utilizan diferentes técnicas tales como:

4.6.1. Cromatografía de Columna: Se tomó el extracto etanólico del micelio de las cepas 9205 y 9024 del *B. bassiana* y se llevó a sequedad bajo presión reducida. El residuo fue lavado con hexano para retirar la grasa. Posteriormente fue redisoluto en acetonitrilo-etanol (7:3), para luego efectuar un fraccionamiento por cromatografía en columna, utilizando como fase móvil cloroformo- etanol (9:1) (después de ensayar varias mezclas de solventes) y como fase estacionaria silicagel 60G Merck. Se recogieron cuatro fracciones aproximadamente de 25 ml cada una

4.6.2. Cromatografía de capa fina. Con el propósito de identificar los diferentes grupos de compuestos presentes en cada fracción, las cuatro fracciones obtenidas anteriormente fueron sometidas a una cromatografía de capa fina, utilizando placas de sílica gel 60 G Merck de 7 X 2 y 10 X 10 cm y como fase móvil acetato de etilo – isopropanol – amoniaco (45:35:20).

4.6.2.1. Revelado del Trabajo Fitoquímico. Con excepción de los pigmentos como las clorofila y xantófilas, los metabolitos no producen por si solos manchas coloreadas en el cromatograma. En el caso de los alcaloides su ubicación en la cromatoplaque se realizo por medio de la luz ultravioleta de onda larga (365 nm), y la aspersión de soluciones de Dragendorff, reactivo de Erlich y vapores de yodo. Se determinó la Relación de frente (R_f).

4.6.3. HPLC. Después del desarrollo de las cromatoplaque, se realizaron inyecciones de cada una de las fracciones en HPLC, para la comprobación de los resultados obtenidos en la cromatografía de capa fina, previo lavado de cada una de ellas con una solución de salmuera para retirar el azúcar.



4.6.4. Cromatografía de capa fina con patrones. Luego de comprobar que todas las fracciones presentan el mismo componente se procedió a reunir las fracciones, para realizar una cromatografía en capa fina de nuestro compuesto problema con los patrones de los metabolitos aislados del hongo *Beauveria bassiana*. Los patrones utilizados fueron: Beauvericina, Oosporeina y Tenellina.

4.6.5 Análisis del Contenido de Micotoxina por HPLC. En primera instancia se llevo a cabo el análisis empleando la misma metodología cromatográfica descrita por Uribe, Saldarriaga, Pineda, Arango, Vélez (1997).⁽³³⁾ De esta manera se procedió a realizar las inyecciones del patrón empleando las siguientes condiciones cromatográficas:

Columna C18 fase reversa, diámetro interno de 4 y tamaño de la partícula de 5 micras;

Diluyente: se usó metanol

Fase móvil: acetonitrilo-agua en proporción de 70:30. Es de mencionar que se realizó una modificación del artículo original en cuanto a la administración de la fase móvil.

La detección se realizó mediante un detector de Foto Arreglo de Diodos (PDA), la Beauvericina fue detectada a una longitud de onda de 210 nm.

4.6.6. Análisis de los Extractos por Cromatografía de Gases Acoplado a Masas. Inicialmente fue necesario determinar el flujo óptimo.

4.6.6.1. Determinación del flujo según curva de Van Deemter. La determinación del mejor flujo para cada columna se desarrolló utilizando como patrón 2-heptanol (Merck, reference substance for synthesis), para la columna DB5 (semipolar). Se trabajó flujos desde 0.3 a 1.2 mL/min. Las condiciones del cromatógrafo de gases masas (CG/MS) fueron: para el horno de 100 °C (2 min.) hasta 180 °C con una tasa de 7 °C/min. El modo inyección fue split con una división 50:1.

La altura equivalente del plato teórico (HETP) de cada columna se calculó midiendo el ancho de banda y el tiempo de retención y se calculó el número de platos teóricos para cada columna, según la siguiente ecuación:



$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w} \right)^2 \qquad HETP = \frac{L}{N}$$

Donde:

N = número de platos teóricos.

W = ancho de banda del pico.

T_r = tiempo de retención.

L = longitud de la columna.

4.6.6.2 Determinación Condiciones del CG/MS. Para determinar el mejor perfil cromatográfico, se partió del flujo de trabajo obtenido para la columna.

Para la columna DB5 las condiciones óptimas son: flujo de 1.2 mL/min, temperatura del horno de 80 °C (durante 5 min.) con una rata de 9 °C/min hasta 220 °C (5 min.) y después hasta 250 °C (5 min.) con una rata de 9 °C/min., por último se subió la temperatura hasta 300 °C (20 min). Se utilizó el detector selectivo de masas y las corrientes iónicas totales (cromatogramas reconstruidos), se registraron por medio del barrido automático de radiofrecuencia (1.97 scan/seg, analizador cuadrupolar) en el intervalo de masas m/z 40-800 u.m.a, la temperatura de la fuente de 230 °C, La energía de los electrones bombardeantes fue de 70 eV.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

6.1 Obtención de Micelio de las cepas 9205y 9024 de *Bauveria Bassiana*

Se logró la obtención del micelio de las dos cepas en un período de nueve días. (Figura 10).

Figura 10. Micelio de Cepa 9205



Figura 11. Micelio de la cepa 9024





6.2. ANALISIS FITOQUÍMICO PRELIMINAR

Se obtuvo coloración con los diferentes reactivos utilizados para cada una de las pruebas, tanto del extracto del micelio como del medio líquido, los cuales se relacionan en la tablas 1, 2 y 3. Se observan pruebas positivas para ambos extractos con la mayoría de los reactivos utilizados para las diferentes pruebas. Estos resultados presumen la presencia de alcaloides.

Tabla 1. Extracciones del Micelio del hongo cultivado a 9 días

| Crudo de alcaloides | Reactivo de Wagner. | Reactivo de Mayer | Reactivo de Urk. | Reactivo de Hager. | Reactivo de Shleiber. |
|---------------------------------|---------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------------|
| Etanólico | | | | | |
| B.b.9205 | + | | + | + | + |
| B.b.9024 | + | | + | + | + |
| CH ₂ Cl ₂ | | | | | |
| B.b.9205 | | + | - | - | + |
| B.b.9024 | | + | - | + | + |
| Metanólico | | | | | |
| B.b.9205 | + | + | + | - | + |
| B.b.9024 | + | + | + | + | + |

Tabla 2. Extractos en medio Líquido cultivado a 9 días.

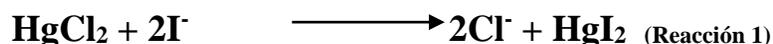
| Crudo | R W | R M | R U | R H | R S |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| Etanólico | | | | | |
| B.b.9205 | + | | + | - | - |
| B.B.9024 | + | | + | - | + |
| CH ₂ Cl ₂ | | | | | |
| B.b.9205 | | + | - | - | - |
| B.b.9024 | | + | - | + | - |
| Metanol/C | | | | | |
| HCl ₃ | | + | - | + | + |
| B.b.9205 | | + | - | + | + |
| B.b.9024 | | | | | |
| Extracción Líquido/liquido | | | | | |
| CH ₂ Cl ₂ | | + | - | - | + |
| B.b.9024 | | | | | |



Por la gran heterogeneidad de los alcaloides aparecen numerosas pruebas que únicamente son positivas para ciertos grupos de alcaloides, estableciendo de esta manera los posibles grupos funcionales específicos que conforman la molécula.

Las reacciones de reconocimiento de los alcaloides se basan en los siguientes comportamientos:

El yoduro potásico cuando reacciona con cloruro mercúrico, forma un precipitado de rojo de yoduro mercúrico.

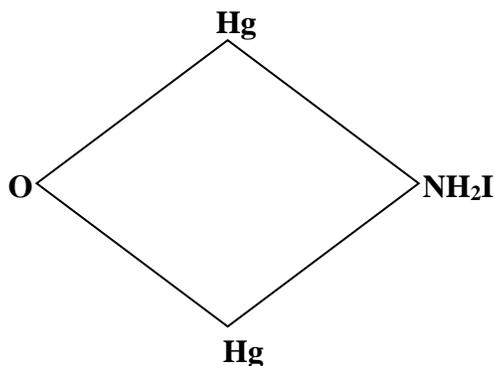


El yoduro mercúrico es soluble en exceso de iones de yoduro con formación de un anión complejo incoloro, $[\text{HgI}_4]^{2-}$ de acuerdo a la reacción número 2



La solución alcalina de este complejo sirve para descubrir indicios de amoníaco. En esta reacción se forma el compuesto de color pardo, Oxiyoduro mercuriamónico, (Figura 12) que es soluble en exceso de complejo $[\text{HgI}_4]^{2-}$ alcalino, generando intenso color amarillo.

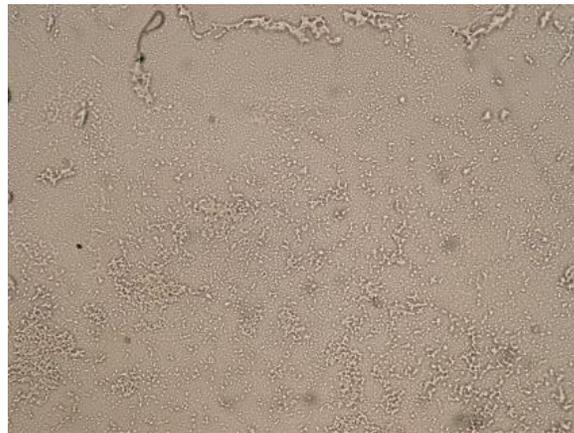
Figura 12 Estructura del Oxiyoduro mercuriamónico



Reactivo de Hager:(Reacción del ácido pícrico) Los resultados de esta prueba se muestran en las figuras 13, 14, 15 y 16. La primera observación de la solución acuosa de ácido pícrico se muestra en la figura 13.

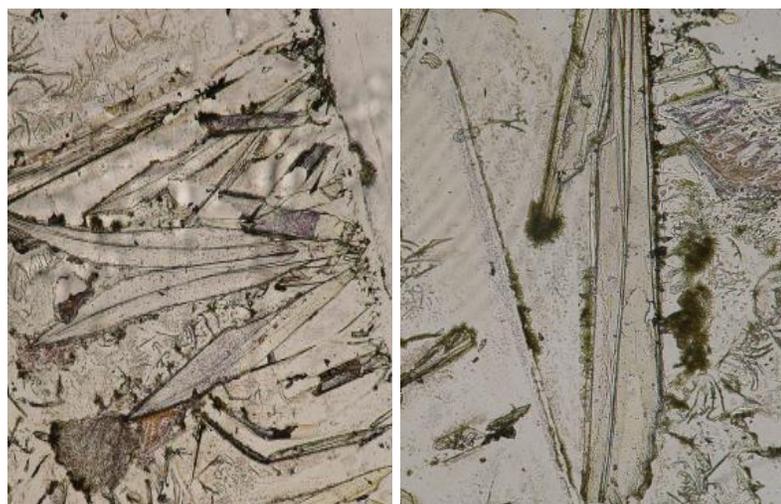
Para desarrollar esta prueba primero se observan los cristales formados por la matriz en que se encuentra la muestra, como también los cristales formados por el ácido pícrico, para tener estos resultados como un blanco. Como se puede observar en la figura 13 y 14 donde se presenta los cristales formados por la matriz y el ácido pícrico.

Figura 13. Matriz. Bb 9024



En la figura 14 Cristales formados por la matriz de la cepa Bb 9024 observada en un microscopio a una distancia focal de 20 X

Figura 14. Cristales de Ácido Pícrico



En la figura 15 se observan los precipitados cristalinos formados por la muestra y el respectivo reactivo, observados a 40 X. De esta forma se puede caracterizar microquímicamente un alcaloide.

Figura15. Bb9024+ Ácido Pítrico.



En la figura 16 se aprecia la cepa 9205 al ácido pícrico. Al principio, algunos precipitados son amorfos, mientras que otros comienzan a cristalizar inmediatamente a temperatura ordinaria.

Figura 16. Bb 9205 +Ácido pícrico.



Una vez se reconocen los cristales formados tanto por la matriz como por el ácido pícrico, se observan los cristales formados en los crudos de alcaloides, se puede observar en la figura 15 del micelio Bb9024 forma algunos cristales diferentes a los formados por el blanco, al igual en el micelio de Bb 9205, se puede observar el cristal muy bien formado indicando que la prueba es positiva y hay presencia de alcaloides.

En cuanto a las pruebas con el reactivo de **Urk** se observa inicialmente un anillo de color violeta, indicando la presencia de núcleos indólicos (Figura 17).

Figura 17. Anillo inicial de la reacción de Urk. Del micelio Bb 9024 en metanol



A continuación, en las figuras 18 a 21 se enseñan las pruebas realizadas a algunos extractos con diferentes reactivos

Figura18. Micelio, extracto CH₂Cl₂ B.b. 9205.



De izquierda a derecha.

Reactivo de Hager: Presenta precipitado blanco en la interfase acuosa – orgánica.

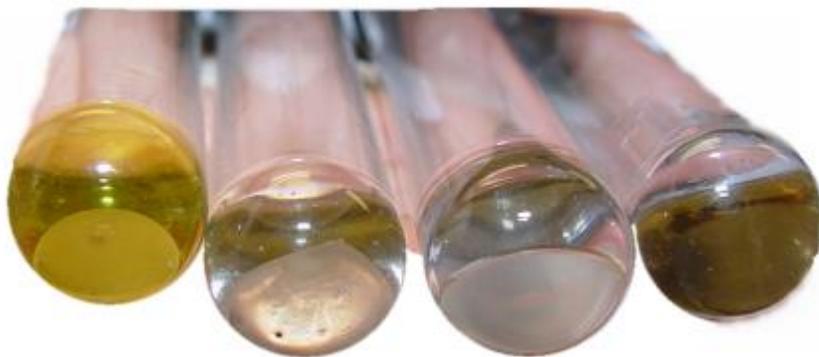
Reactivo de Mayer: Precipitado blanco interfase acuosa – orgánica.

Reactivo de Schleiber: No presenta precipitado.

Reactivo de Urk: Negativo.

Reactivo de Wagner: No se aplica puesto que este reactivo con solventes halógenos presenta coloración generando un falso positivo

Figura 19. Vista posterior de los tubos con los diferentes reactivos para alcaloides.



De izquierda a derecha: Reactivo de Hager: Presenta precipitado blanco en la interfase acuosa – orgánica. Reactivo de Mayer: Precipitado blanco interfase acuosa – orgánica. Reactivo de Schleiber: No presenta precipitado. Reactivo de Urk: Negativo

Figura 20. Micelio extracto Etanolico Bb 9024.



De izquierda a derecha.
Reactivo de Mayer: Precipitado blanco.
Reactivo Wagner: Precipitado violeta que con el tiempo cambia a blanco.
Reactivo de Hager: Precipitado blanco.
Reactivo de Schleiber: Precipitado café.
Reactivo de Urk: Coloración de la solución violeta

Figura 21. Vista posterior de el extracto Etanólico Bb 9024

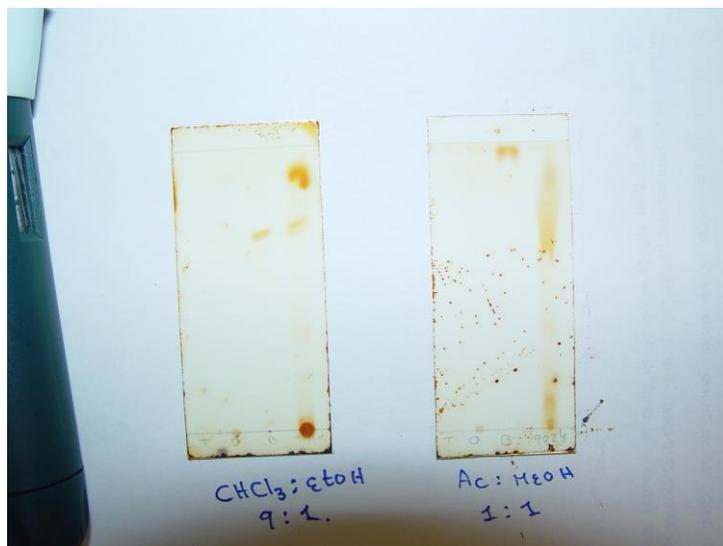


De los resultados de todas estas pruebas se puede presumir la presencia de alcaloides ya sean con núcleo indólicos o con heteroátomos nitrogenados; o compuestos en cuya estructura química se encuentre nitrógeno, ya que la mayoría de los reactivos interaccionan con este elemento, y es por esta combinación que se genera una coloración.

6.3. Separación de Metabolitos Secundarios Por Cromatografía en Columna.

Después de múltiples ensayos, se comprobó que la mejor mezcla de solventes, es decir la que lograba una mayor corrida y mejor resolución de los componentes correspondió a: La conformada por cloroformo-etanol, en proporción de 9 a 1. Figura 22.

Figura 22. Corrido de los extractos con diferentes mezclas de solventes



Se obtuvieron cuatro fracciones de 25 mL para el extracto de cada una de las dos cepas. Esas fracciones se evaluaron en cromatografía de capa fina y los resultados se presentan a continuación:

Fracciones Bb 9205

Fracción # 1 Rf = 0.94

Fracción # 2 Rf = 0.95

Fracción # 3 Rf = 0.95

Fracción # 4 No presento ningún componente

Fracciones Bb 9024

Fracción # 1 Rf = 0.94

Fracción #2 Rf = 0.94

Fracción #3 Rf = 0.94

Fracción # 4 No presento ningún componente.

Al aplicar cada una de las fracciones a un sistema de separación en capa fina, se pudo comprobar que todos los compuestos son idénticos, en cuanto a su desplazamiento en la superficie de la sílica, presentaron igual valor de Rf. Además también se pudo apreciar en dichas fracciones fluorescencia bajo la luz ultravioleta, con una coloración violeta en todas las manchas, indicando así que todas las muestras presentan el mismo tipo de compuesto. Es por este motivo que se reunieron las fracciones de las dos cepas y se integraron en un mismo recipiente para luego ser caracterizadas. (Figura 23).

Figura 23. Cromatograma en CCD de extractos de las dos cepas



Sin embargo, una vez evaluadas las fracciones de los extractos en CCD, se evaluaron también por esta misma técnica patrones de toxinas aisladas del hongo, encontrándose un R_f similar al obtenido con la muestra proveniente de la unión de las fracciones de las dos cepas, correspondiendo a la Beauvericina.

Como es evidente que en las pruebas preliminares de los extractos crudos en los diferentes solventes, estas dieron la mayoría positiva, indicando la posible presencia de alcaloides, con núcleo indólicos o con heteroátomos nitrogenados. Pero cabe resaltar que además estas pruebas son positivas también para compuestos que contengan nitrógeno; ya que los reactivos interaccionan directamente con este elemento, como es el caso de la Beauvericina.

Las consideraciones anteriores conllevan a suponer que en las fracciones obtenidas posiblemente se aisló compuestos correspondientes a esta micotoxina y no a alcaloides.

Con base en las investigaciones realizadas en CENICAFE, las dos cepas muestran diferencias muy marcadas en cuanto a su patogenicidad, atribuida a la Beauvericina, sin embargo, de acuerdo a lo encontrado en este trabajo, se demuestra que ellas dos presentan la misma toxina, quedando así sin explicar el por qué de la diferencia tan marcada en patogenicidad. De esta manera y para responder a esta pregunta, se decidió cuantificar la cantidad de micotoxina presente en cada cepa del hongo *Beauveria bassiana*.

Es por este motivo que se empieza una nueva siembra del hongo para mediante las técnicas anteriormente descritas, aislar la micotoxina y determinar por HPLC el contenido de estas en el hongo.

6.4. Análisis de la Micotoxina mediante HPLC

En los siguientes diagramas, representados en las figuras: 24 a 30, se pueden observar los diferentes cromatogramas HPLC de los patrones de la Beauvericina y de las fracciones correspondientes a los extractos de las cepas 9205 y 9024 del hongo *Beauveria bassiana*, utilizando como eluyente una mezcla de Acetonitrilo – Agua (70: 30).

Figura 24 Cromatograma HPLC patrón de Beauvericina 0.1 µg/mL

(Tiempo de retención 10.287 min.).

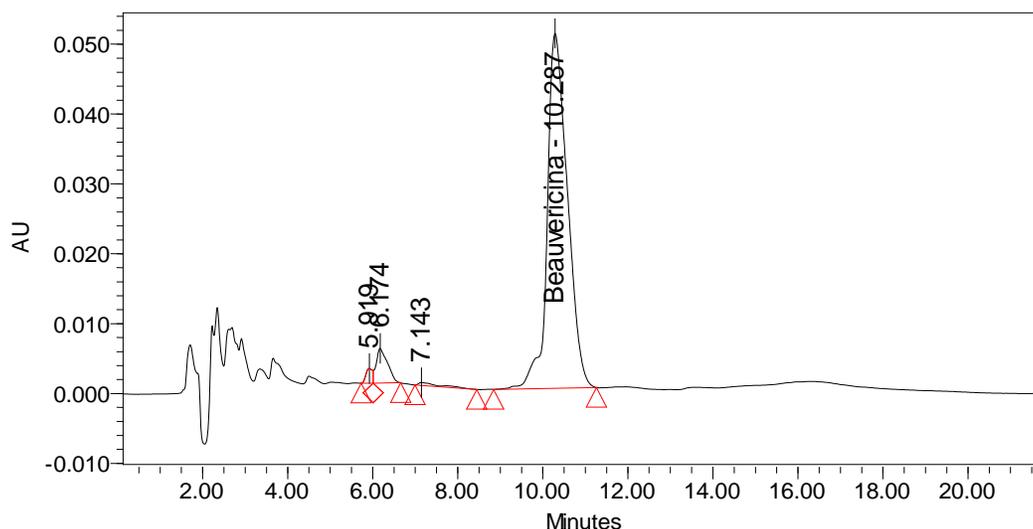




Figura 25 Cromatograma HPLC patrón de Beauvericina 0.25 µg/mL

(Tiempo de retención: 10.214 min.).

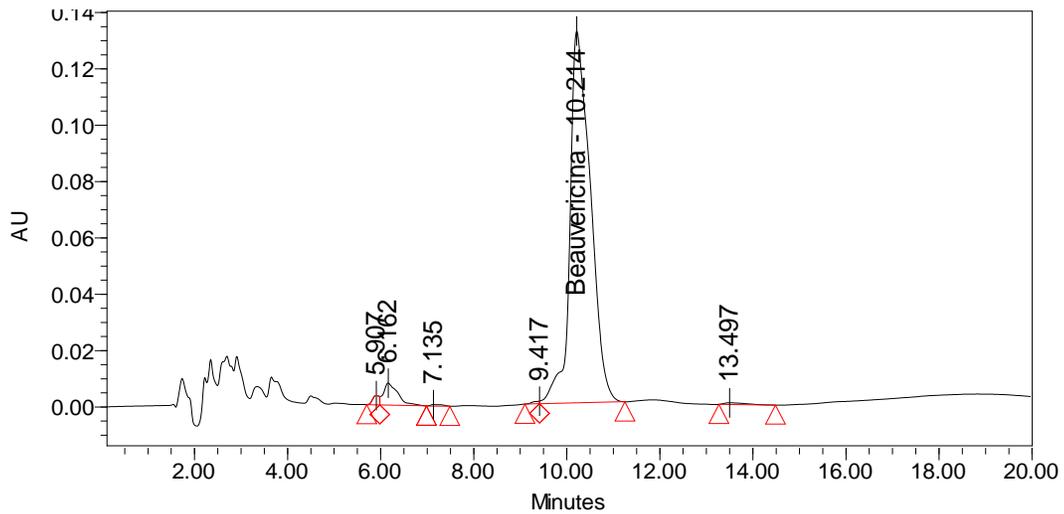


Figura 26 Cromatograma HPLC Patrón de Beauvericina 0.5 µg/mL

(Tiempo de retención: 10.287 min.).

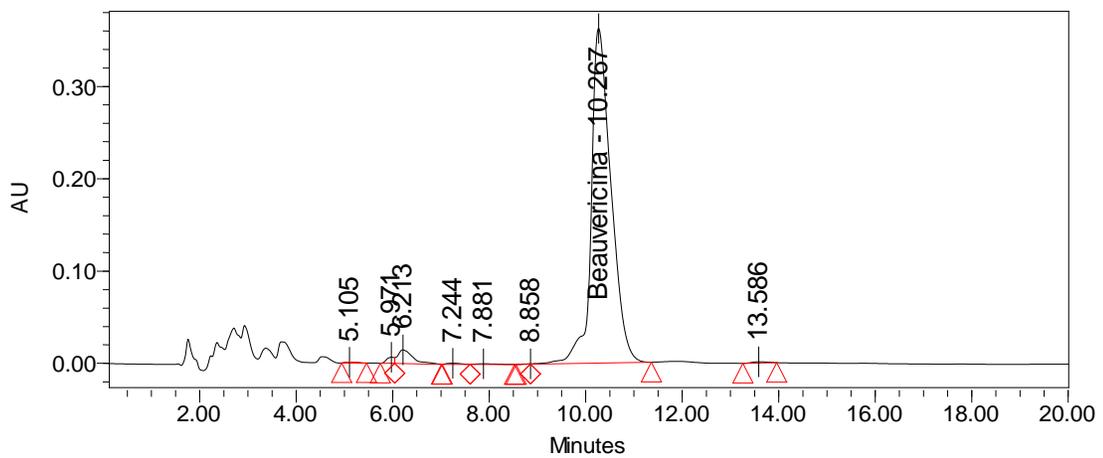


Figura 27 Cromatograma HPLC de Patrón de Beauvericina 0.75 µg/mL
(Tiempo de retención: 10.244 min).

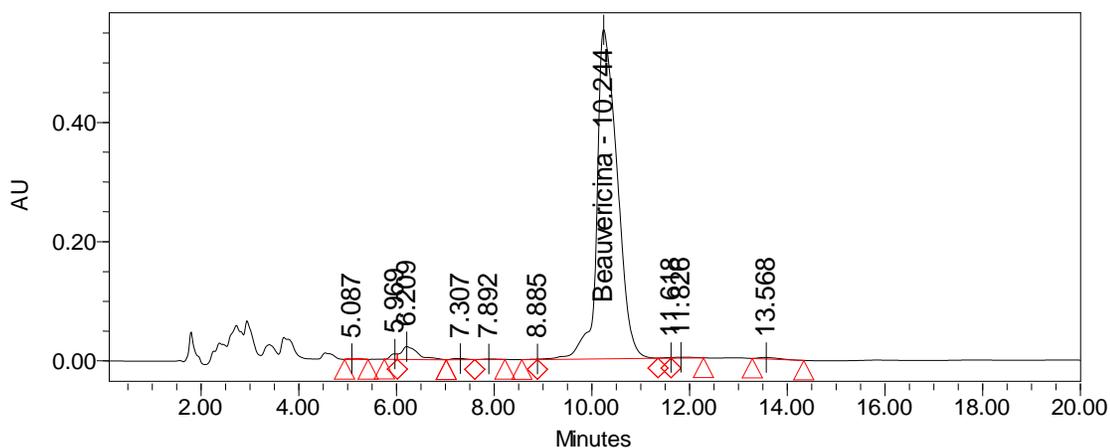
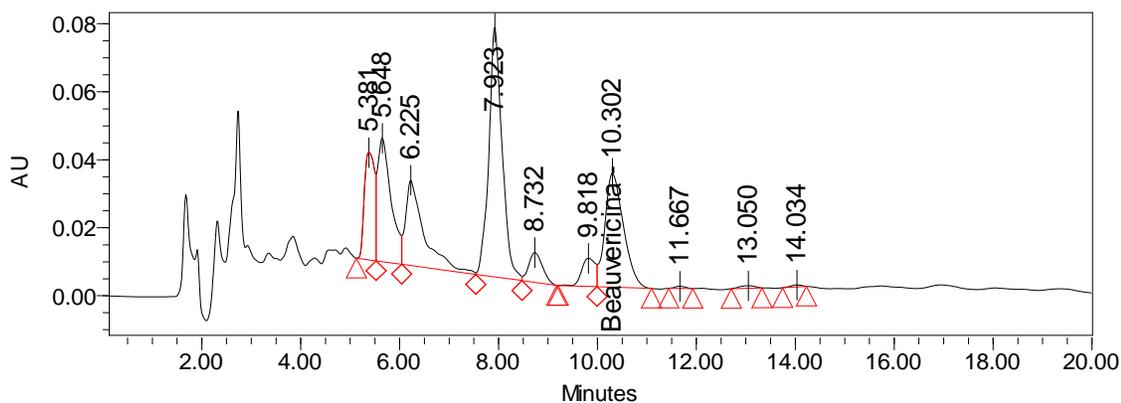


Figura 28 Cromatograma HPLC de Fracción de Bb 9205.
(Tiempo de retención: 10.302min).



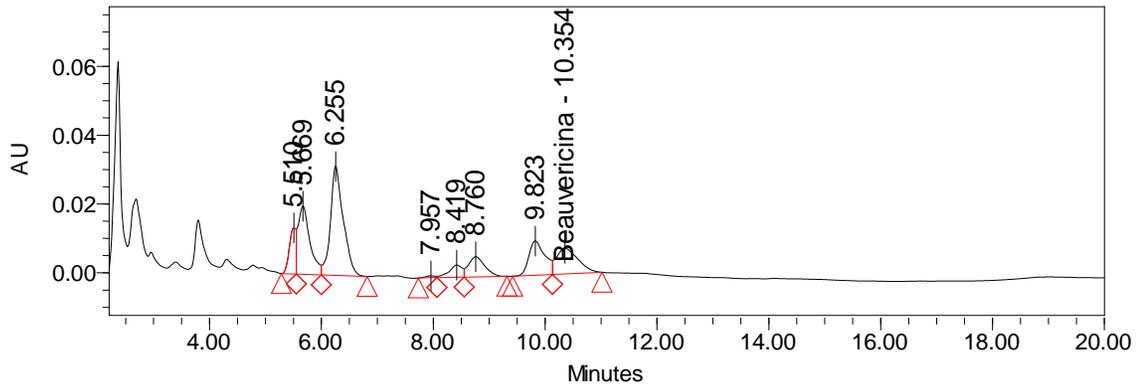
Resultados:

Nombre: Beauvericina.

Concentración: 0.083 µg/mL.

Figura 29 Cromatograma HPLC Fracción de Bb 9024.

(Tiempo de retención: 10.354 min).



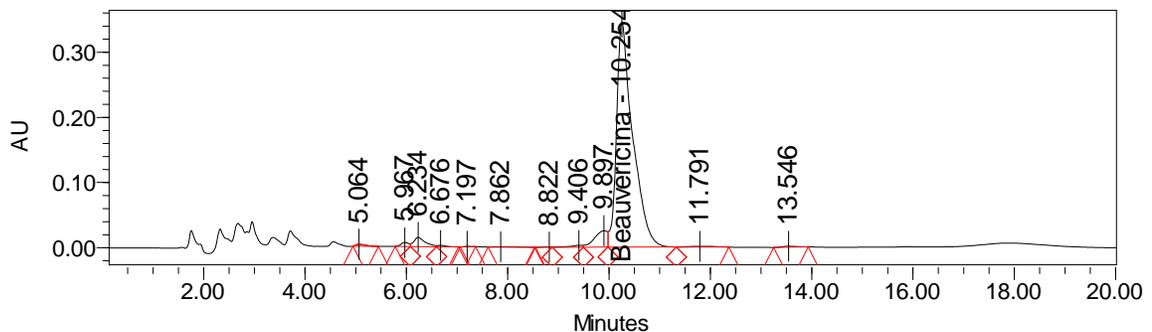
Resultados:

Nombre: Beauvericina.

Concentración: 0.053 µg/mL.

Figura 30. Cromatograma HPLC Unión inicial de las cepas Bb 9205 y B.b.

9024. (Tiempo de retención: 10.254 min)



Nombre: Beauvericina.

Concentración: 0.384 µg/mL.

De las figuras anteriores se deduce en primer lugar que en el caso de los cromatogramas de los patrones en diferentes concentraciones, se obtiene la misma señal correspondiente a la micotoxina. La diferencia entre ellos radica en la intensidad de la señal siendo mayor a mayor concentración de la toxina patrón. En segundo lugar se aprecia que en los cromatogramas correspondientes a los



extractos de las dos cepas se obtienen señales similares a las encontradas para los patrones.

Al comparar los tiempos de retención y los cromatogramas del patrón con las fracciones obtenidas a partir de los extractos del hongo, se verificó la presencia de la micotoxina en las fracciones obtenidas. Los picos con tiempos de retención 10.254, 10.254 y 10.302 corresponden a la Beauvericina, el tiempo de retención promedio de los patrones fue de 10.258.

Además el cromatograma HPLC correspondiente a la unión de todas las fracciones de las dos cepas muestra igualmente una sola señal, con el mismo tiempo de retención que el de los patrones y de las fracciones por separado, confirmando así la existencia de una sola micotoxina.

6.4.1. Cuantificación de la Micotoxina mediante HPLC

Se realizó una curva de calibración con soluciones en diferentes concentraciones de una muestra patrón de la micotoxina Beauvericina. Los resultados se muestran en la figura 31 en donde se muestra una correlación lineal positiva, con un alto coeficiente de correlación.

A: -9.9844117e + 005.

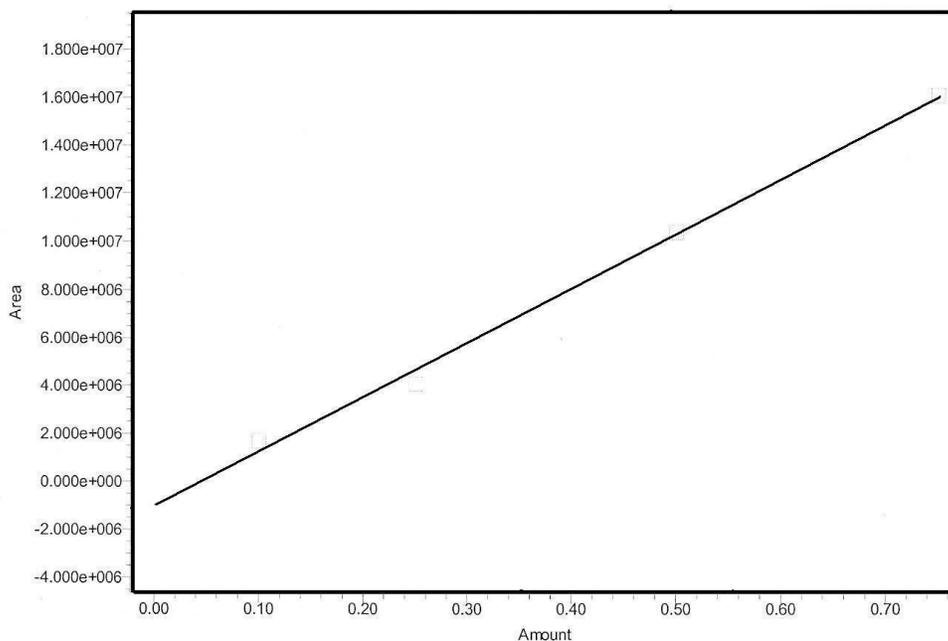
B: 2.2590320e + 007.

C: 0.000000 e + 000.

D: 0.000000 e + 000.

R²: 0.995715

Figura 31. Curva de Calibración de la Beauvericina.



Peak: Beauvericina

| | Name | Level | X Value | Response | Calc. Value | % Deviation | Manual | Ignore |
|---|--------------|-------|----------|-----------------|-------------|-------------|--------|--------|
| 1 | Beauvericina | 1 | 0.100000 | 1683573.790922 | 0.118723 | 18.723 | No | No |
| 2 | Beauvericina | 2 | 0.250000 | 4061407.715574 | 0.223982 | -10.407 | No | No |
| 3 | Beauvericina | 3 | 0.500000 | 10372590.662758 | 0.503357 | 0.671 | No | No |
| 4 | Beauvericina | 4 | 0.750000 | 16033293.298762 | 0.753938 | 0.525 | No | No |

En la curva de calibración se interpolan los resultados de una muestra del extracto de las cepas encontrándose los valores correspondientes a la beauvericina para cada una de las cepas:

La cepa Bb 9205 con una concentración de 0.083 µg/mL y en la Bb 9024 0.053 µg/mL.

Se observa que la cepa 9205 presenta mayor cantidad de micotoxina que la cepa 9024. A esta diferencia en cantidad de micotoxina se puede atribuir posiblemente la diferencia en patogenicidad, siendo más patógena la que presenta mayor cantidad de **beauvericina**, es decir la cepa 9205.

Se realiza esta afirmación, ya que está comprobado, que la micotoxina producida por el hongo es altamente tóxica siendo responsable del mayor número de muertes de los insectos a los cuales ataca, por lo anterior se confirma una potente actividad biológica como insecticida.

No se puede comparar la cantidad de producción de Beauvericina, obtenida en esta investigación con otros trabajos relacionados con los aislamientos de la



micotoxina, debido a que se realizaron variaciones en las técnicas utilizadas para la extracción y cuantificación de la toxina, las cuales pueden constituir en si mismas una fuente de variación. Además es el primer trabajo que está relacionado en el aislamiento y comparación de la toxina en las cepas Bb 9205 (altamente patogénica) y Bb 9024 (poco patogénica).

Uno de los objetivos del trabajo pretendió encontrar una manera de diferenciar las dos cepas, mediante la ausencia o presencia de un metabolito secundario cualquiera. Sin embargo, no se encontró ningún tipo de moléculas diferentes, pero si se dedujo experimentalmente, una marcada diferencia en cuanto a la concentración de la principal micotoxina, bajo las mismas condiciones de crecimiento, temperatura y agitación.

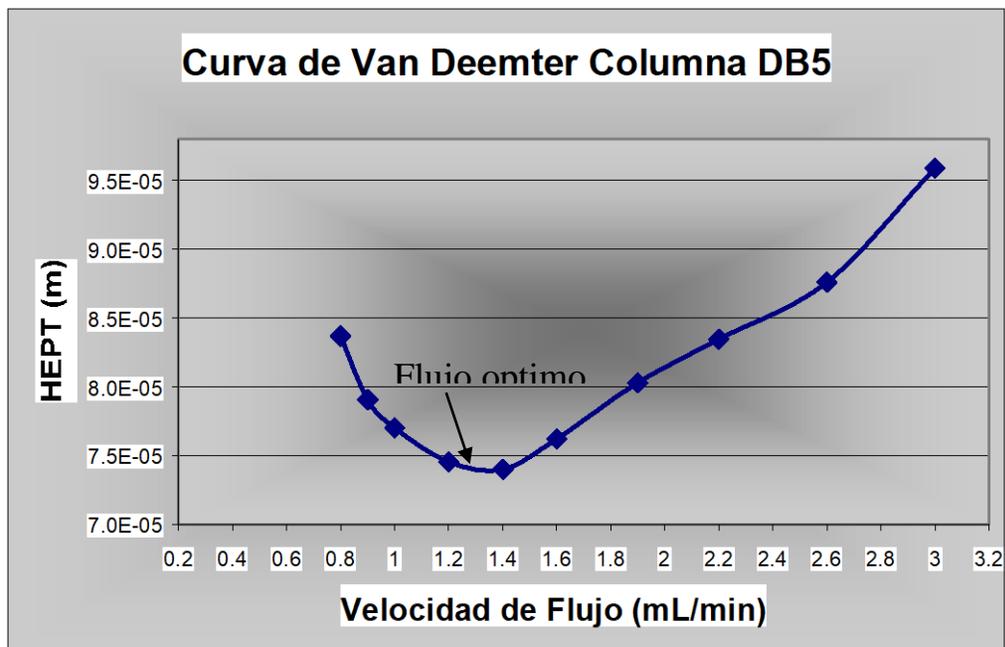
Por la razón anterior se tomó la decisión de pasar a evaluar los extractos etanólicos, mediante cromatógrafo de gases acoplado a masas, para saber si se podía obtener algún tipo de información nueva.

6.5. Análisis de la curva de Van Deemter.

La Figura 32 presenta la curva de Van Deemter para la columna DB5, con ella se determinó que el mejor flujo de trabajo para la columna DB5 es de 1.2 mL/min , dado que no existe mayor diferencia en la altura eficiente del plato teórico (HETP) y se obtiene mejor separación, evitando solapamientos debidos al flujo.

En la determinación del mejor flujo de trabajo para la columna, se tuvo en cuenta que la altura eficiente del plato teórico (HETP) de la columna estudiada, corresponda al más pequeño, ya que ello garantiza mejor resolución del cromatograma, debido a que el soluto o analito de interés puede equilibrarse entre la fase móvil y la fase estacionaria, de una forma más eficiente, permitiendo así un perfil cromatográfico bien definido (Figura 32).

Figura 32. Curva de Van Deemter para la columna DB5



6.6. Análisis de las Muestras por CG/EM

Las cepas de los hongos *B. Bassiana* Bb9205 (altamente patogénica) y Bb9024 (poco patogénica) fueron sembradas en un medio de cultivo líquido de peptosa y glucosa durante 9 días. El micelio producido de la cepa de Bb9205, no presenta alcaloides extraídos en los diferentes extractos obtenidos (etanol, cloroformo y metanol), aún cuando las pruebas preliminares dan positivas para estos compuestos. Sin embargo, como se deduce del cromatograma CG acoplado a masas, representado en la figura 33 obtenido en su medio líquido, muestra presencia del 5,7,22 triene 3-ergostanol, compuesto mayoritario en el extracto etanólico (tiempo de retención. 39.76) seguido por el gamma sitosterol (tiempo de retención. 39.76) (ver Figura 33 y 34).



Figura 33. Cromatograma de la corriente total de iones del extracto etanólico del medio líquido de la cepa de Bb9205 con 9 días de siembra.

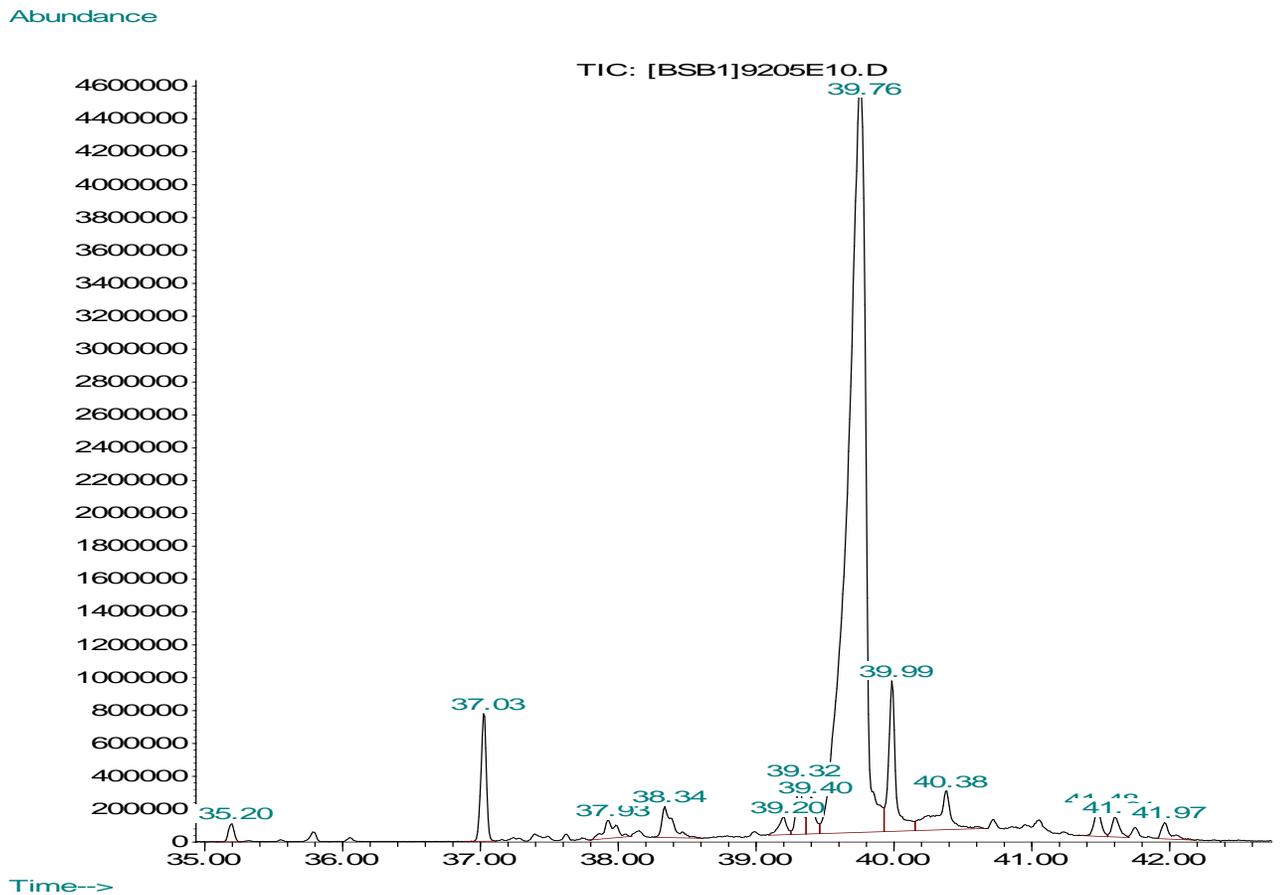


Figura 34. Espectros de masas de los dos principales Esteroles identificados en el extracto etanólico del medio líquido, 5,7,22 triene ergostanol (arriba) y gamma sitosterol (abajo).

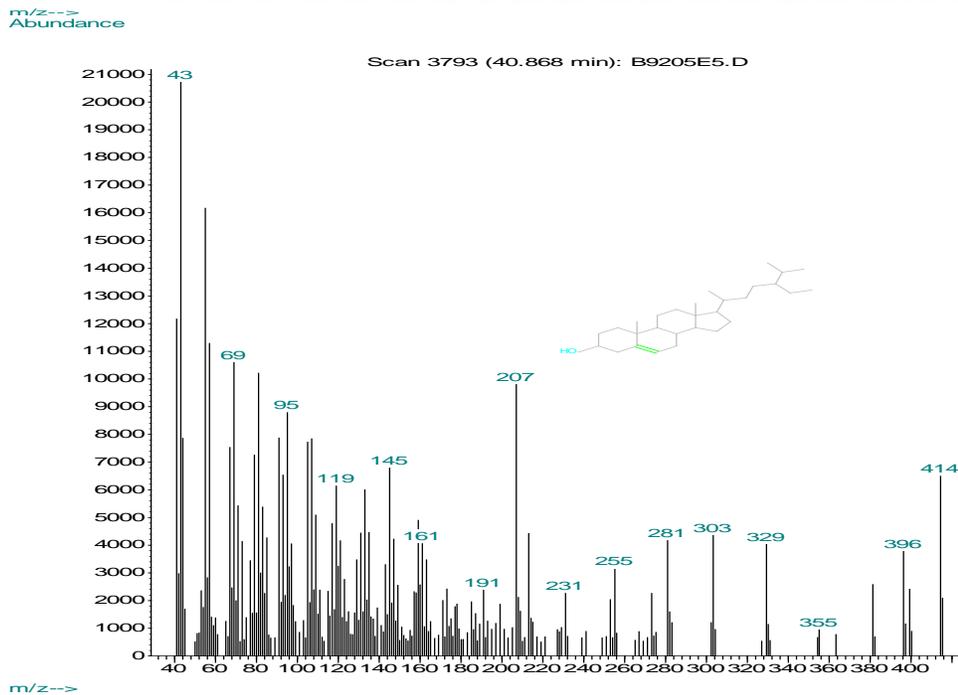
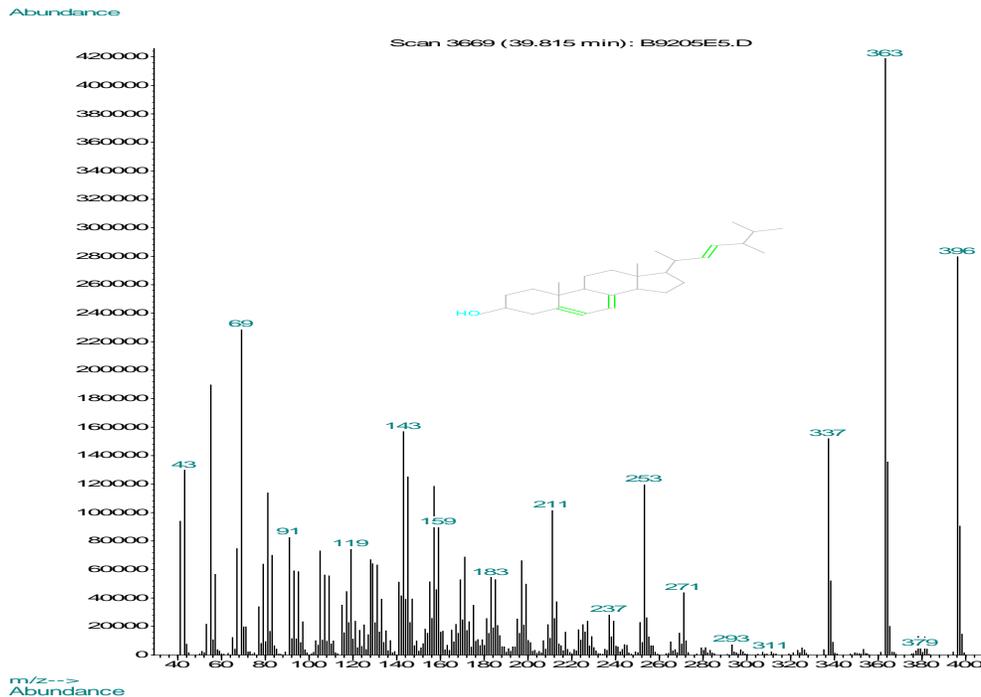


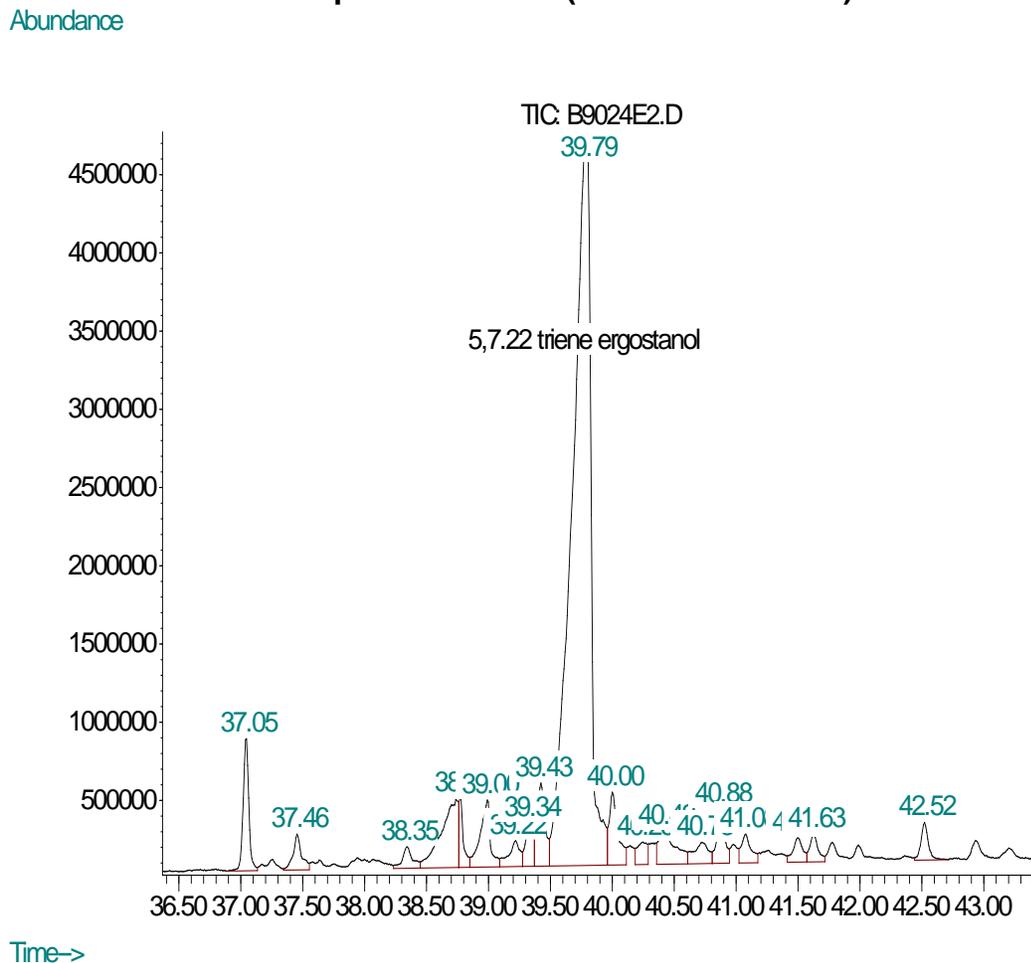


Tabla 3. Datos del espectro de masas tomado en etanol del Ergosterol

| PATRÓN DE FRAGMENTACIÓN | PICOS DE FRAGMENTACIÓN MAS REPRESENTATIVOS (m/z) |
|--------------------------------------|---|
| M⁺(IÓN MOLECULAR) | 396 |
| M⁺-18 | 378 |
| M⁺-33 (PICO BASE) | 363 |
| M⁺-125 | 271 |
| M⁺-143 | 253 |
| M⁺-185 | 211 |
| M⁺-253 | 143 |

Se realizó una nueva evaluación, para de esta manera determinar si en realidad se cumplía la relación de la concentración más alta del ergosterol en la cepa Bb 9205. Esta vez se trabajó con el extracto etanólico del micelio de la muestra Bb 9024. Los resultados del Cromatograma CG/acoplado Masas se representan en la figura 35.

Figura 35. Cromatograma CG/acoplado Masas extracto etanólico del micelio de la cepa de B.b.9024 (9 días de siembra)



Los resultados obtenidos indican que a pesar que se analiza el medio líquido (más diluido) de la cepa Bb 9205 (ver Figura 33), frente al micelio de la cepa 9024, (Ver Figura 35), se puede observar que no presenta diferencia significativa en cuanto al nivel de concentración del ergosterol entre ellas dos. Además, también presentan valores de porcentajes de abundancia similares, en todas las medidas realizadas para el metabolito de interés. Estos resultados pueden indicar que es posible que la cantidad de Ergosterol con el tiempo de crecimiento del hongo llegue a un tope de producción del mismo.

Este mismo procedimiento se repitió para estas dos cepas, incubadas durante 9 días. Las extracciones en el micelio de ambas cepas muestran la presencia del ergosterol (5,7,22 triene ergostanol), como se observa en la figura 36, Su diferencia radica en que la concentración de este ergosterol en la cepa de Bb9205 es aproximadamente el doble con respecto a la cepa de Bb9024.

Figura 36. Estructura del Ergosterol

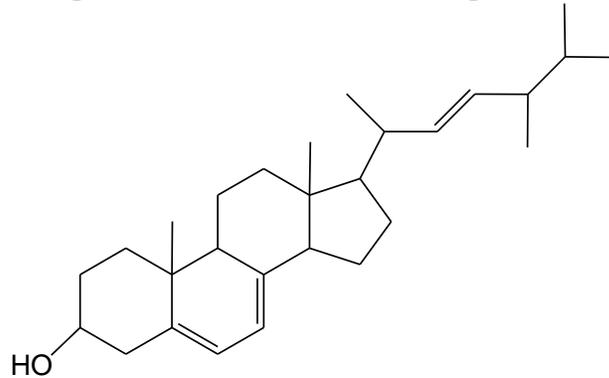
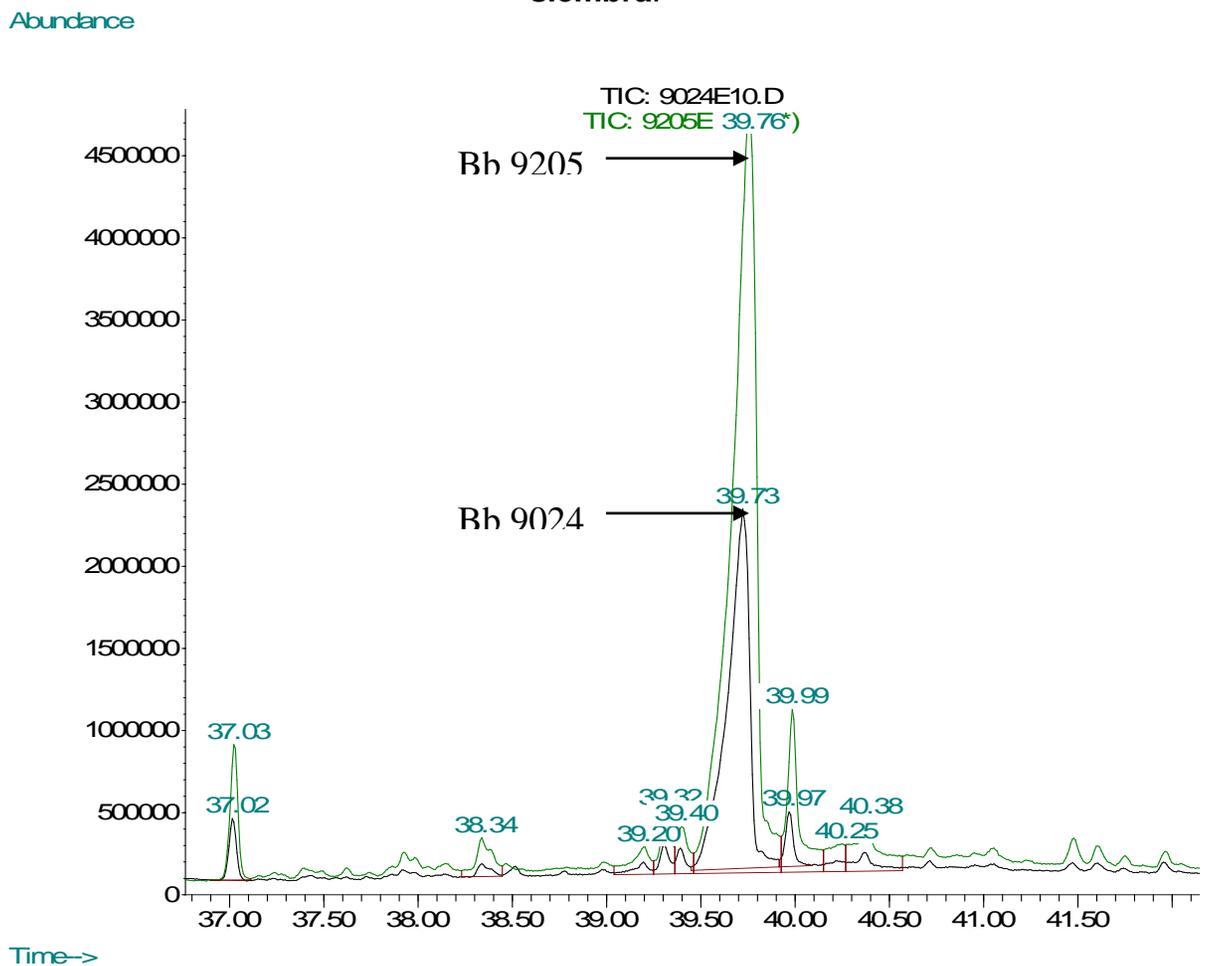


Figura 37. Cromatogramas del extracto etanólico del micelio de la cepa de Bb9205 (color verde) y la cepa de Bb9024 (color negro) con 9 días de siembra.



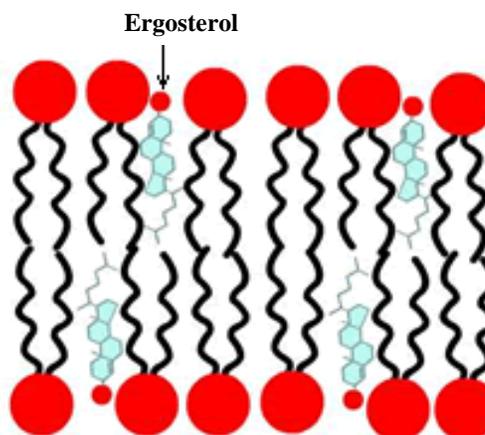
Estos resultados podrían explicar que la diferencia de patogenicidad entre las dos cepas podría estar relacionada con este compuesto, ya que la cepa 9205 produce más rápido este metabolito y a la vez es mucho más patogénica que la cepa Bb 9024.

Además, posiblemente presente actividades diferentes a las que normalmente se les asocia, ya que algunos tipos de estos compuestos han pasado a ser estudiados por poseer propiedades antitumorales; lo que podría indicar que el compuesto hallado pueda tener una mayor actuación como agente de biocontrol.

Y finalmente se puede afirmar que una vez la cepa más patogénica produzca sus metabolitos, en este caso Beauvericina y el Ergosterol en un menor tiempo, esta puede comenzar más rápido con la degradación o muerte del insecto y por ende ser mucho más eficiente que la cepa B.b. 9024.

Se podría decir que la influencia de la cantidad de ergosterol está relacionada con el grado de crecimiento y estabilidad de la membrana plasmática (Figura37), las moléculas de ergosterol actúan como reguladores de la fluidez, que se verá reflejado en una mayor capacidad para transportar los nutrientes hacia el interior de la célula, y a la vez la salida de las toxinas (beauvericina), que son las responsables de la muerte al insecto. Bioquímicamente el ergosterol se encuentra insertado en la bicapa con su grupo hidroxilo C3 próximo a las cabezas polares de los fosfolípidos y su región apolar integrada entre las cadenas hidrocarbonadas apolares de los mismos (Figura37).

Figura 38. Moléculas de Ergosterol localizadas en la membrana plasmática.





7. CONCLUSIONES

1. No se encontraron compuestos con características de alcaloides o que realmente cumplieran la definición de estos. No se halló un criterio de discriminación de las dos cepas por la presencia o ausencia total de compuestos.
2. Se encontró una nueva metodología por extracción Soxhlet, más rápida que las metodologías tradicionales para aislar la micotoxina beauvericina de hongo de *B. bassiana* que facilita su aislamiento, cuyo procedimiento se relaciona en el anexo 1
3. Las dos cepas presentan la capacidad para producir beauvericina *in vitro* a 9 días de siembra, según condiciones de laboratorio, tales como temperatura máxima de 26 °C y 90 r.p.m.
4. Se pudo comprobar una mayor concentración de Beauvericina en la cepa más patógena, lo que sugiere que esta sustancia es responsable en buena parte del grado de patogenicidad del hongo.
5. En este caso la concentración de la toxina puede ser incluida como un proceso de clasificación en un nuevo criterio de selección de aislamientos del hongo *B. bassiana*, en la búsqueda de formulaciones más eficientes para el control biológico de la broca del café.
6. La patogenicidad no puede estar influenciada solamente por la micotoxina, si no también, por otra serie de moléculas que están directamente relacionadas con los procesos de estabilidad de las membranas biológicas.
7. Con los resultados de este trabajo se abre la posibilidad para continuar con estudios acerca de la verdadera función del ergosterol en el proceso de infección del hongo a la broca.



Anexo1 Descripción de la nueva metodología desarrollada para obtención de micotoxina beauvericina de hongo de *B. bassiana*

1. Liofilizado del micelio y del medio líquido.
2. Extracción Soxhlet del micelio con etanol durante dos días.
3. Se lleva a sequedad mediante nitrógeno gaseoso.
4. lavar con hexano.
5. redissolver en una mezcla Acetonitrilo- Etanol (7:3).
6. Fraccionamiento Extracto en Columna Sílica-gel utilizando como fase móvil una mezcla de cloroformo-etanol (9:1).
7. Se lleva de nuevo a sequedad con N₂, redissolver en cloroformo.
8. Lavar son cloruro de sodio al 15%.
9. Redissolver en metanol, seguido análisis HPLC.
- 10 La detención y cuantificación de la beauvericina puede realizarse mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), mediante las siguientes condiciones: Columna C18 fase reversa, diluyente metanol y fase móvil acetonitrilo-agua (70:30), flujo constante de 1mL por minuto.



8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUSTILLO, A.E. 1998. Prespectivas de un manejo integrado de la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN, Medellín, N° 18, p. 106-118.
2. CARDENAS M., R. 1986. Estudios sobre la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari 1867); intento de erradicación de un foco de broca. In: Reunion del Comité Técnico andino de la Roya y la Broca del Café, 16. La paz, 10-13 noviembre. P.C77-C93.
3. DELGADO, B. F; LOPEZ, Y; GIRALDO, E.M. 2001. Actividad Enzimática de Hongos y Patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. Manejo Integrado de Plagas. (Costa Rica). N°60 p. 43-49.
4. FERRON, P. 1981. Pest control by fungi *Beauveria bassiana* y *Metharhizum*. In: BURGESS, H.D. ed. Microbial control of pests and plant diseases. 1970-1980. London. Academic Press. P. 465-482.
5. FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA.1998. Manejo Integrado de la Broca (MIB). Cenicafé. Chinchiná – Caldas, FEDERACAFE. 200 p.
6. BOUCIAS , D. G; PENDLAND, J.C. 1991. Attachment of mycopathogens to cuticle: The initial event of mycoses in arthropod hosts. In "The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals" (G.T. Cole and H.C. Hoch, Eds.).pp. 1173.
7. BRIDGE, P.D; ABRAHAM, Y.J; *Beauveria bassiana* (Deutermycotina: Hyphomycetes) isolates from the coffe berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera : Solytidae). Mycopathologia 111: 85-90.



8. FUXA, J. R. 1987. Ecological considerations for the use of entomopathogens in IPM. *Annual Review of Entomology* 32: 225-251.
9. GONZALES, G., M.T.; BUSTILLO, A.E, VALENCIA, A. 2001. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. *Cenicafé* 44(3): 93-102.
10. ANDREWS, S.O. 1980. Cuticular sclerotization. In *Cuticles techniques in arthropods*, ed. T.A. Miller, pp. 185-217. New York, Springer-Verlag.
11. BUSTILLO, A.E. 1987. Enfermedades en insectos y posibilidades de uso en programas de manejo integrado de plagas en Colombia. Medellín, ICA-Sección de Entomología. 349 p.
12. FERRON, P. 1978. Biological Control of Insects Pests by Entomopathogenous Fungi. *Annual Review of Entomology* 23: 409-442.
13. BOUCIAS , D. G; PENDLAND, J.C; LATGE, J.P. 1998. Nonspecific Factor involved in attachment of Entomopathogenic Deuteromycetes to Host Insect Cuticle. *Applied and environmental Microbiology*. Vol 54. N° 7. P. 1795-1805.
14. GIRALDO, E.M., LOPEZ, Y.; DELGADO, B. F.; VELEZ,P.E. 2001. Actividad lipolítica y proteolítica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizum anisopliae* y su relación con la patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). *Revista Colombiana de Entomología* 27(1-2): 61-65.
15. GENTHNER, F. J.; MIDDAGH, D. P. 1992. Effects of *Beauveria bassiana* and its toxins on *Mysidopsis bahia* (Mysidaceae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26: 90-94.



16. AOKI, J.; YANASE, K. 1970. Phenoloxidase activity in the integument of the silworm *Bombyx mori* infected with *beauveria bassiana* and *Spicaria fumosa-rosea*. J. Inv. Path. 16:459-464.

17. VILLALBA A; P. E; GONZALEZ, M. T; RIVERA, A; BERNAL M; G; BUSTILLO P; A. E; ESTRADA, M. N. 1998. Caracterización de asilamiento de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopelae* de la colección de hongos entomopatógenos de CENICAFÉ. Resúmenes, XXV Congreso de sociedad Colombiana de entomología. P. 89.

18. CASTELLANOS, D. 1997. Importancia en la potogeneidad de la acción enzimática del hongo *Beauveria bassiana* sobre la broca del café. Revista Colombiana de Entomología 23 (1-2): 65-71.

19. CHAMPLIN, F.R.; GRULA , E. A. 1979. Noninvolvement of beauvericin in the entomopathogenicity of *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology 37, 1122-1125.

20. DELGADO, F LOPEZ,Y; GIRALDO EM. 2001.Actividad enzimática de Hongos y su Patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei*. Manejo Integrado de Plagas 60: 43-49.

21. BAKER, PS. 1999. La Broca del Café en Colombia, Informe final del proyecto MIP para el Café. Chinchiná, CO. DIFD-CENICAFE –CABI Bioscience. 154 p

22. BUSTILLO P., A. E.; CASTILLOH., A.; VILLALBA G., D. A., P. E.; MORALES G., E. 1991. Evaluaciones de campo con el hongo *Beauveria bassiana* para el control de la broca del café *Hypothenemus hampei* en Colombia. Colloque Scientifique Internationalsur le Café. Paris. P 679-686.



23. ANDERSEN, S.O.1985. Sclerotization and tanning of the cuticle. In: KEKRUT, G.A.; GILBERT, L.I. EDS. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. Vol 3 Oxford, Pergamon Pres. P. 59-74.
24. COLE, G.T; HOCH, C. 1991. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Plenum Press. New York. P. 267.285.
25. CHARNLEY, A.K. 1991. Microbial pathogens and insect pest control. A Review. Letters in Applied Microbiology. 12: 149-157.
26. CHARNLEY, A.K; A. K; CLARKSON, J. M. 1996. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. Trends in Microbiology. 4:197-203.
- 27.KUCERA, M. 1991. Toxinas de el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*. Journal of Invertebrate Pathology 17: 211-215.
28. FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. 1997. Sistema de información Cafetera, encuesta nacional cafetera Sica. Estadística Cafeteras. Informe Final. Santa fe de Bogotá, FEDERACAFÉ. 178 P.
29. WAINWRIGHT, M. 1995. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Editorial Acribia. Zaragoza-España. p. 205-214.
30. PRIMO, E. 1991. Ecología Química "Nuevos Métodos de Lucha Contra Insectos". Editorial Acribia. Zaragoza – España. p. 182-187.
31. ARANGO, G.J. 2002. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. Universidad de Antioquia. Medellín. 88p.



32. BILBAO, M.R. 2000. Análisis Fitoquímico Preliminar. Universidad del Quindío. Armenia.
181 p.
33. URIBE, S. SALDARRIAGA, Y. PINEDA, F. ARANGO, G. VELEZ, I. 1997. Producción de Beauvericina por *Beauveria bassiana* 9401 aislado sobre *Lutzomyia* sp. (Diptera: psychodidae) vectores de Leishmaniosis. Revista colombiana de Entomología. Vol 23. Nos 3-4. P 137-141.
34. ARBOLEDA, J. DELGADO, F. VALENCIA, A. 2004. Detención de beaubericina en el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* mediante el uso de anticuerpos policlonales. Revista Colombiana de Entomología. Vol 30. No 2. P125-130.
35. ARBOLEDA, J. DELGADO, F. VALENCIA, A. 2003. Efecto de la toxina beaubericina sobre *Hypothenemus hampei*. Manejo de Plagas y Agroecología. Costa Rica. No 68. P. 71-76.
36. ARORA, D. K; ELANDER, R. P, MUKERJI, KG. 1992. Handbook of Applied Mycology Fungal Biotechnology. Vol.4.pp.2. Printed in the United States of America.
37. BIOCHKA, M.J.; KHACHATOURIAUS, G.G. 1988. N-acetyl-D-glucosamine Mediated regulation of protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Applied and Environmental Microbiology 54:2699-2704.
38. BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIAUS, G.G. 1988. Regulation of extracelular proteasa in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Experimental Mycology. 12: 161-168.



39. BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIAUS, G.G. 1992. Regulation of extracellular N-acetyl -d-glucosamidasa production in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Canadian Journal Microbiology 39: 6-12.1992.
40. BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIAUS, G.G; TONG, K.I. 1992. Partial Purification and characterization of two extracellular N-acetyl-D-Glucosaminidases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Journal of Microbiology 39:40-45.
41. BROWN, C. M.; CAMPBELL, I. ; PRIEST F. G. 1989. Introducción a la Biotecnología. Editorial Acribia Zaragoza España. p. 140-150.
42. BUCWALDT, L. L.; JESEN, J.S. 1991. HPLC Purification of dextruxins produced by *Alternaria brassicae* in culture and leaves of *Brassica napus*. Biochemistry 30(7): 2311-2316.
43. BURNETT, J. H. 1979. Aspects of the structure and growth of hiphal walls. In. Fungal Walls and Hyphal Growth. British Mycological Society Symposium, eds. J. A. Burnett and C. Trinci. Pp. 1-25. Crambridge Uni Press.
44. BUTT, TARIQ. M. 1983. Studies on the invasive and developmental processes of five genera of the Entomophthorales with special reference to *Erynia neoaphidis* on the pea aphid. *Acyrtosiphon pisum*. Harris. Ph.D. Thesis, University of Bristol.
45. BUTT, TARIQ. M. 1987. A fluorescence microscopy method for the rapid localization of fungal spores and penetration sites on insect cuticle. J. Inv. Path. 50: 702-704.
46. CHARNLEY, A.K. 1984. Physiological aspects of destructive pathogenesis in insects by fungi: a speculative review. In Invertebrate_Microbial Interactions. British



Mycological Society Symposium 6. Ed. J.M. Anderson, A.D.M Rayner, D.W.H. Walton, p.p 229-270. London: Cambridge, University Press.

47. CHARNLEY, A.K. 1989. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects. In "The Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth" (J.M. Whipps and R.D. Lumsden, Eds.). pp. 85-125. Cambridge Univ. Press, London.

48. COHEN, R. J. 1974. Some properties of chitinase from *Phycomyces blakesleeanus*. Life sciences 15: 289-300.

49. COOPER, R. M; WOOD, R. K.S. 1975. Regulation of synthesis of cell wall-degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* sp lycopersi. Physiological and Molecular Plant Pathology 5: 135-156.

50. COUDRON, T.A.; KROMA, M.J.; IGNOFFO, C.M. 1984. Levels of chitino-lytic activity during development of three entomopathogenic fungi. Comp. Biochem. Physiol. 79(3). 339-348.

51. DARKEN, M.A. 1961. Application of fluorescent brighteners in biological techniques. Science 133: 1704-1705.

52. DIPAOLA, R.; NENNA, S.; FORNELLY, F. ; MORETTI, A.; LOGRIECO, A.; CAIAFFA, M. F.; BOTTALICO, A.; TURSI, A.; MACCHIA, L. 1994 Cytotoxicity of beauvericin on humans B-lymphocyte cell lines, in ICACI XV EAACI 94. Allergy and clinical Immunology News 2, p. 256.

53. EL- SAYED, G.N; IGNOFFO, C.M; LEATHERS, T.D. 1993. Cuticular and non-cuticular substrate influence on expression of cuticle-degrading enzymes from conidia of an entomopathogenic fungus, *Nomuraea rileyi*. Mycopathologia. 122: 79-87.



54. GAUILLARD, F.; RICHARD-FORGET, F.; NICOLAS, J. 1993. New spectrophotometric assay for polyphenol oxidase activity. *Analytical Biochemistry* 215: 59-65.
55. GULL, K; TRINCI, A.P.J. 1974. Detection of areas of wall differentiation in fungi using fluorescents staining. *Arch. Microbiol.* 96: 53-.57.
56. GUPTA , S.; MONTOLOR, C.; HUANG, Y. S. 1995. Isolation of noel Beavericin analogues from the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Natural Products* 58 (5): 733-738.
57. HACKMAN, R.H. 1976. The interactions of cuticular proteins and some comments on their adaptation to funtion. In: HEPBURN, H.R. *The insect integument*. Amsterdam, Elsevier. p. 107-120.
58. HANKIN, Y.; NANAGNOSTAKING, S.I. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Micologia.* 67: 597-608.
- KOUL, O.; DHALIWAL, G.S. 2002. *Microbial Biopesticides*. Taylor & francis INC. New York. p. 239-269.
59. LEVY, M; CABRERA,G; WRIGH,J; SEDES, A. Indole alkaloids from culture of the fungus *Aporpium caryae*. *Phytochemistry*,54,941 –943 (2000).
60. RUNDBERGET, T; WILKINS, A. Thomitrems A y E, Two indole – alkaloid isoprenoids from *Penicillium crustosom*. *Phytochemistry.* 61, 979 – 985 (2002).