



UNIVERSIDAD DE SAN BUENAVENTURA CALI

HONGOS

Y SUS APLICACIONES EN AGROINDUSTRIA

CASOS DE INVESTIGACIÓN

JOHANNES DELGADO OSPINA
RAÚL ALBERTO CUERVO MULET
MARINO VALENCIA RODRÍGUEZ
IVÁN ANDRÉS GONZÁLEZ VARGAS
FABIÁN FELIPE FERNÁNDEZ DAZA

2020

Hongos y sus aplicaciones en agroindustria:
casos de investigación



**UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA
CALI**

Hongos y sus aplicaciones en agroindustria: *casos de investigación*

Johannes Delgado Ospina
Raúl Alberto Cuervo Mulet
Marino Valencia Rodríguez
Iván Andrés González Vargas
Fabián Felipe Fernández Daza

2020

Universidad de San Buenaventura Cali

Hongos y sus aplicaciones en agroindustria: casos de investigación / Johannes Delgado Ospina, Raúl Alberto Cuervo Mulet, Marino Valencia Rodríguez, Iván Andrés González Vargas, Fabián Felipe Fernández Daza / Universidad de San Buenaventura Cali. Grupo de investigación en Biotecnología; Universidad Santiago de Cali. Grupo de investigación en Industria y Ambiente.--Cali : Editorial Bonaventuriana, 2020

190 páginas

ISBN: 978-958-5415-60-7

1. Hongos 2. Hongos entomopatógenos 3. Atta cephalotes 4. Hormiga arriera 5. Control biológico de plagas 6. Biotecnología agrícola 7. Fungicidas 8. Insecticidas biológicos 9. Insectos dañinos 10. Microorganismos 11. Frutas - Enfermedades y plagas I. Universidad de San Buenaventura Cali. Grupo de investigación en Biotecnología II. Universidad Santiago de Cali. Grupo de investigación en Industria y Ambiente III. Tít.

632.7 (D 23)

U58

 Editorial Bonaventuriana, 2020
© Universidad de San Buenaventura

Hongos y sus aplicaciones en agroindustria:

casos de investigación

© **Autores:** Johannes Delgado Ospina, Raúl Alberto Cuervo Mulet,
Marino Valencia Rodríguez, Iván Andrés González Vargas,
Fabián Felipe Fernández Daza

© Editorial Bonaventuriana, 2020
Universidad de San Buenaventura
Dirección Editorial Cali
PBX: 57 (1) 520 02 99 - 57 (2) 318 22 00 - 488 22 22
e-mail: editorial.bonaventuriana@usb.edu.co
www.editorialbonaventuriana.usb.edu.co
Colombia, Suramérica

Los autores son responsables del contenido de la presente obra.
Prohibida la reproducción total o parcial de este libro por cualquier medio,
sin permiso escrito de los editores.

© Derechos reservados de la Universidad de San Buenaventura.

Diseño y diagramación: Carlos Cárdenas

ISBN: 978-958-5415-60-7

Tiraje: 150 ejemplares

Cumplido el depósito legal (Ley 44 de 1993, Decreto 460 de 1995 y Decreto 358 de 2000).

Impreso en Colombia – Printed in Colombia.
2020

Introducción.....	11
CAPÍTULO I.....	13
Los hongos como controladores biológicos.....	15
Introducción	15
Especies fúngicas empleadas como agentes controladores de plagas	16
Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos.....	17
Adhesión de esporas	18
Germinación de esporas	22
Penetración de la cutícula	23
Respuestas de los insectos a la infección	23
Mecanismo de acción de hongos micoparásitos.....	23
Micoparasitismo.....	24
Levaduras antagonistas	24
Consideraciones legales.....	25
Investigación sobre biocontrol de hormiga arriera	28
Métodos	30
Resultados	34
Discusión	50
Conclusiones.....	52
Agradecimientos.....	53
CAPÍTULO II.....	55
Hongos como productores de enzimas pectinolíticas	57
Introducción	57
Investigación sobre la identificación de levaduras con actividad pectinolítica de aislamientos obtenidos a partir de de pulpas frutales y suelos de Valle del Cauca.....	58
Métodos	64
Resultados	67
Discusión	73
Conclusiones.....	76
Agradecimientos.....	76
CAPÍTULO III	79
Los hongos como determinantes de la calidad alimentaria	79
Introducción	79
Investigación sobre microbiota de granos secos de cacao (<i>Theobroma cacao</i> L) ...	85
Metodología.....	88
Resultados	89

Discusión	102
Conclusiones	104
Agradecimientos.....	104
CAPÍTULO IV	107
Biodegradación de un colorante AZO por una cepa de levadura <i>Galactomyces geotrichum</i> L-80.	107
Resumen	107
Introducción	108
Metodología.....	109
Resultados y discusión	111
Conclusiones	114
Agradecimientos	114
CAPÍTULO V	117
Evaluación del efecto antifúngico de aceites esenciales encapsulados durante el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Penicillium digitatum</i>	117
Resumen	117
Introducción	118
Materiales y métodos	120
Resultados y discusión.....	122
Conclusiones.....	132
CAPÍTULO VI	135
Optimización de las condiciones de cultivo de la <i>orellana pleurotus ostreatus</i> para incrementar la producción de lovastatina	135
Resumen	135
Introducción	136
Materiales y métodos.....	138
Resultados y discusión	140
Conclusiones.....	151
Referencias	153

Introducción

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas que se pueden presentar como hongos filamentosos (mohos) y hongos levaduriformes (levaduras). Se caracterizan por segregar enzimas para realizar una digestión externa y absorber los nutrientes de sustancias disueltas. Los hongos han acompañado la vida productiva del hombre desde la antigüedad y cada día su importancia aumenta en campos como la agroindustria, la medicina y la biotecnología, debido a su capacidad de producción de una gran variedad de enzimas y metabolitos secundarios.

En este libro se presenta a los lectores los resultados de algunas de las investigaciones realizadas con este importante grupo de organismos, un enfoque desde la agroindustria y la biotecnología llevadas a cabo por los grupos de investigación Biotecnología de la Universidad de San Buenaventura Cali y Microbiología, Industria y Ambiente de la Universidad Santiago de Cali.

Aquí se refleja el trabajo interinstitucional e interdisciplinario, que reúne los esfuerzos de estudiantes de pregrado y posgrado, al igual que el de los docentes, quienes desde diferentes espacios como los semilleros de investigación, los trabajos de grado, las tesis y los proyectos de investigación logran demostrar que en nuestra región es posible realizar investigación, para dar un uso biotecnológico a los hongos y mostrar la gran diversidad biológica con la que se cuenta para desarrollar investigaciones que potencien el sector agroindustrial e impacten el mundo.

El presente título se compone de seis capítulos en los cuales se exponen los muchos usos que se pueden dar a los hongos y sus aplicaciones agroindustriales, permitiendo así al lector tener una visión general del gran potencial de los microorganismos en la solución de los problemas que afectan el sector y las oportunidades que se pueden presentar. Cada capítulo tiene un breve cuadro de los

elementos teóricos que detallan la problemática y los resultados de investigación asociados. Así, el primer capítulo muestra la capacidad de los hongos de actuar como controladores biológicos, describe los diferentes métodos de infección de hongos a insectos y otros hongos, y se enfoca en su utilidad para el control de plagas, mediante una investigación del desarrollo de un bionsecticida para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*). El segundo capítulo contiene una descripción de la funcionalidad y las fuentes de las enzimas pectinolíticas en el reino fungi y un análisis investigativo de algunas especies fúngicas aisladas en Valle del Cauca con capacidad para degradar pectinas. El tercer capítulo muestra un lado negativo de los hongos, las micotoxinas, metabolitos secundarios que son capaces de generar riesgos para la salud de los consumidores, esto es sujeto de investigación en una materia prima prometedora para la agroindustria en Colombia: el Cacao.

Los capítulos 4, 5 y 6 corresponden a resultados de investigación científica presentados en formato tipo artículo. El capítulo cuatro muestra cómo la producción de enzimas puede convertirse en un aliado estratégico para mitigar el impacto ambiental generado por algunas industrias. El capítulo cinco muestra la susceptibilidad de los hongos a ser controlados por metabolitos producidos por las plantas, como los aceites esenciales y en el capítulo seis la investigación sobre la producción de orellana, muestra la importancia de los hongos en la producción de alimentos y su potencial en la producción de metabolitos como la lovastatina.



CAPÍTULO I

Los hongos
como controladores
biológicos

CAPÍTULO I

Los hongos como controladores biológicos

Raúl Alberto Cuervo Mulet,¹ Fabián Felipe Fernández Daza,²
Marino Valencia Rodríguez³ y Marney Pascoli Cereda.⁴

Introducción

Según la norma técnica colombiana NTC 4422-2[1], el control biológico se refiere al uso dirigido de insectos parásitos, predadores y patógenos para el control de insectos plagas, en los programas de manejo integrado en general. El control biológico incluye diferentes estrategias para eliminar o controlar un organismo considerado nocivo en la agricultura, entre las cuales se incluye la utilización de enemigos naturales generalistas que se alimentan de un gran número de individuos, bien sea que estén en estadios juveniles o en la fase adulta.

Entre los controladores generalistas [2], [3] encontramos: *Phytoseiulus persimilis* [4], *Coccinella septempunctata* [5], *Lebia grandis* *Aleochara bilineata* [6], *Chrysoperla*

1. Grupo Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Buenaventura Cali, Carrera 122 # 6-65, 76001, Cali, Colombia.

2. Grupo Salud, Ambiente y Productividad (GISAP), Facultad de Educación Virtual y a Distancia, Institución Universitaria Antonio José Camacho, Avenida 6N # 28N-102, 25663, Cali, Colombia.

3. Grupo Economía, Gestión, Territorio y Desarrollo Sostenible, Facultad de ciencias económicas, Universidad de San Buenaventura Cali, Carrera 122 # 6-65, 76001, Cali, Colombia.

4. Centro de Raíces e Amidos Tropicais (CERAT), Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rua Quirino de Andrade 215, Centro São Paulo, Brasil.

carnea [7], *Podisus maculiventris* [8] y *Deraeocoris nebulosus* [9], [10], los cuales son empleados en control de plagas que afectan cultivos de tomate, papa, pimienta, algodón y leguminosas, entre otros [11]. El uso de parasitoides entre los que se encuentran *Ophelimus maskelli* [12], *Homalodisca vitripennis* [13] y *Aphidius colemani* [14], se caracteriza por ser específico a ciertos insectos o sus etapas de desarrollo y por la utilización de extractos vegetales ya sea a partir del procesamiento de la planta completa o de algunas de sus partes (hojas, raíces, flores, frutos) para obtener algunos ingredientes activos, los cuales pueden causar mortalidad, inhibición del crecimiento, supresión del comportamiento reproductivo y reducción de la fertilidad y la fecundidad [15], [16]. Son también efectivos en el control de hongos con el empleo de aceites esenciales [17]. Entre las plantas utilizadas para tal fin se encuentran *Parthenium hysterophorus*, *Tagetes erecta* y *Piper nigrum*, entre otros [16]. En la utilización de patógenos se agrupan las bacterias, los hongos y los virus. Los plaguicidas microbianos (bacterias) se caracterizan por tener costos de producción bajos, alta especificidad y patogenicidad contra una o más plagas que afectan cultivos de importancia económica o social. Estos microorganismos se multiplican en el sistema digestivo y producen la muerte de su hospedero por septicemia. Entre las bacterias empleadas se encuentran *Bacillus popilliae*, *Bacillus thuringiensis* [18] y *Pseudomonas aeruginosa* [19]. Los plaguicidas virales entre los que se destacan *Oryctes virus* [20] y virus de la granulosis [21], son altamente específicos con sus insectos huésped y seguros para el medioambiente, los seres humanos, las plantas y sus enemigos naturales.

Este capítulo mostrará las generalidades asociadas a la utilización de hongos como agentes controladores y los mecanismos implicados en el control ya sea por infección a organismos plaga o por parasitismo de otros hongos. Así mismo, se dará un ejemplo de aplicación como controlador de *Atta cephalotes*.

Especies fúngicas empleadas como agentes controladores de plagas

Actualmente se estima la existencia de más de 750 especies fúngicas que se desempeñan como controladores biológicos. Se encuentran en el medioambiente (suelo, plantas e insectos infestados) y entre ellas se destacan los géneros *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Verticillium* [22], [23] (Tablas 1 y 2), por su forma característica de infección, son los microorganismos más importantes que infectan insectos como áfidos, mosca blanca, escamas, cigarras y chinches, entre otros. Su acción se ve mediada por la invasión de la hemolinfa y produce la muerte por la combinación de daños mecánicos,

desnutrición y la acción de metabolitos secundarios y de toxinas según el hongo. Durante el proceso de infección se producen cuerpos hifales y protoplastos que carecen de una pared celular por lo que no son detectados por los hemocitos del insecto, lo que permite que el hongo lo colonice al acceder a los nutrientes que requiere para su desarrollo y ocasionado la muerte del huésped (insecto) [7], [8], [24]. Por esta razón, los hongos se han utilizado alrededor del mundo en el control de diferentes plagas y entre ellos se encuentran géneros como *Metarhizium* y *Beauveria* ~que naturalmente se han establecido e infectado especies de insectos sociales~; *Trichoderma* sp. [7] *Beauveria*, *Brongniartii* [11], *Metarhizium* [12], *Isaria fumosorosea* [25], [26] y *Verticillium lecanii* [27], [28].

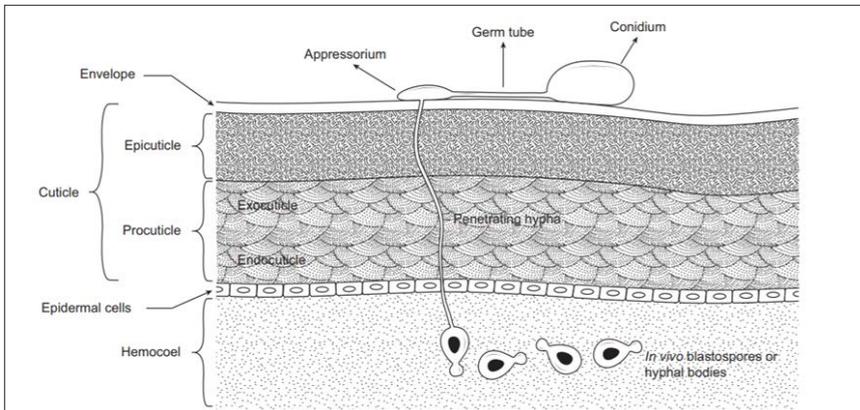
Con la utilización de estos hongos (esporas) se han desarrollado diferentes bioformulados comerciales, entre los que encontramos *Green Guard* (SC/ULV) formulado en Australia, que contiene como agente activo esporas de *Metarhizium anisopliae* var. *Acridum*, empleado para el control de langostas en cultivos [18]. En el mundo podemos identificar a *Tracer*® (*Saccharopolyspora spinosa*), *Aseronija* (Rusia), cuyo ingrediente es *Aschersonia aleyrodis*. A partir de esporas de *Beauveria bassiana* encontramos *Biotrol FBB* (USA), *Boverin* (Rusia) y *ABG-6178* (USA). Con el empleo de *Hirsutella thompsonii* se elabora *Mycar* (USA) y con *Metarhizium anisopliae* se fabrica *Biotrol FMA* (USA) y *Metaquino* (Brasil). Se tiene también *Mycobac*, cuyo principio activo es *Trichoderma lignorum* es producido en México. Por último, en Inglaterra están las marcas *Vertalec* y *Mycotol* que producen *Verticillium lecanii* [80]. Entre los productos latinoamericanos se encuentran *Adral wp*, *Agronova*, *Bassianil*, *Baubassil*, *Botanigard*, *Brocaril*, *Muscardin*, *Micosis*, *Mycontrol SE*®, *Naturalis-L*® y *Mycotech*, *Conidia*® (*Beauveria bassiana*) [78]. *Micos Plag*® (Colombia) emplea la combinación de esporas de los hongos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces lilacinus*, con el objetivo de controlar trips, áfidos, ácaros, broca del café y nematodos. Estos productos se indican claramente su manejo adecuado y advierten los riesgos que podrían presentar para la salud que se pueden controlar utilizando elementos de protección personal (guantes, tapaboca y gafas, entre otros). Es importante considerar que dada la naturaleza de sus componentes activos (esporas fúngicas), estos productos son seguros para el hombre y otras especies del ecosistema, ya que pueden infectar diferentes hospederos, por lo cual no son específicos para el insecto de interés.

Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos

La Figura 1 describe las fases de desarrollo de la infección del insecto por los hongos entomopatógenos.

Figura 1

Modelo general del proceso de infección de los hongos entomopatógenos

Fuente: Vega *et al.*, 2012.

Adhesión de esporas

La naturaleza heterótrofa de los hongos los obliga a obtener los nutrientes para su desarrollo a partir del organismo infectado. En el caso de los hongos entomopatógenos, estos deben penetrar la cutícula del insecto compuesta principalmente por quitina. Previo a esto, las esporas deben adherirse y para ello utilizan diferentes estrategias, entre las que se tienen las interacciones hidrófobas/hidrofílicas por medio de las cuales los conidios aéreos se unen fuertemente a las superficies hidrófobas, pero débilmente a las superficies hidrofílicas. Los conidios sumergidos tendrán la misma fuerza de adhesión en superficies hidrófobas e hidrofílicas, contrariamente a las blastosporas que se unen fuertemente a las superficies hidrofílicas y débilmente a las hidrofóbicas. Adicionalmente ocurren cambios, como la expresión de proteínas similares a las adhesinas (MAD1 y MAD2), producción de sustancias adhesivas (*Neozygites* y *Zoophthora*), y esporas recubiertas por mucilago [29] [81].

Tabla 1

Principales especies de hongos entomopatógenos presentes en el medioambiente

Género	Especie	Artrópodo	LD50	LT50	Autor	
<i>Akanthomyces</i>	<i>Akanthomyces</i> spp. <i>A. pistillariiformis</i> <i>A. koratensis</i> <i>A. aculeatus</i>	Arañas	NA	NA	[29]	
<i>Aschersonia</i>	<i>A. aleyrodis</i> <i>A. marginata</i> <i>A. coffeae</i>	Insectos de los géneros <i>Coccidae</i> , <i>Lecaniidae</i> y <i>Homoptera</i> y mariposas de los géneros <i>Aleyrodidae</i> y <i>Homoptera</i>	NA	NA	[29][30]	
<i>Beauveria</i>	<i>B. bassiana</i> <i>B. brongniartii</i> <i>B. tenella</i> <i>B. pseudobassiana</i>	<i>Lycoriella</i> <i>Ingenua</i> <i>Sinoxylon anale</i> <i>Lesne</i> <i>Frankliniella occidentalis</i> <i>Scatella tenuicosta</i>	2,16 × 10 ⁵ conidias/cm ² 1 × 10 ⁸ conidias/mL	6 días 10 días (6,8 días a 1 × 10 ⁷ conidias/mL y 5,8 días a 1 × 10 ⁸ conidias/mL)	[31] [32] [33] [34]	
<i>Beauveria</i>	<i>B. medogensis</i>	<i>Spodoptera littoralis</i>	3,6 x 10 ⁶ conidias/mL		[35]	
		<i>Corcyra</i>		10 días		
		<i>Cephalonica</i>	109 conidias/mL		[36]	
		<i>Dermanyssus gallinae</i>			11-12 días	[37]
		<i>T. molitor</i>		1x 10 ⁷ conidias mL ⁻¹		[38]
						[39]
				1 × 10 ⁸ conidias mL ⁻¹		[40]
				2,02 x 10 ⁸ spores/mL		[41]
				109conidia/mL		[42]
<i>Culicinomyces</i>	<i>C. clavisporus</i>	<i>Aedes aegypti</i>	3,6 x 10 ⁵ conidias/mL	1 a 1,3 días		
	<i>C. bisporalis</i>				[43]	

<i>Cordyceps</i>	<i>C. tenuipes</i>	Infecta lepidópteros en estadio de pupa	NA	NA	[44]
<i>Coelomomyces</i>	<i>C. santabrancae</i> sp.	<i>Onirion</i> sp.	NA	NA	[45]
<i>Entomophthora</i>	<i>E. syrphii</i> <i>E. planchoniana</i> <i>E. leyteensis</i>	Áfidos Tetraleurodes acaciae	NA	NA	[29] [46] [47]
<i>Erynia</i>	<i>Erynia</i> spp <i>E. radicans</i>		NA	NA	[29]
<i>Eryniopsis</i>	<i>E. lampyridarum</i>	Escarabajos	NA	NA	
<i>Hirsutella</i>	<i>H. Thompsonii</i>	<i>Hypothenemus hampei</i>			[48]
	<i>H. nivea</i>				1[29]
	<i>H. saussurei</i>				2[49]
	<i>H. eleutheratorum</i>				
<i>Hymenostilbe</i>	<i>Hymenostilbe</i> spp				
<i>Isaria</i>	<i>I. fumosorosea</i>	<i>Haematobia irritans</i>	107 conidias/ mL	71 %-86 % en ocho días	
		<i>Bemisia tabaci</i>			[50]
					[51]
<i>Lagenidium</i>	<i>L. giganteum</i>	Larvas de mosquitos	5,92 × 10 ⁶		
		<i>Aedes aegypti</i>			[29]
					1[52]

Género	Especie	Artrópodo	LD50	LT50
<i>Lecanicillium</i> 2 (<i>Verticillium</i>)	<i>L. attenuatum</i> 1	<i>Botrytis cinérea</i>	1 x 106 conidias/ml	2,8 días
	<i>L. lecanii</i>			
	<i>L. longispoum</i>			
<i>Leptolegnia</i>	<i>L. muscarium</i> (<i>Verticillium lecanii</i>)	<i>Aedes aegypti</i>	NA	NA
	<i>L. chapmani</i>			
	<i>M. anisopliae</i>			
<i>Metarhizium</i>	<i>M. flavoviridae</i>	<i>Peruvianus</i>	1x108 conidias/mL	14-21 días
	<i>M. Brunneum</i>	<i>Stomoxys calcitrans</i>		
		<i>Agriotes lineatus</i>		
		<i>Agriotes obscurus</i>		
<i>Nomuraea</i>	<i>N. rileyi</i>	<i>Haematobia irritans</i>	1x 107 conidias/ml	
		<i>Bemisia tabaci</i>		
		<i>Frankliniella occidentalis</i>		

Género	Especie	Artrópodo	LD50	LT50
<i>Neozygites</i>	<i>N. parvispora</i>	<i>Limothrips dentricornis</i>	NA	NA
	<i>N. floridana</i>	<i>Tetranychus urticae</i>		
<i>Paecilomyces</i>	<i>P. farinosus</i>	NA	NA	NA
	<i>P. fumosoroseus</i> (<i>Isaria fumosoroseus</i>)			
	<i>P. tenuipes</i>			
<i>Trichoderma</i>	<i>P. lilacinus</i>	<i>Leucinodes orbonalis</i>	2,87 x 107 esporas ml-1	11,7 días
	<i>T. longibrachiatum</i>			
<i>Zoophthora</i>	<i>Z. independentia</i>	<i>Tipula (Lunaticipula) submaculata</i>	NA	NA
	<i>Z. porteri</i>	<i>Tipula (Triplicitipula) colei</i>		
	<i>Z. radicans</i>	<i>Bagrada hilaris</i> y <i>Bactericera cockerelli</i>		

LD50: dosis letal 50, LT50: tiempo letal 50, N.A: no se registra

Tabla 2
Principales hongos parásitos con sus especies antagonistas.

Género	Especie	Antagonista	DL	Inhibición	Autor
Aspergillus	<i>A. pipers</i> <i>A. tubingensis</i> <i>A. aculeatus</i> <i>A. nomius</i> 2	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Sclerotium cepivorum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Cimex hemipterus</i> 2		71,85 %- 85%	[63] [64]
Trichoderma	<i>T. asperellum</i> <i>T. harzianum</i> <i>T. citrinoviride</i> <i>T. viride</i> <i>T. virens</i> <i>T. koningii</i> <i>T. afroharzianum</i> <i>T. asperelloides</i> <i>T. koningiopsis</i> <i>T. velutinum</i> <i>T. longibrachiatum</i>	<i>Meloidogyne javanica</i> <i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. <i>Erysiphe necator</i> , <i>Calonectria pseudo-naviculata</i> <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Phytophthora megakarya</i> <i>Fusarium graminearum</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Phoma exigua</i> , <i>Fusarium nygamai</i> y <i>Rhizoctonia solani</i> <i>Phytophthora ramorum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Verticillium dahlia</i> , <i>Colletotrichum capsici</i> , <i>Alternaria alternata</i> <i>Calonectria pseudo-naviculata</i> <i>Leucinodes orbonalis</i>	2,7 x 10 ⁷ conidia ml 1x10 ⁷ conidia ml 2,87x10 ⁷ esporas ml ⁻¹	60,1 %-66,8% 62,39 %-91- 13 % 35,71 % -53,40 % 85 % 56,3 % 90 % 56,4 %- 81,1 % 87 %-91 % 63,52 % - 78,80 % (64,2 ± 0,5, 75,0 ± 0,7, 71,4 ± 0,6, 62,5 ± 0,5) 85 % 85 %, 11,3 días	[65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72] [73] [74] [75] [76] [68] [60]
Escovopsis	<i>E. weberi</i>	<i>Leucoagaricus sp</i>	NA	NA	[77]

DL: dosis letal

Germinación de esporas

En esta fase, a partir de la espóra se forma un túbulo que penetra la cutícula. Este puede ser afectado por factores ambientales, de la cepa o de la naturaleza de la cutícula. En los pliegues intersegmentales se presenta mayor humedad y carecen de la esclerotinosa, lo que facilita la penetración. Al unirse la espóra se forma un apresorio al final del tubo germinal, estructura que permite la penetración a través de una clavija de penetración o infección. [29], [81].

Penetración de la cutícula

Con el objetivo de comprender la manera como el hongo accede al interior del insecto, se requiere conocer la estructura de la cutícula. Esta consiste en una red polimérica de quitina (70 %) y se divide en tres secciones: la envoltura, que corresponde a la capa más externa tiene un grosor que varía entre 10 y 30 nm. Siguen la epicutícula y la procutícula, secciones en donde se forman la quitina y las proteínas de la matriz. La procutícula se divide en endocutícula y exocutícula. En la base de la procutícula se encuentran las células epidérmicas. La infección requiere la ruptura mecánica de la cutícula, la que ocurre por la presión ejercida por el apresorio y por la exposición a proteasas, entre las cuales se pueden encontrar quitinasas y lipasas. Cuando el hongo accede al hemocele, emplea los nutrientes disponibles en este para su crecimiento y reproducción, interfiriendo así con la fisiología del huésped hasta lograr su muerte. [29], [81]

Respuestas de los insectos a la infección

Si bien la infección ocurre de forma natural, los insectos han desarrollado diferentes estrategias para disminuir el efecto de la exposición a las esporas fúngicas, entre las que se encuentra el aseo entre individuos orientado a retirar las esporas. Las hormigas, por ejemplo, presentan glándulas metapleurales secretoras de antibióticos que inactivan los hongos entomopatógenos. Adicionalmente, es usual la eliminación de individuos infectados. El sistema inmune celular está compuesto por hemocitos y estos fagocitan las conidias cuando se encuentran en concentraciones bajas. En caso contrario, se forman nódulos que buscan aislarse. Por otro lado, el sistema humoral produce cropinas, defensinas, atacinas y lisozimas, entre otras [29], [81].

Mecanismo de acción de hongos micoparásitos

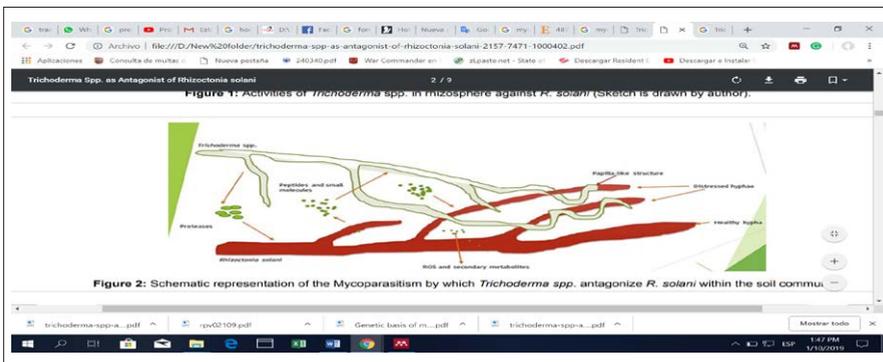
De los diferentes hongos que ejecutan esta forma de control, el género *Trichoderma* es el más estudiado a pesar de que también presenta otra estrategia de control denominada competencia. Esta se define como el comportamiento diferencial de dos organismos en un mismo ambiente (sustrato y concentración de nutrientes, entre otros), lo que da lugar a la reducción de espacio y cantidad de uno respecto del otro. Este tipo de control se asocia a la plasticidad ecológica, a la velocidad de crecimiento y desarrollo y a factores externos como la tipología del suelo, el pH, la temperatura y la humedad, entre otros [82]–[84].

Micoparasitismo

Se define como la simbiosis antagonica entre organismos, en la que generalmente están implicadas enzimas extracelulares como quitinasas y celulasas, que permiten sobrepasar los diferentes componentes de las paredes celulares de los hongos parasitados. En relación con *Trichoderma*, este se caracteriza por presentar crecimiento quimiotrópico hacia el hospedante, reconocido por interacciones lectinas-carbohidratos. La adhesión de las hifas se hace mediante la formación de apresorios que se enrollan alrededor de la hifa del hongo infectado, al cual se adhieren las hifas, y donde generalmente se cubre y penetran las hifas del hongo parasitado. Seguidamente, se lleva a cabo la degradación de las paredes celulares por la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista por los poros formados, permitiendo así el acceso al citoplasma (Figura 2), del cual extraerá los nutrientes requeridos para su desarrollo [82]-[84].

Figura 2

Modelo general del proceso de infección de los hongos micoparásitos



Fuente: Abbas *et al.*, 2017.

Levaduras antagonistas

Las levaduras son consideradas biocontroladoras potenciales por su fácil reproducción, alta capacidad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales y requerimientos de nutrientes simples [85]. Estas se han aislado a partir de hormigueros asociados a la producción de nutrientes requeridos para el creci-

miento de hongos de los cuales se alimentan las hormigas [77]. A pesar de esto, algunas especies de levaduras como *Candida zemplinina* M3, *Saccharomyces cerevisiae* M114, C297, *Pichia kluyveri* M117, *Metschnikowia aff. fructicola* M1 [85], *Metschnikowia sp.* FL02 [86], *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Starmerella bacillaris* o *Candida zemplinina* [77] y *Debaryomyces nepalensis* [77], poseen actividad antagónica en hongos. Diferentes estudios reportan actividad antagónica en *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium digitatum* y *Alternaria alternate*, respectivamente. El efecto antagónico de las levaduras ha sido explicado por la competencia de nutrientes y espacio, así como la expresión de proteínas killer en *Wickerhamomyces anomalus* NCYC 434 y en especies de los géneros *Candida*, *Pseudozyma*, *Barnettozyma*, *Hansenula* y *Pichia* [86]. En *Wickerhamomyces anomalus* se ha detectado la presencia de glucanasa [87].

Consideraciones legales

En Colombia, la comercialización de insecticidas basados en microorganismos está reglamentada por el ICA mediante la Resolución 307. El registro de productores y de venta de los bioinsumos elaborados con microorganismos entomopatógenos, deben cumplir las siguientes normas: NTC 292 sobre plaguicidas, coadyuvantes y reguladores fisiológicos, ensayos de suspensibilidad, humectabilidad y criterios de aceptación. La norma NTC 439 sobre plaguicidas, polvos mojables y polvos para espolvoreo. La norma NTC 577 (Icontec 1972) para la determinación de la granulometría. La norma NTC 4612 que regula los agentes biológicos para el control de plagas y los agentes microbianos a base de hongos y bacterias. Rotulado por la *Official Methods of Analysis* AOAC, 1995 y las técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos, del Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) [1].

Aplicación de hongos en el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*)

La utilización de depredadores naturales –parásitos, hongos entomopatógenos y antagonistas– para destrucción total o parcial de diferentes tipos de insectos, microorganismos u otro tipo de organismo considerado plaga en la agricultura, es definida como control biológico [88]. El uso de este tipo de controles se asocia a ventajas como poco o ningún efecto nocivo colateral; casos raros de resistencia; control a largo plazo; eliminación completa o parcial del uso de insecticidas; relación costo/beneficio muy favorable; protección contra plagas secundarias;

no provoca intoxicaciones y puede usarse como parte del manejo integrado de plagas [11], [16], [89], [90].

Importancia económica del control de la hormiga arriera (Atta cephalotes)

Las zonas tropicales y subtropicales cuentan con ecosistemas propicios para la supervivencia de diferentes tipos de insectos. *Atta cephalotes* o hormiga arriera, es una de estas especies que gracias a su gran adaptabilidad prospera en estas zonas del planeta. Se cataloga como una de las cinco plagas más importantes de Sudamérica, al punto de que en muchas ocasiones se opta por no sembrar cultivos atacados por estas hormigas. Esta especie ataca y defolia cultivos de importancia económica y alimenticia como algodón (*Gossypium spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), yuca (*Manihot esculenta*), maíz (*Zea mays*), caucho (*Hevea brasiliensis*) [91], caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), papa china (*Colocacia esculenta*), café (*Coffea arabica*), uva (*Vitis vinifera* L.), plátano, arroz (*Oryza sativa* L), tomate (*Solanum lycopersicum* L), cebolla junca (*Allium fistulosum* L), caña panelera (*Saccharum officinarum* L), coco (*Cocos nucifera*), ñame (*Dioscorea trifida* L), árbol del pan (*Artocarpus altilis* Parkinson), papaya (*Carica papaya* L), marañón (*Anacardium occidentale* L), borojó (*Borojoa patinoi*), chontaduro (*Bac-tris gasipaes* Kunth), piña (*Ananas comosus* L), lulo (*Solanum quitoense* Lamark), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), limón (*Citrus × limon* Burms) [92], cedro (*Cedrela odorata* L), guerregue (*Astrocaryum standleyanum* von Martius), guamo (*Inga spuria* Humb y Bonpl) y eucalipto (*Eucalyptus sp*), entre otras [3]. Adicionalmente, se tiene daño a edificaciones y carreteras [14], [93]. En Colombia afectan la costa Atlántica, los santanderes, los llanos orientales, la zona cafetera y los departamentos de Tolima, Huila, Antioquia, Chocó y Valle del Cauca. Este efecto nocivo se ve incrementado por control inapropiado o la falta de este. Además de su capacidad de multiplicación, la reina pone de 3.000 a 5.000 huevos por día y alcanza a vivir hasta quince años [94].

Atta cephalotes (Linnaeus, 1758), se encuentra distribuida por toda Colombia, especialmente en las regiones Pacífica y Andina. Por su actividad defoliadora afecta cultivos como algodón (*Gossypium L.*), cacao (*Theobroma cacao L.*), yuca (*Manihot esculenta* Crantz), maíz (*Zea mays L.*), caucho (*Hevea brasiliensis* Mull. Arg.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum L.*) y cítricos [101], [141]. Es considerada una plaga que puede consumir entre 50 y 150 kg de material vegetal por día. Adicionalmente, se ha reportado daño a edificaciones y carreteras por la desestabilización de los suelos a causa de la remoción de tierra en la construcción de hormigueros [11]. Se estima que el consumo diario de hojas por hormiguero varía entre los 50 y los 150 kilos, lo que en pérdidas económicas se traduce en,

por lo menos, mil millones de dólares anuales para los cultivos en América, en especial en estado de plántulas [95]. En Colombia, solo en el departamento de Valle del Cauca se destinaron 320 millones de pesos en el 2010 para el control, ya que en este departamento la hormiga afecta más de 500 000 hectáreas y es responsable del 40 % de las pérdidas [96], [97]. En cultivos de especies de interés económico y forestal, se estima que se pierde un crecimiento del 10 % en arboles de pino y del 5 % en especies de eucalipto, además de reducciones de producción por hectárea del 3,26 % en *Corymbia citriodora*, 1,78 % en *Eucalyptus tereticornis* y en *Eucalyptus camaldulensis* el 0.68 % [11].

Métodos de control

Entre los métodos de control de la hormiga arriera se encuentran los métodos mecánicos, químicos y biológicos. El control mecánico consiste en la remoción de los hormigueros con la extracción de la hormiga reina y destrucción de las cámaras de cría. Este método presenta una efectividad de aproximadamente el 30 % [11] y es eficiente en nidos menores de 10 m³ [98]. El control químico se fundamenta en la aplicación de insecticidas, que generalmente tienen como componentes activos sulfluramida, fipronil, deltametrina, cloporifos y fenitrotión, los cuales pueden presentar riesgos para la salud humana [99]-[101] (Anexo 4). Por su bioconcentración, bioacumulación y biomagnificación en el ecosistema [122], [142], [143], están asociados al desarrollo de resistencia en plagas de impacto económico, como las garrapatas (*Rhipicephalus*; *Boophilus microplus*) [100], los ácaros (*Phenacoccus solenopsis*) [112] y la hormiga de fuego (*Solenopsis invicta*) [110]. Ahora bien, el control químico es más efectivo por nebulización térmica, lo cual, sin embargo, no garantiza la esparción de los componentes activos por la totalidad de las cámaras del hormiguero, pero sí incrementa la contaminación del suelo y los costos [127], además de que no logra afectar la totalidad del hormiguero y tiene efectos nocivos en la salud y el medioambiente.

Entre los efectos a la exposición del sulfluramida se encuentra la reducción en la producción de anticuerpos [102], alteraciones morfológicas en fetos, pérdida de peso, alteraciones en el esqueleto y en tejidos urogenitales [103] y daños renales [104], efectos observados en modelos de estudio animal. Si bien son escasos los casos presentados en humanos, en estos se pueden observar alteraciones en el desarrollo cerebral [105]. El fipronil permanece en suelos y cuerpos de agua –en estos últimos en condiciones de anaerobiosis– y se transforma en fipronil-sulfide y fipronil-sulfode, compuestos altamente tóxicos y acumulables en organismos acuáticos y en el suelo [106], [107], induciendo así la apoptosis en hepatocitos (observada en murinos) [108] y daños en células neuronales humanas (línea

SHSY5Y) asociados a deterioro mitocondrial y reducción de oxígeno [109]. Su uso extensivo ha permitido el desarrollo de resistencia en insectos [110] y ácaros [112]. Los efectos en la salud y el ambiente no son diferentes en el caso de la deltametrina. La exposición a insecticidas con este componente afecta el sistema inmune y produce apoptosis en timocitos [24] causando así daño neurodegenerativo [113] y daño renal en mamíferos, [114]-[116]. Su uso continuo no solo contamina suelos y cuerpos de agua, sino que también genera resistencia en insectos de importancia económica como garrapatas (*Rhipicephalus*; *Boophilus microplus*) [117] y ácaros (*Typhlodromus pyri*) [118]. Por último, fenitrotión (Sumithion®) que al igual que los anteriores produce daño en riñones e hígado [116], [119], [120], tiene también efectos mutagénicos durante su biodegradación en condiciones aeróbicas [121] y como es de esperarse, daños ambientales [106], [107], [122]-[124]. Su permanencia o la de sus residuos tóxicos en diferentes productos almacenados es preocupante, ya que posee efectos adversos a la salud [115]. Los efectos a la exposición al clorpirifós son neurotoxicidad en células para la enfermedad de Huntington [99], resistencia en *Phenacoccus solenopsis*, insecto considerado plaga en el algodón [112] y a nivel ambiental estimula la producción de metano, gas que contribuye al calentamiento global [125]. Al efecto descrito, se suma la incidencia de envenenamiento por insecticidas, que en países desarrollados se estima en 18,2 por cada 100 000 trabajadores, y en países en desarrollo en aproximadamente 35 por cada 100 000, esto sin incluir eventos por exposición en infantes [126].

Investigación sobre biocontrol de hormiga arriera

Por las razones mencionadas anteriormente, para el control de esta especie es prioritario el desarrollo y empleo de soluciones amigables con el ambiente, la salud del agricultor y de bajo costo. Entre estas opciones se encuentra el empleo de extractos vegetales [144], [145]. Un estudio desarrollado con *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* y *Mentha piperita*, mostró un efecto inhibitorio del 100 % sobre el hongo *L. gongylophorus* (hongo simbiote) aislado de hormigueros en Brasil, en condiciones de laboratorio y a concentraciones 100mg/mL [128]. Otro estudio en Valle del Cauca, empleó extracto de *Tithonia diversifolia* en etanol. Mediante aspersión e ingestión en hormigas soldado, mostró una mortalidad del 89,8 % y 72,5 % respectivamente, y del 97,5 % cuando fue empleado en forma de liofilizado [129]. *Canavalia ensiformis* mostró reducción del hongo en un 95,3 % y una mortalidad del 66,6 % [130]. *Carica papaya* inhibió el crecimiento del hongo en 100 %; la inoculación de cebos con *Anacardium occidentale* extraídos con diclorometano, etil acetato y metanol, produjeron en laboratorio una mortalidad del 100 % en hormigueros [131]. La Corporación Colombiana

de Investigación Agropecuaria (Corpoíca) sugiere el empleo de cultivos trampa tóxicos para el cultivo del hongo de las hormigas, como lo son higuerilla (*Ricinus comunis*), el ajonjolí (*Sesamum indicum*) y la batata (*Ipomoea batata*). Y para el control de la población, el uso de hojas pulverizadas de tres especies vegetales: catalina (*Clibadium asperum*), chirinchao (*Phyllanthus acuminatus*) y mirasol (*Tithonia diversifolia*). Aplicadas en forma de cebo, reducen significativamente la actividad de las hormigas arrieras (*A. columbica* y *A. cephalotes*) durante un período aproximado de siete a ocho semanas [132]. Sin embargo, se aconseja el uso integrado con otros sistemas de control para garantizar la efectividad.

El control mediante acción de hongos emplea diferentes tipos entomopatógenos, definidos como aquellos que infectan insectos y hongos antagonistas. Estos últimos se caracterizan por parasitar otras especies fúngicas [133]. Dentro de los hongos antagonistas se destacan las especies *T. lignorum*, *T. virens*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. pseudokoningii* (Rifai), *T. koningii*, *T. aureoviride* y *T. longibrachiatum*, las cuales han demostrado tener actividad antagónica efectiva en bacterias y hongos [134]-[136]. Este puede ser empleado directamente o en compostaje, que además de ayudar con la nutrición de plantas, las protege contra hongos patógenos [74], [137]. En estudios desarrollados para el control de la hormiga arriera se ha empleado formulaciones con *Metarhizium anisopliae* [138], *Metarhizium anisopliae* y *Trichoderma viride*, las cuales demuestran mayor efectividad (80 % de mortalidad) que Pirimifos Metil (60 % mortalidad) en campo [139]. Estudios similares *in vitro* demostraron la efectividad de *Trichoderma sp* y *Gliocladium sp*, contra *Attamices sp*, con valores del 86,2 % de inhibición [140]. En Colombia, entre los productos comerciales empleados se encuentran Arrieril, cebo con esporas de *Trichoderma sp*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopleae*; Trichobiol cuyo componente activo es *Trichoderma sp*. Bassianil que contiene esporas de *Beauveria bassiana* Metabiol, el cual contiene esporas de *Metarhizium anisopliae* y Vertilec que contiene esporas de *Verticillium lecanii*

Entre los métodos biológicos se encuentra el empleo de cultivos trampa [146], los cuales reducen temporalmente la población del hormiguero sin eliminarlo definitivamente, razón por la cual se recomienda el acompañamiento de otros mecanismos de control para garantizar la efectividad [11]. Por todo lo mencionado, el uso de controles biológicos en la agricultura ha ido creciendo continuamente. Dentro de estos se han utilizado cada vez más biocontroles compuestos por esporas de hongos filamentosos, como es el caso de *B. bassiana* cuyas esporas atacan al insecto plaga (hormiga arriera) y *Trichoderma sp.*, que se caracteriza no solo por atacar el insecto sino también por parasitar otras especies fúngicas que afectan a cultivos agroindustrialmente importantes [147].

Debido a los impactos negativos de la hormiga arriera en la seguridad alimentaria y en la economía de la región y el país, se hizo necesario desarrollar y evaluar la capacidad de un bioinsecticida compuesto por esporas de *B. bassiana* (ATCC MYA-4886) y *T. lignorum* (ATCC 8751), para el control de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*) en condiciones de laboratorio y campo.

Métodos

Fase de laboratorio

En esta investigación se emplearon cepas de *Beauveria bassiana* (ATCC MYA-4886) y *Trichoderma lignorum* (ATCC 8751), crecidas en medio PDA (agar, papa, dextrosa), incubadas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 5 días. Las esporas se colectaron por raspado de la superficie y posterior filtrado, luego de lo cual se depositaron en 500 mL de YPD (*Yeast Extract, Peptone, Dextrose*) y ajustando a 1×10^6 esporas/mL empleando un hemocitómetro Neubauer [148]. En un fermentador (BIOSTAT® B) se puso el inóculo en 4L de YPD, para su crecimiento durante cuatro días, a 20 rpm de agitación, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y pH de 5,4 [149], [150]. Finalizado el crecimiento, se prosiguió a la corroboración de las especies fúngicas crecidas y al posterior conteo de esporas.

Se desarrollaron cinco formulaciones con las siguientes relaciones: (1:1), (6:4), (4:6), (3:7), (2:8) de *Beauveria bassiana* y *Trichoderma lignorum* (Formulaciones A, B, C, D y E, respectivamente) a una concentración de 1×10^9 esporas/mL de cada uno de los hongos. Se evaluaron viabilidad, pureza, patogenicidad y pH de cada una de las formulaciones experimentales.

Prueba de viabilidad

La viabilidad se determinó como la relación entre las esporas germinadas por cada 100 [151]. Para esto, se depositó en medio agar-agar (5 mL en caja de Petri y 100 μL en cubreobjetos), diluciones de (1:4) y de (1:20) de cada formulación y se incubaron a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, seguidamente se tiñó con azul de lactofenol y se observó a 40X realizando conteo por triplicado.

Prueba de pureza

La existencia de organismos contaminantes en las formulaciones se evaluó depositando 100 μL (1×10^2 esporas/ μL) en cajas de Petri con PDA (papa, dextrosa, agar) y AN (agar nutritivo). Estas se incubaron por diez días a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, evaluando

diariamente la presencia de colonias de organismos contaminantes. El porcentaje de pureza se determinó como la relación entre las unidades formadoras de colonias de los microorganismos contaminantes y las unidades formadoras de colonia de las especies fúngicas del insecticida por 100. En todas las formulaciones se determinó el pH, tomando 1 mL de la formulación y se depositaron en 9 mL de agua ultrapura estéril y luego se prosiguió a cuantificar el valor del pH.

Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se hizo por triplicado. Se emplearon 30 individuos de *Atta cephalotes* (cortadoras) por cada formulación. Cada individuo se desinfectó por inmersión en una solución de 0,5 % de etanol [152], secando y sumergiendo por treinta segundos en cada una de las formulaciones, retirando el exceso con papel absorbente y depositándolos en frascos estériles a 28 °C y humedad relativa del 80 %. Se empleó como solución de inmersión negativa agua estéril [153]. Se registró diariamente la muerte de individuos y el crecimiento fúngico.

Fase de campo local

Esta fase se hizo en once hormigueros (Tabla 3) presentes en el campus de la Universidad de San Buenaventura Cali. Se inocularon 10 mL/m² de las soluciones Mycotrol (*Beauveria bassiana*), Micobac (*Trichoderma lignorum*), y la formulación con mayor patogenicidad a una concentración final de 1x10⁹ conidias/mL, en las semanas 2, 7 y 11. Para cada hormiguero se estimó el flujo de hormigas [154], medido como el número de hormigas que salían de este en un lapso de cinco minutos (entre las 17:00 y las 18:00 horas). Cada conteo se hizo diariamente por triplicado durante 14 semanas. Adicionalmente, se registró el área de los hormigueros.

Tabla 3

Características de los hormigueros empleados para las pruebas de campo de los diferentes bioinsecticidas

Características	Mycotrol (<i>B. bassiana</i>)			Mycobac (<i>T. lignorum</i>)			Control		Formulación A		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	T1	T2	R3
Longitud (m)	7,23	6,45	8,33	4,57	5,6	6,2	7,25	6,23	6,32	4,15	5,43
Ancho (m)	3,15	2,78	4,12	3,37	3,17	3,30	2,8	4,27	2,75	4,76	3,86
Área (m ²)	22,77	17,93	34,32	15,40	17,75	20,56	20,3	26,60	17,38	19,754	20,96

R= cada uno de los hormigueros

Fase de campo externo

Las pruebas de campo externo se efectuaron en 49 hormigueros, en 14 localidades colombianas con diferentes características de suelo, clima (temperatura) y pluviosidad (precipitación) (Tabla 4), a los cuales se les aplicó el bionsecticida experimental como se describió previamente. Su efectividad se estimó como el promedio de flujo de hormigas expresado como porcentaje y se calculó como la relación entre el porcentaje inicial y el observado al finalizar cada uno de los rangos de tiempo estimados (semanas 4, 8 y 12). Adicionalmente, se clasificaron los nidos intervenidos según su área (pequeño: menor de 10 m², mediano: entre 10 m² y menor de 50 m² y grande: mayor de 50 m²). Se incluyó el monitoreo de 14 hormigueros no intervenidos como control negativo. Al finalizar el monitoreo (12 semanas) se recolectaron 14 individuos muertos, los cuales se depositaron en cajas de Petri con PDA y YPDA y se incubaron por diez días a 30 °C, monitoreando el crecimiento fúngico.

Tabla 4

Distribución geográfica de los hormigueros intervenidos en la prueba de campo II

Departamento	Localidad	Altura (msnm)	Pluviosidad anual	H.R (%)	T(°C)	Coordenadas de los nidos intervenidos
Chocó	Lloró	65	7774	84	26,9	5°29'46.0"N 76°32'06.5"W
						5°29'59.0"N 76°32'19.7"W
						5°30'53.3"N 76°32'32.9"W
						5°31'11.7"N 76°32'36.1"W
	Atrato	43	12000	84	30	5°31'30.5"N 76°38'08.6"W
						5°31'54.1"N 76°38'29.4"W
5°31'47.9"N 76°38'34.9"W						
Valle del Cauca	Buenaventura	7	7328	60	30	3°57'14.8"N 76°58'45.4"W
						4°00'00.3"N 76°57'33.7"W
						3°59'50.1"N 76°58'45.4"W
	Bugalagrande	941	941	40	28	4°11'27.7"N 76°10'07.6"W
						4°12'59.5"N 76°09'15.5"W
						4°11'42.1"N 76°09'50.9"W
	Caicedonia	1100	1872	60	22,4	4°19'48.7"N 75°48'42.7"W
						4°20'06.6"N 75°48'48.4"W
						4°19'27.7"N 75°48'58.4"W

Cundinamarca	Tocaima	400	1260	NA	27,0	4°27'12.2"N 74°37'11.0"W
						4°27'05.5"N 74°38'23.7"W
						4°25'47.0"N 74°38'49.8"W
						4°26'19.9"N 74°37'55.5"W
Sucre	Sincelejo	213	1164	54	26,6	9°18'24.4"N 75°21'29.1"W
						9°18'01.0"N 75°21'35.8"W
Magdalena	Santa Marta	2	512	52	28,3	11°17'33.7"N 4°00'01.5"W
						11°17'37.5"N 4°00'00.8"W
						11°17'40.8"N 4°00'00.9"W
Córdoba	Montería	18	1225	66	27,4	8°46'41.4"N 75°58'26.3"W
						8°47'59.3"N 75°57'17.1"W
						8°48'34.6"N 75°56'20.6"W

H.R (%) = porcentaje de humedad relativa; T = temperatura; msnm = metros sobre el nivel del mar

Análisis estadístico

En las pruebas de campo I (local) y II, cada hormiguero sometido a un mismo tratamiento se consideró réplica y el del flujo de hormigas (hecho por triplicado cada día, durante 14 semanas) como repetición. La eficacia del tratamiento se estimó como el valor porcentual de la relación entre el flujo de hormigas po-sexposición y preexposición. Las diferencias entre los tratamientos se evaluaron mediante Anova y prueba de Tukey ($\alpha = 0,05$) (*software* SPSS 20.0), empleando el promedio de conteos diarios de flujo de hormigas obtenidos para cada período de semana en las pruebas de campo, previo cumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas y distribución normal.

Aspectos éticos

Para la ejecución de la investigación se contó con el aval ético Ing7I15, otorgado por el comité de ética de la investigación de la Universidad de San Buenaventura Cali y el aval 0023 del 2017, del comité de ética animal Ciecuae de la Universidad Icesi.

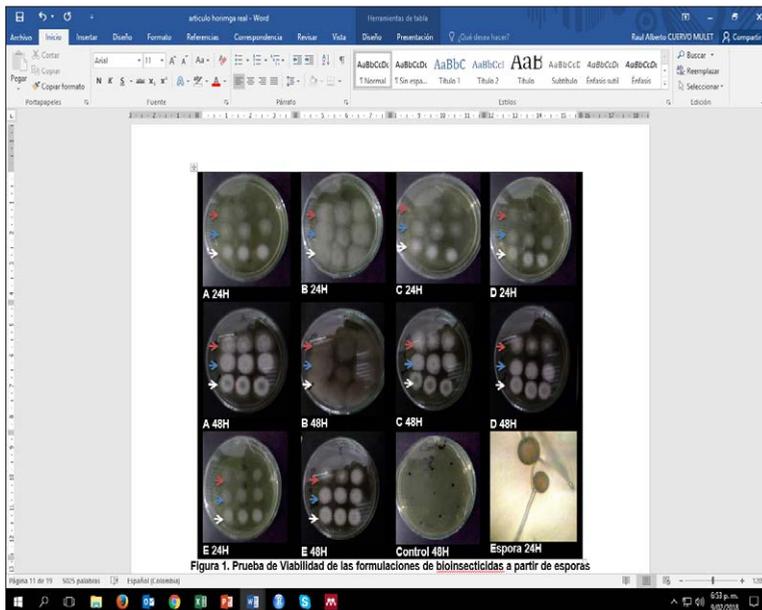
Resultados

Fase de laboratorio

La prueba de viabilidad en cajas de Petri mostró crecimiento a 24 y 48 horas de la totalidad de las formulaciones en sus diferentes diluciones (1:20), (1:4) y formulación pura. No se observó crecimiento en la caja designada como control (Figura 3). Las esporas contenidas en la formulación presentaron viabilidad de 90 % a 92 %, y la mayor viabilidad se observó en las esporas contenidas en la formulación B. No se registró crecimiento de organismos diferentes a *B. bassiana* y *T. lignorum* en las pruebas de pureza de las soluciones de esporas individuales, a partir de las cuales se hicieron las diferentes formulaciones. Resultados similares se observaron al evaluar la pureza de cada una de las formulaciones.

Figura 3

Prueba de viabilidad de las formulaciones evaluadas de bioinsecticidas



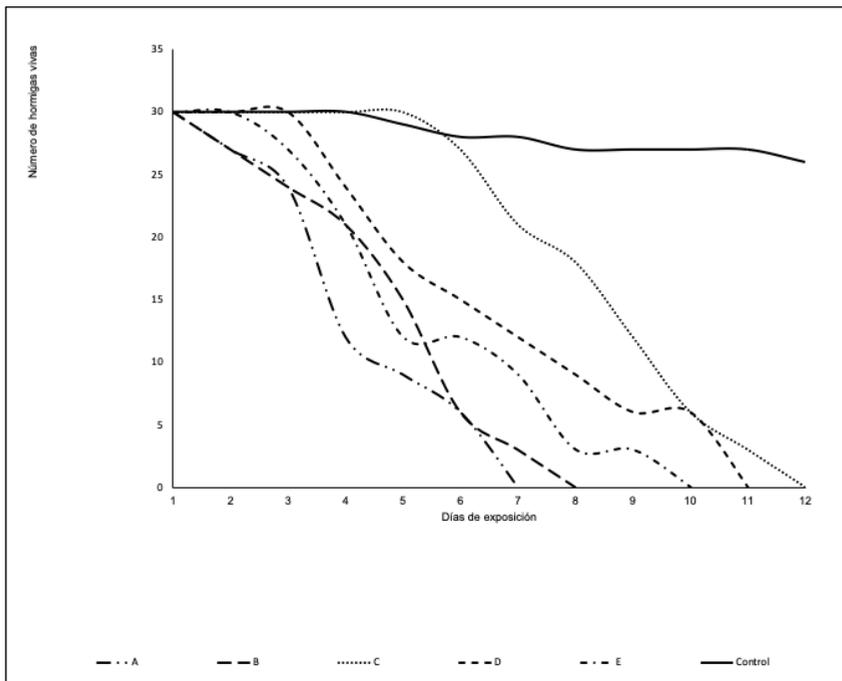
Las formulaciones se designaron con las letras de la A a la E. En estas se observa el crecimiento de las diluciones 1:20 (indicado por flecha de color rojo), 1:4 (indicado por flecha de color azul), y formulación pura (indicado por flecha de color blanco) a 24 y 48 horas. Adicionalmente, se observa la placa control (los puntos negros corresponden a los lugares de siembra) y la viabilidad de las

esporas a 40X. En la placa se puede identificar la germinación de la espora y el crecimiento de la hifa. Según la relación de los hongos, se observó el crecimiento mayor o menor de una especie en particular. Un caso es la formulación B, en la cual se observa la dominancia de la especie *T. lignorum* y pequeños bordes asociados a *B. bassiana*, los cuales se redujeron proporcionalmente a la relación de *T. Lignorum* en las formulaciones.

Las formulaciones con mayor patogenicidad fueron A y B, medida como la muerte de la totalidad de los individuos en menor tiempo, seguidas en el orden por las formulaciones E, D y C, en las que se observó la muerte de la totalidad de las hormigas a los días 8, 9, y 10, respectivamente (Figura 4).

Figura 4

Prueba de patogenicidad en laboratorio para cada una de las formulaciones, en donde se relaciona el numero de hormigas vivas con los días de exposición. Las letras corresponden a las formulaciones evaluadas.



En los individuos expuestos a las formulaciones A, B, C, D, y E, se observó crecimiento fúngico corroborándose así la infección por las esporas que las constituyen (Figura 5).

Figura 5

Prueba de patogenicidad de las formulaciones.

Se observa el crecimiento fúngico (indicado por flecha color azul) en las hormigas después de la exposición a cada una de las formulaciones (letras en recuadro).



Fase de campo local

Se emplearon en total once hormigueros. El 50 % presentaban tres bocas de salida y entrada de las hormigas, con una longitud promedio de 5,86 m y una amplitud promedio (ancho) de 3,38 m. El área de los hormigueros osciló entre 15 m² y 23 m². La temperatura en esta fase se mantuvo en un rango entre 22° C y 32 °C. En promedio, el flujo de hormigas se observó entre 90 a 103 para la semana 1 (semana sin inoculación). La mayor reducción en el flujo de hormigas respecto al flujo inicial se observó en las semanas 6 (29,54 % a 52,26 %), 12 (entre 66 % a 97 %) y 14 (87,9 % a 100 %), y un incremento promedio del 30,6 % en los controles. La mayor efectividad correspondió a la formulación A (esporas de *B. bassiana* y *T. lignorum*, patente A01N 65/00). Se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y los diferentes tratamientos evaluados en la prueba de campo local (Tabla 5).

Tabla 5
Efectividad en campo local de la formulación

Tratamiento		n	Semana 1	Semana 61		Semana 122		Semana 143	
<i>Trichoderma lignorum</i>	R1	5	100	66,67 2,09	bc	32,07 1,52	de	22,83 0,76	d
	R2	5	100	71,34 3,29	c	31,96 2,39	d	23,60 0,8	d
	R3	5	100	78,91 2,83	d	35,87 1,88	e	25,87 + 0,91	c
<i>Beauveria bassiana</i>	R1	5	100	59,50 4,62	b	13,45 2,02	b	13,90 0,90	b
	R2	5	100	48,82 4,6	a	15,65 2,45	b	12,90 1,58	b
	R3	5	100	51,61 3,79	a	16,27 + 1,65	b	10,04 0,71	f
Formulación	R1	5	100	48,6 1,96	a	3,88 0,86	a	0	*
	R2	5	100	50,84 150	a	1,86 1,73	a	0	*
	R3	5	100	45,22 0,86	a	2,72 1,57	a	0	*
Control	R1	5	100	101,57 4,10	e	122,85 1,34	c	130,06 1,65	e
	R2	5	100	109,02 4,34	e	124,27 1,83	c	131,31 0,82	e

Los valores corresponden al porcentaje de flujo de hormigas, calculado respecto al valor de la semana 1 \pm una desviación estándar (S.D.). Las letras iguales identifican grupos con medias similares según la prueba deTukey para un $\alpha = 0,05$.

$${}^1F = 3076,408 \text{ df} = 10 \text{ p} = 0,0001$$

$${}^2F = 3080,971 \text{ df} = 10 \text{ p} = 0,0001$$

$${}^3F = 11934,834 \text{ df} = 7 \text{ p} = 0,0001$$

Fase de campo externa

En total se intervinieron 108 hormigueros (54 control, sin inoculación y 54 inoculados con el bioinsecticida), en 17 localidades y se observaron diferencias en la efectividad asociada al tamaño del nido y de contraste en regiones, en las cuales se logró el control de hormigueros de más de 10 m² en un promedio de cuatro semanas (30 días). En hormigueros de tamaño mediano, el promedio de control se observó en promedio de ocho semanas (60 días) y en hormigueros grandes se registró reducción de más del 80 % (flujo de hormigas de 20 %) al transcurrir ocho semanas. Se lograron observaciones de valores de 0 % de flujo transcurridas doce semanas. Las variaciones de las agrupaciones entre tamaño de hormigueros, se asociaron a diferencias entre estos en cada localidad. Esta efectividad se ratificó con los resultados de monitoreo a las catorce semanas, en las cuales el flujo de hormigas permaneció en 0 %. El bioinsecticida no presentó efectividad en localidades lluviosas como las evaluadas en el departamento de Chocó y Buenaventura en el departamento del Valle del Cauca (Tabla 6).

Tabla 6
 Porcentajes de flujo de hormigas en las pruebas de campo externas (flujo promedio del final del periodo/ flujo inicial)

Localidades	Base (%)	< 10 m2			> 30 m2			Control*			
		6	12	14	6	12	14	6	12	14	
Antioquia											
Grandeza	100	0	0	0	0	56,24(0,80)	12,75(0,72)	0	1 a 3 (0,95-2,71)	1 a 4 (0,88-2,12)	1 (0,56-1,84)
San Rafael	100	1,78(1,25)	0	0	0	9,52(3,26)	0	0	1 a 2,25 (1,38-2,41)	1 a 4 (1,41-3,16)	1 (1,56-3,18)
Yumbo	100	19,47(3,92)	0	0	0	63,39 (1,99)	3,03(1,78)	0	1,57 a 4,34 (1,39-2,54)	2 a 4 (1,08-2,33)	1 (0,98-3,17)
Chocó											
Atrato	100					67,28 (0,88-3,00)	101,46(3,49-4,67)		2 a 3 (1,51-4,61)	0,5 a 3 (1,37-3,25)	0,5(0,9 (1,95-3,03)
Lloró	100					48 (0,62-0,99)	100 (0,72-1,06)		100,74 + 1,00	1 a 3 (2,15-2,36)	1 (1,06-3,08)
Medio Atrato	100					75,38 (1,74)	95,47 (1,65)		1 a 3 (2,48-4,39)	1 a 2 (1-2,97)	1-2 (1,17-4,45)
Córdoba											
Montería	100	0,33 (0-1,44)	0	0					1 a 4 (2,39-2,87)	2 a 3 (2,74-3,96)	1 a 3 (3,10-4,39)
Cundinamarca											
Fusagasugá	100	0,32(0,72)	0	0		18,6(6,66)	0				
Tocaima	100	2 (1,31-1,80)	0	0		8,44(1,10)	0,62 (1,10)		1 (3,43-7,00)	2 a 3 (3,90-6,30)	1 (3,91-6,65)
Huila											
La Argentina	100	0	0	0		14,79 (2,31)	0		1 a 3 (1,91-2,76)	1 (3,20-3,74)	0,3 (1,31-3,00)
La Plata	100	0,32(0,72)	0	0		29 (0,52-0,63)	7 (0,49-4,25)		1,5 (1,33-3,76)	2 (1,37-3,24)	0,4 (1,51-3,00)
Tesalia	100	0	0	0		23,0(3,72)	4,98(2,03)				
Magdalena											
Santa Marta	100	0,30(0,64)	0	0		13,11 (1,31)	0		1 (3,58-5,73)	2 a 4 (2,17-5,75)	0,5 (2,42-4,94)
Sucre											
Sucumbio	100	1,2 (0,59-1,71)	0	0					1 (4,59-7,59)	1 (2,54-7,66)	0,5 (3,96-7,41)
Valle del Cauca											
Buenaventura	100					60 (2,07-2,18)	101 (0,28-3,01)		1 a 3 (0,9-3,06)	2 a 4 (0,92-2,66)	0,5 (0,90-2,25)
Bugabogrande	100	19,35(1,77)	0	0		27 (1,25-4,68)	0		1 a 2 (1,21-1,56)	2 a 3 (0,81-2,02)	1 (0,75-1,86)
Catcedonia	100					29 (0,51-2,34)	1,90 (0,5-1,15)		1 a 3 (0,63-1,82)	1 a 3 (1,40-1,69)	0,9 (1,08-1,72)
Darién	100					18 (1,42-2,39)	0		1 a 2 (0,95-1,80)	2 a 3 (0,88-3,16)	1 (1,44-2,86)

* = valor porcentual promedio del incremento del flujo de hormigas. Los valores entre paréntesis corresponden al error estándar en porcentaje. 54 hormigueros controles y 54 tratados.

Prueba de campo Antioquia

En el departamento de Antioquia, las pruebas se realizaron en los municipios de Girardota, San Rafael y Yolombó. En Girardota, los hormigueros se presentaron frecuentemente en la zona urbana-rural, con daños asociados a infraestructuras (remoción en cimientos de carretera y de edificios). El 75 % fueron hormigueros menores a 10 m², encontrados en predios correspondientes a fincas, cafeteras y de cítricos.

La aplicación del bioinsecticida permitió el control de los hormigueros evaluados en los municipios de Girardota, San Rafael y Yolombó, en los cuales se observó la reducción del flujo de hormigas de 86,77 % a 100 %; 90,48 % a 98,22 % y de 80,53 %, en hormigueros pequeños (menores a 10 m²) respectivamente, a la sexta semana de evaluación, y del 100 % para las semanas doce y catorce. Se observaron hormigueros medianos (entre 10 m² y menores de 50 m²) en Girardota y Yolombó, en los cuales la reducción del flujo de hormigas fue de 43,66 % y 36,61 % a 38,80 % en la semana sexta, de 87,25 % y 79,55 % a 96,17 % en la semana 12, y del 100 % para la semana catorce. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y bioinsecticida para las estimaciones de flujo de hormigas en las semanas 6, 12 y 14 (Tabla 7 y Figura 6).

Tabla 7

Efectividad de la formulación en las pruebas de campo en localidades en el departamento de Antioquia

Tratamiento		n	Semana 1	Semana 61		Semana 122		Semana 143	
Girardota	R1*	5	100	0	a	0	ab	0	ab
	R2*	5	100	13,23 + 0,68	b	0	ab	0	ab
	R3**	5	100	56,24 + 0,80	c	12,75 + 0,72	c	0	ab
	C1**	5	100	103,05 + 2,71	d	105,78 + 2,12	e	109,61 + 1,84	e
	C2*	5	100	101,95 + 1,26	d	104,35 + 1,14	d	105,99 + 0,56	d
	C3*	5	100	101,24 + 0,98	d	101,85 + 0,88	d	103,95 + 1,32	f
San Rafael	R1*	5	100	1,78 + 1,25	a	0	ab	0	ab
	R2*	5	100	9,52 + 3,26	a	0	ab	0	ab
	R3*	5	100	10,12 + 4,65	b	0	ab	0	ab
	C1*	5	100	101,29 + 2,41	c	105,52 + 2,44	c	108,49 + 1,56	c
	C2*	5	100	102,25 + 1,38	c	104,01 + 1,41	c	104,52 + 3,18	c
	C3*	5	100	101,31 + 1,80	c	102,94 + 3,16	c	103,24 + 2,61	d

Yolombó	R1*	5	100	19,47 + 3,92	a	0	ab	0	ab
	R2**	5	100	63,39 + 1,99	b	3,03 + 1,78	ab	0	ab
	R3**	5	100	61,20 + 1,07	c	20,45 + 0,77	ab	0	ab
	C1**	5	100	103,75 + 2,31	d	106,35 + 1,09	de	107,88 + 3,17	de
	C2**	5	100	104,34 + 2,54	d	107,75 + 2,32	d	108,88 + 1,99	de
	C3*	5	100	101,57 + 1,29	d	104,12 + 1,51	de	106,95 + 0,98	de

Los valores corresponden al porcentaje de flujo de hormigas, calculado respecto al valor de la semana 1, + desviación estándar; *hormigueros pequeños; ** hormigueros medianos; ***hormigueros grandes; R= hormigueros tratados con el bioinsecticida y C= hormigueros sin exposición al bioinsecticida. Las letras iguales identifican grupos con medias similares (Tukey $\alpha = 0.05$). F= prueba de Fisher; gl= grados de libertad y p= probabilidad estimada para el valor F.

Girardota

1F= 6042.67 gl= 5 p= 0.0001

2F= 12750.53 gl= 5 p= 0.0001

3F= 18722.90 gl= 5 p= 0.0001

San Rafael

1F= 1735.88 gl= 5 p= 0.0001

2F= 5451.66 gl= 5 p= 0.0001

3F= 5184.48 gl= 5 p= 0.0001

Yolombó

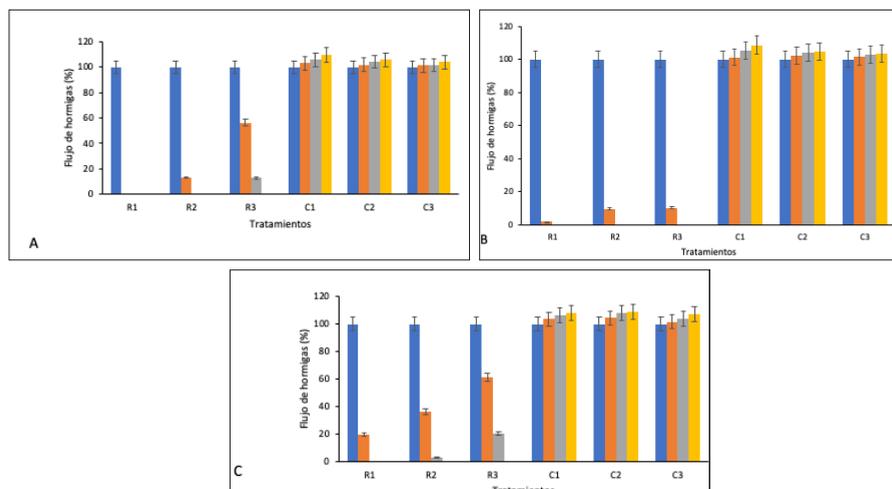
1F= 1249.74 gl= 5 p= 0.0001

2F= 7018.42 gl= 5 p= 0.0001

3F= 7011.74 gl= 5 p= 0.0001

Figura 6

Prueba de efectividad del bioinsecticida en las localidades de Girardota, San Rafael y Yolombó en el departamento de Antioquia.



La figura corresponde al diagrama de barras del comportamiento del flujo de hormigas (%), en relación al flujo estimado en la primera semana (barras de color azul), sexta semana (barras de color naranja), decimosegunda semana (barras de color gris), y decimocuarta semana (barras de color amarillo). Las barras de error corresponden al error estándar (cada flujo fue estimado por triplicado); en el eje x la letra R corresponde a los hormigueros tratados con el bioinsecticida,

y la letra C a los controles. Los número continuos en ambos casos corresponde al hormiguero intervenido. Letras A, B, y C en la parte inferior izquierda de las figuras corresponden a las localidades Girardota, San Rafael y Yolombó, respectivamente.

Prueba de campo Chocó

En el departamento del Chocó, las pruebas se hicieron en los municipios Atrato, Lloró y Medio Atrato en la zona rural donde prevalecían las inundaciones por el río Atrato y en áreas fuera de las fincas donde su control era poco o nulo; así mismo, la instrucción sobre su manejo. El 75 % de los hormigueros encontrados e intervenidos presentaban áreas entre 10 m² y menores de 50 m². En ninguna localidad se logró eliminar los hormigueros luego de las pruebas con el bioinsecticida. Se observó una reducción en el flujo de hormigas entre el 51,74 % y el 3,66 %, Las reducciones del flujo fueron del 3,66 %, 6,30 % y 20 %, para hormigueros de áreas mayores a 50 m², en Atrato, Lloró y Medio Atrato, respectivamente, y del 37,36 %, 51,74 % y 24,62 % en hormigueros entre 10 m² y menores de 50 m², para las primeras cuatro semanas de monitoreo y la recuperación del flujo inicial a partir de la semana doce. Las diferencias estadísticas presentadas se asociaron al promedio y variancias entre mediciones (Tabla 8 y Figura 7).

Tabla 8

Efectividad de la formulación en pruebas de campo en localidades del departamento del Chocó

Tratamiento		n	Semana 1	Semana 6 ¹		Semana 12 ²		Semana 14 ³	
Atrato	R1**	5	100	62,64 ± 0,88	a	100,55 ± 3,49	abcd	101,90 ± 2,44	a
	R2**	5	100	72,55 ± 3,00	b	102,47 ± 4,67	abcd	105,56 ± 3,26	bd
	R3***	5	100	96,04 ± 1,11	c	100,96 ± 1,57	abcd	101,77 ± 2,57	c
	C1***	5	100	103,67 ± 4,61	d	106,49 ± 3,25	abcd	177,77 ± 1,93	e
	C2**	5	100	102,64 ± 2,88	d	104,59 ± 3,09	abcd	104,37 ± 3,03	bd
	C3**	5	100	102,39 ± 1,51	d	103,14 ± 1,37	abcd	104,02 ± 2,04	bd
Lloró	R1**	5	100	47,26 ± 0,99	a	98,97 ± 0,72	ab	100,52 ± 0,98	ab
	R2**	5	100	49,32 ± 0,62	a	96,98 ± 1,06	a	101,67 ± 1,26	cd
	R3***	5	100	93,70 ± 1,68	b	100,74 ± 1,32	abc	100,74 ± 1,00	ab
	C1**	5	100	101,41 ± 0,67	c	102,66 ± 1,6	cd	103,15 ± 3,08	cd
	C2**	5	100	101,13 ± 2,36	c	101,82 ± 2,36	cd	101,82 ± 2,58	cd
	C3***	5	100	100,97 ± 1,20	c	103,63 ± 1,15	e	104,70 ± 1,06	e

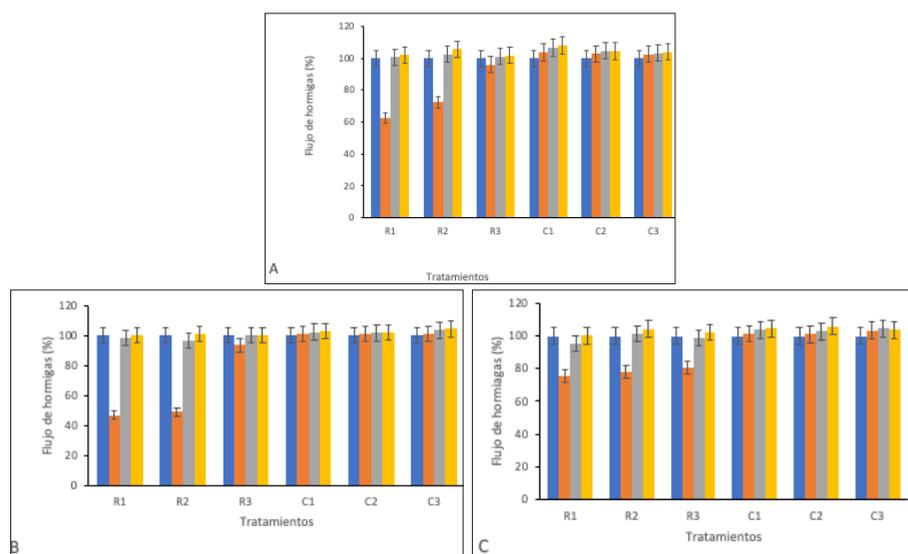
Medio Atrato	R1**	5	100	75,38 ± 1,74	a	95,47 ± 1,65	a	100,03 ± 2,67	a
	R2**	5	100	78,19 ± 3,01	a	101,36 ± 1,83	bcd	103,98 ± 2,73	bcd
	R3***	5	100	80,71 ± 1,55	a	98,71 ± 1,77	cd	102,23 ± 1,43	bcd
	C1***	5	100	101,31 ± 2,43	b	103,88 ± 1,32	bcd	104,66 ± 1,17	bcd
	C2**	5	100	101,01 ± 2,77	b	102,98 ± 2,97	bcd	105,96 ± 1,49	bcd
	C3***	5	100	103,21 ± 4,39	b	104,68 ± 1,00	bcd	103,56 ± 4,45	bcd

Los valores corresponden al p23de flujo de hormigas, calculado respecto al valor de la semana 1, + desviación estándar; * hormigueros pequeños; ** hormigueros medianos; ***hormigueros grandes; R= hormigueros tratados con el bioinsecticida y C= hormigueros sin exposición al bioinsecticida. Las letras iguales identifican grupos con medias similares (Tukey $\alpha= 0.05$). F= prueba de Fisher; gl= grados de libertad y p= probabilidad estimada para el valor F.

Atrato	Lloró	Medio Atrato
¹ F= 222,48 gl= 5 p= 0,0001	¹ F= 2048,00 gl= 5 p= 0,0001	¹ F= 109,32 gl= 5 p= 0,0001
² F= 2,583 gl= 5 p= 0,053	² F= 15,095 gl= 5 p= 0,0001	² F= 17,788 gl= 5 p= 0,0001
³ F= 3,848 gl= 5 p= 0,011	³ F= 3,589 gl= 5 p= 0,015	³ F= 3,181 gl= 5 p= 0,024

Figura 7

Prueba de efectividad den bioinsecticida en las localidades Atrato, Lloró y Medio Atrato en el departamento del Chocó



La figura corresponde al diagrama de barras del comportamiento del flujo de hormigas (%), en relación al flujo estimado en la primera semana (barras de color azul), sexta semana (barras de color naranja), decimosegunda semana (barras de color gris), y decimocuarta semana (barras de color amarillo). Las barras de error corresponde al error estándar (cada flujo fue estimado por triplicado); en

el eje x la letra R corresponden a los hormigueros tratados con el bioinsecticida, y la letra C a los controles. Los número continuos en ambos casos corresponde al hormiguero intervenido. Letras A, B, y C en la parte inferior izquierda de las figuras corresponden a las localidades de Atrato, Lloró y Medio Atrato, respectivamente.

Prueba de campo Córdoba, Cundinamarca y Sucre

El bioinsecticida fue efectivo en las localidades de Montería (Córdoba), Fusagasugá y Tocaima (Cundinamarca) y Sincelejo (Sucre). A la semana sexta de evaluación, en el municipio de Montería la reducción del flujo en hormigueros pequeños (menores a 10 m²) fue entre 99,3 % y 99,7 %. De 98,76 % a 99,68 % para las localidades de Fusagasugá y Tocaima, y del 98,52 % al 99,72 % en Sincelejo. Se alcanzó la eliminación del flujo de hormigas para la semana doce, comportamiento que persistió hasta la semana catorce. En los hormigueros medianos (entre 10 m² y menores de 50 m²), la reducción del flujo de hormigas en la semana seis, fue del 81,4 % al 92,56 % en Tocaima y del 93,8 % al 100 % en Fusagasugá. La reducción del 100 % fue en la semana 12 en Tocaima y en la semana 14 en Fusagasugá. Se observaron diferencias estadísticamente significativas para el flujo de hormigas entre los grupos evaluados (control y bioinsecticida), a las semanas seis, doce y catorce, diferenciándose en grupos independientes (Tabla 9 y Figura 8).

Tabla 9

Efectividad de formulación en pruebas de campo en las localidades de Montería, Tocaima, Fusagasugá y Sincelejo.

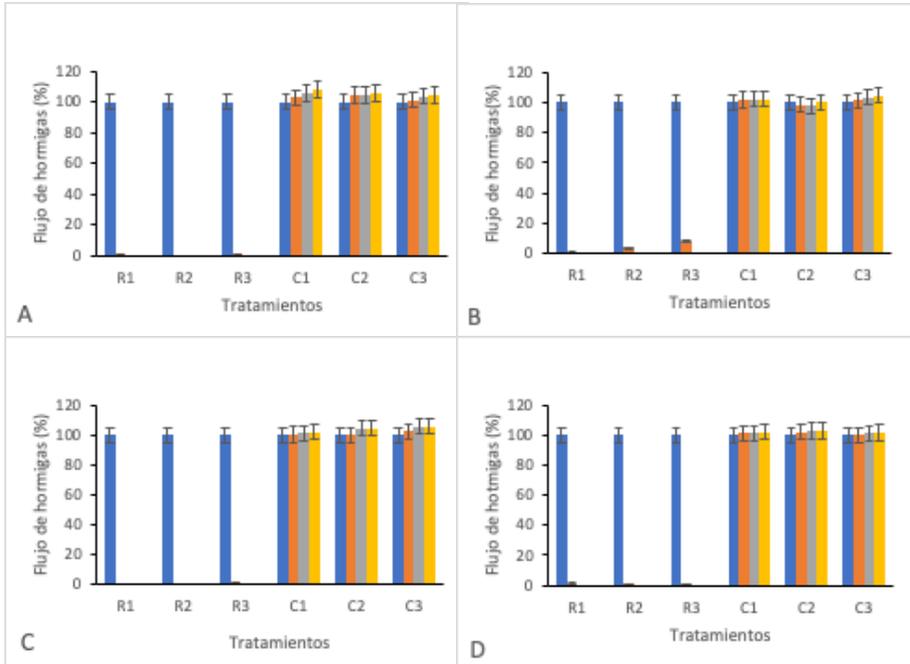
Tratamiento	n	Semana 1	Semana 61		Semana 122			Semana 143	
Montería	R1*	5	100	0,7 + 1,44	a	0		0	
	R2*	5	100	0	a	0		0	
	R3*	5	100	0,28 + 0,21	a	0		0	
	C1*	5	100	102,56 + 2,39	b	105,54 + 3,96	b	108,50 + 4,39	b
	C2*	5	100	104,06 + 2,87	b	104,72 + 3,01	b	105,72 + 3,10	b
	C3*	5	100	101,26 + 2,65	b	103,47 + 2,74	b	104,50 + 3,17	b

Fusagasugá	R1*	5	100	0,32 + 0,72	a	0		0	
	R2*	5	100	0	a	0		0	
	R3**	5	100	18,6 + 6,66	a	0		0	
	C1*	5	100	100,50 + 7,62	b	101,33 + 3,58	b	101,96 + 4,50	b
	C2*	5	100	100,05 + 3,60	b	104,28 + 4,50	b	104,40 + 7,69	b
	C3**	5	100	102,4 + 9,98	b	105,60 + 11,93	b	105,69 + 5,77	b
Tocaima	R1*	5	100	1,24 + 1,31	a	0		0	
	R2**	5	100	4,21 + 1,90	a	0		0	
	R3**	5	100	8,44 + 1,10	a	0,62 + 1,10		0	
	C1**	5	100	101,78 + 7,10	b	102,03 + 3,90	b	102,15 + 6,26	e
	C2*	5	100	98,4 + 5,46	b	97,50 + 4,60	b	100,08 + 3,91	bd
	C3**	5	100	101,13 + 3,43	b	103,46 + 6,30	b	104,70 + 6,65	bd
Sincelejo	R1*	5	100	1,48 + 1,79	a	0		0	
	R2*	5	100	0,26 + 0,59	a	0		0	
	R3*	5	100	1,21 + 1,51	a	0		0	
	C1*	5	100	101,00 + 6,69	b	101,21 + 3,65	b	101,72 + 7,41	b
	C2*	5	100	101,78 + 7,59	b	102,64 + 7,66	b	102,92 + 6,15	b
	C3*	5	100	100,10 + 4,59	b	101,01 + 2,54	b	101,55 + 3,96	b

Los valores corresponden al porcentaje de flujo de hormigas, calculado respecto al valor de la semana 1, + desviación estándar; * hormigueros pequeños; ** hormigueros medianos; ***hormigueros grandes; R= hormigueros tratados con el bioinsecticida y C= hormigueros sin exposición al bioinsecticida. Las letras iguales identifican grupos con medias similares (Tukey $\alpha= 0.05$). F= prueba de Fisher; gl= grados de libertad y p= probabilidad estimada para el valor F.

Montería		Tocaima		Fusagasugá		Sincelejo	
1F=4015,4	gl=5 p=0,0001	1F=842,5	gl=5 p=0,0001	1F= 509,5	df=5 p=0,0001	1F=695,4	gl=5 p=0,0001
2F=3049,4	gl=5 p=0,0001	2F=1201,3	gl=5 p=0,0001	2F= 538,7	df=5 p=0,0001	2F=1184,8	gl=5 p=0,0001
3F=2607,1	gl=5 p=0,0001	3F=954,6	gl=5 p=0,0001	3F= 865,1	df=5 p=0,0001	3F=863,7	gl=5 p=0,0001

Figura 8
 Prueba de efectividad del bioinsecticida en las localidades de Córdoba, Cundinamarca y Sucre.



La figura corresponde al diagrama de barras del comportamiento del flujo de hormigas (%), en relación al flujo estimado en la primera semana (barras de color azul), sexta semana (barras de color naranja), decimosegunda semana (barras de color gris), y decimocuarta semana (barras de color amarillo). Las barras de error corresponden al error estándar (cada flujo fue estimado por triplicado). En el eje X la letra R corresponde a los hormigueros tratados con el bioinsecticida, y la letra C a los controles, los números continuos en ambos casos corresponden al hormiguero intervenido. Letras A, B, C y D en la parte inferior izquierda de las figuras corresponden a las localidades de Montería, Tocaima, Fusagasugá y Sincelejo, respectivamente.

Prueba de campo en los departamentos Huila y Magdalena

La efectividad del bioinsecticida en las localidades La Argentina, La Plata, Tesalia, del departamento del Huila mostró una reducción del flujo en hormigueros pequeños (< 10 m² entre 95,80 % y 100 %, y en Santa Marta, del departamento

del Magdalena del 99,7 % a 100 % y la eliminación de estos a las 12 semanas. En el caso de hormigueros medianos (entre 10m² y menores de 50 m²) la reducción osciló entre 71,69 % y 85,21 % en la semana 6 y de 91,47 % a 100 % en la semana 12 para las localidades de La Plata y Tesalia, reduciéndose al 100 % del flujo en la semana 14. En relación a las pruebas realizadas en el municipio de Santa Marta la reducción fue de 86,89 % a 99,70 % en hormigueros pequeños y medianos respectivamente, observándose diferencias estadísticamente significativas en el flujo de hormigas entre los grupos evaluados (control y bioinsecticida) en las 6, 12 y 14 semanas (Tabla 10 y Figura 9).

Tabla 10

Efectividad de formulación en pruebas de campo en localidades La Argentina, La Plata, Tesalia del departamento del Huila y Santa Marta, del departamento del Magdalena

Tratamiento		n	Semana 1	Semana 61		Semana 122		Semana 143	
La Argentina	R1*	5	100	0	a	0		0	
	R2*	5	100	0	a	0		0	
	R3**	5	100	14,79 + 2,31	a	0		0	
	C1*	5	100	101,21 + 2,38	b	102,71 + 3,34	b	103,30 + 1,31	b
	C2**	5	100	103,14 + 2,76	b	103,97 + 3,20	b	103,70 + 2,24	b
	C3*	5	100	101,72 + 1,91	b	103,92 + 3,74	b	104,13 + 3,00	b
La Plata	R1*	5	100	0,32 + 0,72 +	a	0		0	
	R2**	5	100	29,20 + 0,52	a	8,53 + 3,49		0	
	R3**	5	100	29,31 + 0,63	a	5,75 + 4,25		0	
	C1**	5	100	101,11 + 1,93	b	102,21 + 1,90	b	102,11 + 2,45	b
	C2*	5	100	100,82 + 2,10	b	101,00 + 2,59	b	100,70 + 3,14	b
	C3*	5	100	100,34 + 3,25	b	102,00 + 1,92	b	102,26 + 3,23	b
Tesalia	R1*	5	100	4,20 + 4,7	a	0		0	
	R2**	5	100	23,0 + 3,72	a	4,98 + 2,03		0	
	R3***	5	100	62,71 + 1,28	a	19,01 + 3,24		0	
	C1**	5	100	101,1 + 3,76	b	104,9 + 3,24	b	104,40 + 2,37	e
	C2**	5	100	101,22 + 2,52	b	103,43 + 2,09	b	103,90 + 3,00	bd
	C3*	5	100	101,24 + 1,33	b	102,90 + 1,37	b	0	bd

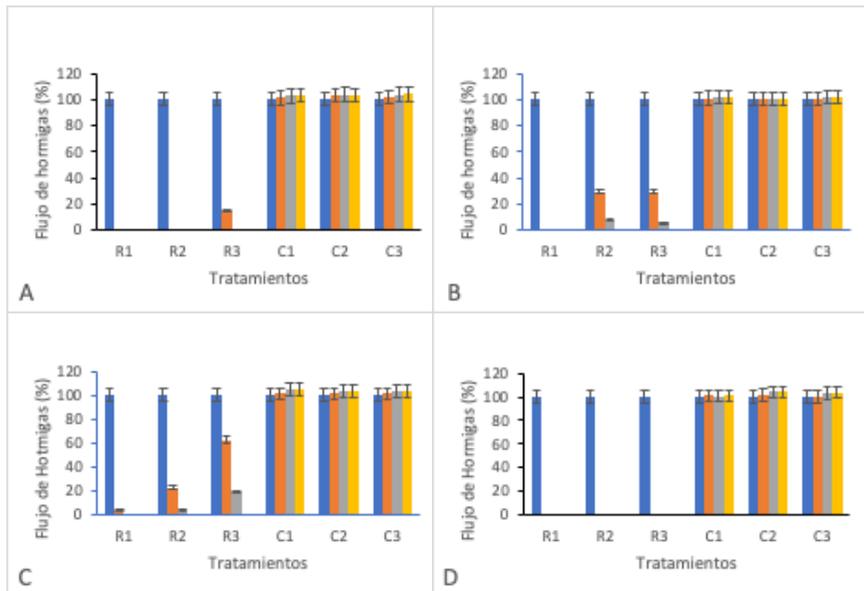
Santa Marta	R1*	5	100	0	a	0		0	
	R2*	5	100	0,30 + 0,64	a	0		0	
	R3**	5	100	13,11 + 1,31	a	0		101,05 + 4,94	
	C1*	5	100	101,08 + 5,73	b	100,73 + 5,75	b	104,00 + 2,42	b
	C2**	5	100	101,18 + 3,58	b	104,00 + 2,17	b	103,80 + 4,40	b
	C3*	5	100	100,1 + 5,55	b	102,70 + 2,83	b	0	b

Los valores corresponden al porcentaje de flujo de hormigas, calculado respecto al valor de la semana 1, \pm desviación estándar; * hormigueros pequeños; ** hormigueros medianos; *** hormigueros grandes; R= hormigueros tratados con el bioinsecticida, y C= hormigueros sin exposición al bioinsecticida. Las letras iguales identifican grupos con medias similares (Tukey $\alpha = 0,05$). F= prueba de Fisher; gl= grados de libertad y p= probabilidad estimada para el valor F.

La Argentina	La plata	Tesalia	Santa Marta
¹ F=3850.46 gl=5 p=0.0001	¹ F=3157.94 gl=5 p=0.0001	¹ F=1002.44 gl=5 p=0.0001	¹ F=1174.16 gl= 5 p=0.0001
² F=2743.35 gl=5 p=0.0001	² F=1918.22 gl=5 p=0.0001	² F=2550.09 gl=5 p=0.0001	² F=2066.60 gl= 5 p=0.0001
³ F=6249.97 gl=5 p=0.0001	³ F=3548.35 gl=5 p=0.0001	³ F=7474.40 gl=5 p=0.0001	³ F=1922.49 gl= 5 p=0.0001

Figura 9

Prueba de efectividad del bioinsecticida en las localidades de los departamentos del Huila y Magdalena.



La figura corresponde al diagrama de barras del comportamiento del flujo de hormigas (%), en relación al flujo estimado en la primera semana (barras de color azul), sexta semana (barras de color naranja), decimosegunda semana (barras de color gris), y decimocuarta semana (barras de color amarillo). Las barras de

error corresponde al error estándar (cada flujo fue estimado por triplicado); en el eje x la letra R corresponde a los hormigueros tratados con el bioinsecticida, y la letra C a los controles. Los números continuos en ambos casos corresponden al hormiguero intervenido. Letras A, B, C y D en la parte inferior izquierda de las figuras corresponden a las localidades de La Argentina, La Plata, Tesalia y Santa Marta, respectivamente.

Prueba de campo en el Valle del Cauca

La efectividad del bioinsecticida en las localidades de Buenaventura, Bugalagrande, Caicedonia y Darién, mostró una reducción del flujo de hormigas en Buenaventura entre 48,40 % y 40,85 % en la semana sexta de monitoreo, seguido de la restauración del flujo para las semanas 12 y 14. En esta localidad no se observó control de los hormigueros intervenidos. En Bugalagrande, Caicedonia y Darién, la reducción del flujo fue entre 63,93 % y 83,70 % en el caso hormigueros medianos (entre 10 m² y 50 m²). Para la semana sexta de monitoreo, se observó una reducción entre 97,66 % y 100 % a la semana 12, y del 100 % para la semana 14. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el flujo de hormigas entre los grupos evaluados (control y bioinsecticida) para las localidades de Bugalagrande, Caicedonia y Darién, a las semanas 6, 12 y 14 respectivamente (Tabla 11 y Figura 10).

Tabla 11

Efectividad de la formulación en las pruebas de campo en localidades de Valle del Cauca

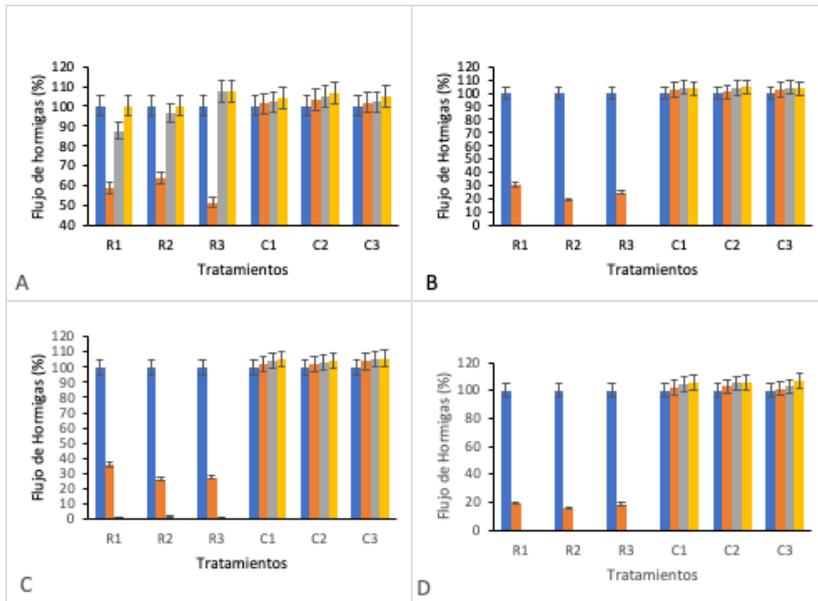
Tratamiento	n	Semana 1	Semana 61	Semana 122	Semana 143	
Buenaventura	R1**	5	100	59,15 + 2,08 a	87,79 + 3,01 a	100,37 + 2,18 ab
	R2**	5	100	63,9 + 2,18 b	96,66 + 1,89 b	100,21 + 1,08 ab
	R3**	5	100	51,60 + 2,07 c	107,24 + 0,58 cd	107,47 + 1,55 cd
	C1**	5	100	101,30 + 0,94 d	102,28 + 0,92 d	104,06 + 1,19 d
	C2**	5	100	103,32 + 0,91 d	104,83 + 1,53 cd	106,63 + 0,90 cd
	C3**	5	100	101,98 + 3,06 d	102,40 + 2,66 d	104,96 + 2,25 cd
Bugalagrande	R1**	5	100	31,16 + 1,25 a	0 a	0
	R2*	5	100	19,35 + 1,77 b	0 a	0
	R3**	5	100	24,82 + 4,08 c	0 a	0
	C1**	5	100	102,60 + 1,15 d	104,40 + 1,70 d	106,00 + 0,75 d
	C2**	5	100	101,06 + 1,56 d	103,82 + 0,81 d	105,60 + 1,86 d
	C3*	5	100	102,51 + 1,21 d	104,01 + 2,02 d	106,00 + 0,76 d

Caicedona	R1**	5	100	36,07 + 1,39	a	1,15 + 1,15	ab	0	ab
	R2**	5	100	26,3 + 2,34	b	2,34 + 0,50	ab	0	ab
	R3**	5	100	27,47 + 0,51	b	1,96 + 0,70	ab	0	ab
	C1**	5	100	102,37 + 1,40	d	104,53 + 1,40	d	105,40 + 1,08	d
	C2**	5	100	101,86 + 0,63	d	103,49 + 1,66	d	104,65 + 1,68	d
	C3**	5	100	103,80 + 1,82	d	105,19 + 1,69	d	105,59 + 1,72	d
Darién	R1**	5	100	19,39 + 2,39	a	0	a	0	a
	R2**	5	100	16,10 + 2,38	a	0	a	0	a
	R3**	5	100	18,55 + 1,42	a	0	a	0	a
	C1**	5	100	101,90 + 1,33	b	104,12 + 0,88	b	105,39 + 1,44	b
	C2**	5	100	102,78 + 0,95	b	105,21 + 1,26	b	105,92 + 2,04	b
	C3**	5	100	101,31 + 1,80	b	102,94 + 3,16	b	106,47 + 2,68	b

Los valores corresponden al porcentaje de flujo de hormigas, calculado respecto al valor de la semana 1, \pm desviación estándar; * hormigueros pequeños; ** hormigueros medianos; ***hormigueros grandes; R= hormigueros tratados con el bioinsecticida, y C= hormigueros sin exposición al bioinsecticida. Las letras iguales identifican grupos con medias similares (Tukey $\alpha = 0.05$). F= prueba de Fisher; gl= grados de libertad y p= probabilidad estimada para el valor F.

Buenaventura	Bugalagrande	Caicedonia	Darién
1F=732.61 gl=5 p=0.0001	1F=2015.85 gl=5 p=0.0001	1F=3259.3 gl=5 p=0.0001	1F=3291.20 gl=5 p=0.0001
2F=63.88 gl=5 p=0.0001	2F=12790.1 gl=5 p=0.0001	2F=9896.9 gl=5 p=0.0001	2F=7901.6 gl=5 p=0.0001
3F=18.20 gl=5 p=0.0001	3F=21992.6 gl=5 p=0.0001	3F=14342.8 gl=5 p=0.0001	3F=7529.7 df=5 p=0.0001

Figura 10
Prueba de efectividad del bioinsecticida en las localidades en Valle del Cauca



La figura corresponde al diagrama de barras del comportamiento del flujo de hormigas (%), en relación al flujo estimado en la primera semana (barras de color azul), sexta semana (barras de color naranja), decimosegunda semana (barras de color gris), y decimocuarta semana (barras de color amarillo). Las barras de error corresponden al error estándar (cada flujo fue estimado por triplicado). En el eje X la letra R corresponde a los hormigueros tratados con el bioinsecticida, y la letra C a los controles, los números continuos en ambos casos corresponden al hormiguero intervenido. Letras A, B, C y D en la parte inferior izquierda de las figuras corresponden a las localidades de Buenaventura, Bugalagrande, Caidonia y Darién, respectivamente.

Discusión

En el presente estudio de laboratorio se demostró que el tratamiento con una formulación con conidias de *B. bassiana* y *T. lignorum*, presenta actividad insecticida sobre *A. cephalotes* y puede ser considerada como una herramienta para el control de esta plaga agrícola. Las diferentes formulaciones evaluadas presentaron letalidad en los individuos. Se encontraron diferencias en el tiempo de muerte de los individuos, así: siete días correspondieron a la relación 1:1 de las conidias de ambos hongos filamentosos. El tiempo de eliminación del insecto se incrementa a mayor relación de esporas de *B. bassiana* respecto de *T. lignorum*.

Estos resultados (tiempo de control) son similares a los reportados en los estudios realizados para *Metarhizium anisopliae* y *Beauveria bassiana* y en la infección de *Atta bisphaerica*, *Atta sexdens* [155] y *Atta sexdens rubropilosa* [156], en los cuales se observó una mortalidad del 100 % de los individuos después de siete días de exposición a las esporas de cada una de las cepas en presentación individual.

El efecto del bioinsecticida evaluado en esta investigación, corresponde al accionar de esporas de *B. bassiana*, especie ampliamente empleada como agente control de diferentes artrópodos considerados plaga [31], [33] y *T. lignorum*, especie asociada al control de hongos por efecto antagónico [135]. El mecanismo de acción de estas especies difiere en el insecto *B. bassiana*, el cual infecta mediante la adhesión de la conidia al exoesqueleto, seguido por la formación del túbulo germinal, la degradación de la cutícula y la colonización del hemocele evadiendo de esta forma el sistema inmune, segrega toxinas y se alimenta de la hemolinfa hasta finalmente producir la muerte del anfitrión del cual emerge [157]. En contraste, *T. lignorum* produce toxinas que en general tienden a la destrucción de los esclerocios produciendo así la muerte de hongos [65], [135]. Estas diferencias permiten afirmar que la infección y muerte de los individuos en rangos de tiempo más cortos, sea posiblemente por un efecto aditivo durante la infección fúngica, en la que la colonización por *B. bassiana* permitirá la exposición del hemocele y la entrada de *T. lignorum*, que incrementaría la concentración de toxinas o la pérdida de nutrientes en el huésped y conduciría a una muerte más temprana [158]. Otra posible explicación sería la infección inicial del huésped por *B. bassiana*. Al establecerse esta infección, la especie puede ser empleada como sustrato por *T. lignorum*, el cual la parasitaría y de esta forma puede ingresar al hemocele del insecto y así continuar con la infección en el individuo. Ambas hipótesis requieren estudios más precisos. A pesar de esto, se puede resaltar la obtención de ambas especies a partir de los individuos infectados. Adicionalmente, al cultivar las formulaciones en medio PDA se observó un crecimiento inicial de la especie *B. bassiana*, seguido por la colonización de *T. lignorum*. Después de 15 días, este último se convertiría en la única especie fúngica presente, lo cual sugiere una infección secuencial en los individuos.

Diferentes estudios han evaluado la actividad de esporas fúngicas como controladoras de hormigas cortadoras. En el caso de la cepa *B. bassiana* (ZGNKY-5), se evaluó la efectividad de las esporas en suspensión líquida (1×10^8 conidias/mL) sobre hormigueros de *Solenopsis invicta*, ubicados en la localidad de Panyu, Guangzhou. Se logró una efectividad del 100 %, en dosis entre 500 y 1000 mL, aplicadas a hormigueros de áreas menores a 10 m^2 [159]. Adicionalmente, un

estudio realizado en *Atta cephalotes*, en nidos (áreas menores a 50 m²) en Girardota (también evaluada en este estudio) y Barbosa, evaluó esporas de *T. viride* y *M. anisopliae*. El estudio mostró una efectividad del 100 % de erradicación, a excepción del tratamiento con *T. viride*. En la localidad de Girardota, esta eficacia se observó tras 42 semanas de evaluación y los efectos se detectaron a partir de la semana doce. Estos tiempos son superiores a los observados en nuestras pruebas, en las que se lograron efectividades similares incluso en nidos de áreas superiores a 50 m² en la semana doce de evaluación. Esta reducción en el tiempo se puede asociar a la inoculación repetida del bioinsecticida (semanas 1, 6 y 12), lo cual incrementa la dosis y la presencia de esporas en las cámaras de hongos simbiotes, por lo cual las obreras incrementan su actividad de remoción en estas cámaras, con una reducción drástica del flujo de obreras en la superficie [160].

En este estudio se observó que el bioinsecticida no fue efectivo en los nidos ubicados en Buenaventura, Lloró y Atrato. Estas localidades se encuentran en la región Pacífica colombiana, caracterizada por una pluviosidad superior a 7000 mm. Durante la aplicación del bioinsecticida, las lluvias que se presentaron pudieron haber lavado la superficie y reducido el ingreso de las esporas al hormiguero a pequeñas cantidades. Adicionalmente, este efecto redujo la dosificación en hormigueros superiores a 50 m², y pudo ser retirado efectivamente de las cámaras por las hormigas obreras [160]. El efecto de las lluvias y la reducción de la efectividad de los métodos de control –hechos probados experimentalmente en este estudio– así como el control químico, fueron expresados por las comunidades intervenidas.

Conclusiones

La combinación de esporas de *B. bassiana* y *T. lignorum*, es una alternativa viable en el control de la hormiga arriera en condiciones de laboratorio, donde una relación de 1:1 en las esporas presenta mayor efectividad.

La efectividad del bioinsecticida muestra asociación significativa con el tamaño del hormiguero.

Es necesario hacer dosificaciones seriadas del bioinsecticida experimental con el objetivo de garantizar el control de los hormigueros de *A. cephalotes*.

La formulación experimental llevada a cabo con las esporas de los hongos filamentosos de *B. bassiana* y *T. lignorum*, fue patentada (A01N 65/00) y se espera hacer la transferencia de la tecnología a todos los agricultores afectados por esta plaga.

Agradecimientos

A Colciencias, por el apoyo financiero de Innpulsa-Colciencias, para la financiación de fases posteriores del proyecto en la actualidad, bajo el contrato mercantil No. 3-1-44842 (2014-0401 Colciencias), contrato 025-2016. A la Universidad Católica Dom Bosco (Brasil); a la Institución Universitaria Antonio José Camacho (Resolución 588 de agosto 17 de 2016) y a la Universidad de San Buenaventura Cali.

Agradecimientos a las Umatas y alcaldías de las localidades intervenidas, por su apoyo en el acercamiento con las comunidades de agricultores y el seguimiento experimental del proyecto.



CAPÍTULO II

Hongos como
productores de enzimas
pectinolíticas

CAPÍTULO 2

Hongos como productores de enzimas pectinolíticas

Iván Andrés González Vargas,¹ Raúl Alberto Cuervo Mulet,² Fabián Felipe Fernández Daza,³ Esteban Osorio Cadavid⁴ y Rosa del Pilar Cogua Romero.⁵

Introducción

La microbiota de cada ecosistema difiere según de factores como ubicación, clima, geografía y disponibilidad de sustratos. La gran biodiversidad en países como Colombia es gracias a la variedad de ecosistemas del país. El departamento de Valle del Cauca presenta una potencialidad importante en biodiversidad del microbiota, porque cuenta con gran variedad de frutos, además de una notable vocación agroindustrial basada en la caña de azúcar. Actualmente, los estudios para caracterizar levaduras presentes en frutas y suelos dedicados al cultivo de la caña de azúcar del departamento de Valle del Cauca, Colombia, son pocos. Ambos sustratos son oriundos de la región en mención. Se utilizaron pulpas de

1 Grupo Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA), Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, 760035, Cali, Colombia

2 Grupo Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Buenaventura Cali, Carrera 122 # 6-65, 76001, Cali, Colombia.

3 Grupo Salud, Ambiente y Productividad (GISAP), Facultad de Educación Virtual y a Distancia, Institución Universitaria Antonio José Camacho, Avenida 6N # 28N-102, 25663, Cali, Colombia.

4 Grupo de Investigación en Biología Molecular de Microorganismos, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Calle 13 # 100-00, 25360, Cali, Colombia.

5 Grupo de Investigación en Ecología y contaminación Acuática (ECONACUA), Facultad de ciencias, Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, 760035, Cali, Colombia.

guanábana (*Annona muricata*), mora (*Rubus glaucus*), naranja (*Citrus sinensis*), guayaba (*Psidium guajava*), piña, (*Ananas comosus*) y uva (*Vitis vinifera*) y muestras de suelo en cultivos de caña de azúcar.

Las frutas son microhábitats importantes para una variedad de especies de levaduras en la naturaleza debido a su alta concentración de azúcares simples, bajo pH y la constante visita de insectos vectores. En estos sustratos, la sucesión de levaduras está involucrada en varios procesos bioquímicos y ecológicos, incluido el deterioro de las frutas. Esto ocurre dada la habilidad de las levaduras para utilizar rápidamente azúcares simples presentes en los sustratos. La presencia de especies proteolíticas y pectinolíticas en estos sustratos, puede cumplir un papel muy importante en el establecimiento y mantenimiento de la comunidad levaduriforme.

Durante la colonización de las frutas, algunos de estos factores pueden conferirles ventajas adaptativas a algunas especies. La presencia de cepas productoras de glucosidasa puede contribuir a mejorar las características aromáticas de las frutas, además de ser de importancia biotecnológica para su aplicación en la industria alimenticia.

Investigación sobre la identificación de levaduras con actividad pectinolítica de aislamientos obtenidos a partir de pulpas frutales y suelos de Valle del Cauca

Las levaduras son microorganismos unicelulares de colonización cosmopolita, que pueden ser aisladas a partir de muestras de suelos [1], [2], [3], aguas salobres [4], aguas residuales [5], agua dulce [6] y frutas [7]. En estas últimas, las levaduras pueden ser identificadas ya sea a partir del procesamiento de la fruta entera o de su pulpa [8], [9]. Lo anterior se asocia a la disponibilidad natural de altas concentraciones de azúcares simples y sus bajos índices de pH, además de la interacción de las frutas con los insectos [9].

La diversidad de especies levaduriformes y los múltiples ecosistemas que colonizan los sustratos, permitió a las levaduras desarrollar características propias que han sido aprovechadas por el ser humano en diversos procesos industriales, como la producción de etanol [10], pectinasas [11], [12], biodisel [13], manitol [14] entre otros. Sin embargo, aunque se cuenta con una alta relevancia en el ámbito agroindustrial, en Colombia, es incipiente el número de estudios donde es identificada la diversidad levaduriforme.

Entre los estudios destacados sobre esta temática se encuentran descripciones de las levaduras presentes en la caña de azúcar, el compost, la cáscara de toma-

te con potencial de producción de xilitol [15], levaduras presentes en bebidas fermentadas tradicionales de departamentos como el Valle del Cauca, como lo es el champús y la chicha, ambos preparados a partir del maíz, otros estudios de levaduras presentes en la fermentación de la leche para la producción del kumis, bebida láctea fermentada tradicional en Colombia [16].

Uno de los microorganismos más utilizados en la producción de metabolitos como el alcohol y las enzimas, entre otros, y que además se encuentra reportado en la literatura científica, es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual posee el complejo enzimático para convertir las hexosas en etanol en condiciones anaeróbicas, generando con ello dos moles del compuesto portador de energía en los seres vivos, el adenosín trifosfato (ATP). Pero otra de las características de la levadura que aparece registrada en los informes investigativos es poseer enzimas intracelulares de gran potencial e interés en la industria. Una de estas enzimas es, por supuesto, la que degradan la pectina, también llamada pectinasa.

Las pectinasas disponibles en el mercado y útiles en la vinificación o la clarificación de zumos de frutas son producidas por los hongos *Aspergillus niger* o *Penicillium notatum* [17]. Sin embargo, estos hongos secretan otras enzimas indeseables para la producción de vinos y jugos de fruta como la arabinofuranosidasa, que puede causar turbidez [18]. Las levaduras son una fuente alternativa para la producción a gran escala de enzimas comerciales [19], [20]. Respecto a la producción de pectinasas, estos organismos presentan ventajas comparadas con los hongos filamentosos, debido a que son unicelulares, su crecimiento es relativamente simple y casi no liberan metanol tóxico.

Las enzimas tienen muchas aplicaciones en diversos tipos de industria, especialmente en alimentos. En algunos casos, las enzimas son propias de los microorganismos utilizados directamente en los procesos. En otros casos, se emplean enzimas aisladas de microorganismos para su posterior uso.

Generalidades de las pectinasas

Hasta el momento se conocen alrededor de 678 especies de levaduras plenamente identificadas y caracterizadas [21] y de estas solo un pequeño grupo produce enzimas pectolíticas. La primera descripción de una levadura con producción de endoPG fue publicada en 1951 por Luh y Phaff [22]. En este trabajo se identificaron cuatro especies de levaduras pectolíticas: *Saccharomyces fragilis*, *Torulopsis kékfir*, *Candida pseudotropicalis* (más tarde rebautizada como *Kluyveromyces marxianus*) y *Saccharomyces thermantitonus* (reclasificada como *Saccharomyces cerevisiae*)

Las levaduras pectinolíticas pueden producir enzimas diferentes según el medioambiente y el acervo genético. Pueden producir PG, PL, PE o pectato liasa (PAL) de forma individual o una combinación de estas según las condiciones de temperatura, pH y disponibilidad de sustrato. Entre las cepas con actividad PG se encuentran *P. guilliermondii*, *P. anomala*, *Zygosaccharomyces cidri*, *Z. fermentati*, *Candida krusei*, *C. pseudoglebosa*, *C. intermedia*, *Debaryomyces hansenii*, *D. polymorphus*, *Candida rugopelliculosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus* y *Candida* [23][24][25][26][27][28] [29][30]. De este grupo, *Saccharomyces cerevisiae* es la más estudiada –inicialmente lo fue por su actividad pectinolítica [22] [31]– y *Rhodotorula* produce PG y PE [32]. Por otro lado, la actividad de tipo PG, PL y PE se ha observado en levaduras de las especies *Cryptococcus cylindricus*, *Cystofiliobasidium lari-marini* y *C. capitatum*, en ambientes fríos [32]. Es importante señalar que la mayoría de las actividades pectolíticas se han descrito en las levaduras nativas [33]. De hecho, estas levaduras fueron descubiertas durante varios procesos de fermentación [34],[35] o durante el prensado y la clarificación de jugos de fruta concentrados [34][36] [37].

Las pectinasas son un grupo heterogéneo de enzimas relacionadas presentes en las plantas superiores y los microorganismos. Se caracterizan por la hidrólisis de sustancias de pectina. Estas sustancias constituyen los principales componentes estructurales de la pared celular primaria y de la lámina media en las plantas superiores, asociadas a la extensión de la pared celular en la que se encuentran ligadas a la celulosa y el xyloglucano. También se involucran en el ablandamiento de algunos tejidos de la planta durante la maduración y almacenamiento [38]. Estas son conocidas como enzimas pectolíticas o pécticas y pertenecen a la familia de las polisacaridasas, las cuales contribuyen a la ruptura de pectinas presentes en una variedad de plantas [39] [40]. Estas enzimas actúan solamente sobre las regiones del homogalacturano (HG), también llamada región suave, que contiene grandes segmentos de enlaces α (1–4) unidos con residuos de ácido urónico de D–galactopiranosil y la región del ramnogalacturonano (RG), también conocida como región ramificada formada por la repetición de unidades disacáridas de –DGalAp–(1–2)– α –L–Rhap, unida a otro disacárido. Por lo tanto, las arabinasas y galactanasas capaces de degradar las cadenas laterales de sustancias pécticas, no se clasifican como pectinasas [39] [41].

Clasificación de las pectinasas

Según el tipo de actividad bioquímica las pectinasas se clasifican en:

1. **Actividad poligalacturonasa (PG).** Las endo PG poseen diferentes formas, con pesos moleculares comprendidos en un rango entre los 30 y 80 kDa y un punto isoeléctrico (pI) que oscila entre 3,8 y 7,6. La mayoría de las endo

PG tienen un pH óptimo en el rango ácido comprendido entre 2,5 a 6,0 y una temperatura óptima en el intervalo entre los 30 °C y 50 °C. Las exo PG están presentes en bacterias, plantas y hongos, entre los que se destacan *A. niger*, *Erwinia sp.* y algunas plantas como zanahorias, duraznos y frutas cítricas. El peso molecular de las exo PG varía entre 30 y 50 kDa y su rango de pI entre 4,0 y 6,0 [39] [40].

2. **Pectinliasas (PL).** Estas enzimas poseen una masa molecular comprendida entre 30 y 40 kDa [90, 91]. La literatura reporta una excepción en el caso de *Aureobasidium pullulans* y *Pichia pinus*, cuya masa molecular se encuentra alrededor de los 90 kDa. En general, las pectinliasas (PL) son activas en un rango de pH ácido comprendido entre 4,0 y 7,0, aunque algunos estudios muestran actividad PL en condiciones alcalinas. El punto isoeléctrico de estas enzimas se encuentra alrededor de 3,5. Los valores de K_m están en un rango comprendido entre 0,1 y 5 mg/mL, respectivamente, según el sustrato utilizado. La inactivación térmica de la enzima PL proveniente de *A. niger* fue modelada y se encontró su inactivación a un pH mínimo de 3,9 y 29 °C y un pH y temperatura óptimos para actividad enzimática de 4,8 y 35 °C, respectivamente [39] [40].
3. **Pectinesterasas (PE) o pectinmetilesterasas.** El peso molecular de estas enzimas varía entre 30 y 50 kDa. El pH óptimo para su actividad está entre 4,0 y 7,0 excepto, según la literatura, la PE proveniente de *Erwinia sp* cuyo pH óptimo está en la región alcalina. La mayoría de PE tiene una temperatura óptima en el rango comprendido entre los 4 °C y 60 °C y su pI varía entre 4.0 y 8.0. Industrialmente, la PE puede ser utilizada para mantener la textura y la firmeza en los productos de frutas procesadas y en la clarificación de jugos de frutas [39][40].

Modo de acción de las pectinasas

Las protopectinasas, poligalacturonasas, liasas y las pectinesterasas, son algunas de las enzimas pectinolíticas más estudiadas y conocidas en la actualidad. Las protopectinasas catalizan las protopectinas solubles; las poligalacturonasas hidrolizan la cadena de ácido-poligalacturónico mediante la adición de agua (hidrólisis) y son las de mayor abundancia de todas las enzimas pectinolíticas. Las liasas catalizan el clivaje de eliminación trans del polímero del ácido galacturónico. Las pectinesterasas liberan pectina y metanol por la desertificación en la unión metil-éster en la cadena de la pectina [39] [40].

Las enzimas son clasificadas de acuerdo con el modo de ataque a la región galacturónica de la molécula de pectina y se pueden agrupar en metilesterasas (esterasas) y las despolimerasas, que rompen las uniones glucosídicas entre los residuos de galacturonosyl (éster metílico). Los dos tipos de endo poligalacturonasas (PGs) y pectina-liasas (PLS) se caracterizan por cortar aleatoriamente la cadena de pectina. Las exopoligalacturonasas dejan monómeros o dímeros provenientes del extremo no reductor de la cadena pectina, mientras que la exopectinaliasas liberan dímeros insaturados provenientes de la terminal reducida [39] [40] [44].

Aplicaciones de las pectinasas en la industria

Algunas de las aplicaciones de las pectinasas más importantes referenciadas en la literatura son:

Pectinasas en los jugos de frutas y vinos

El uso de levaduras pectinolíticas o sus enzimas es altamente ventajoso en el desarrollo de los jugos de frutas, vinos, cidras y concentrados frutales. En 1994, Gainvors y col. demostraron que cuando se añade al mosto de uva un extracto pectinolítico crudo proveniente de una cepa de *S. cerevisiae*, esta tenía el mismo efecto sobre la turbidez que la misma cantidad de la pectinasa [45].

El empleo de estas proteínas en los vinos mejora la licuefacción, clarificación y filtración del mosto de uva, permitiendo con ello la liberación de compuestos de color y sabor atrapados en el epicarpio de la uva y generando un valor agregado en el buqué del vino [46]. De hecho, los productores de levaduras han comenzado a vender las levaduras pectinolíticas como la cepa Fermol Clarifiant (grupo AEB) o cepa Lalvin Rhône 2323 (Lallemand) para ayudar en el proceso de la elaboración del vino rojo [46, 47].

Pectinasas en el procesamiento de alimentos

El uso de levaduras pectinolíticas para la elaboración de alimentos se sugirió en la década de 1990 en diversos campos de la industria alimentaria. Servili *et al.* (1992) demostraron que usando un extracto de endoPG proveniente de *Cryptococcus albidus* se mejoraba la extracción de aceite de oliva [48].

Una cepa *K. marxianus* aislada de la pulpa de cacao que poseía actividad PG, fue utilizada directamente en granos de cacao para la extracción de jugo de cacao [49]. Más recientemente, algunos autores centraron su interés en la capacidad de producir enzimas pectinolíticas a partir de cepas de *Pichia sp*, implicadas en la fermentación de extracto de café [50]. Estas levaduras poseían la capacidad

de inhibir el crecimiento de *Aspergillus ochraceus* y la producción de ocratoxina A por parte de este hongo filamentoso [51].

Pectinasas en el proceso de fabricación de papel

La industria encargada de la producción de pulpas y papel ha comenzado a utilizar enzimas pectinolíticas para la solución de problemas específicos en sus procesos de manufactura. Una pectinasa alcalina producida por *Bacillus sp* y *Erwinia carotovora*, ambas con una alta actividad pectinolítica, ha sido utilizada en la industria japonesa para la producción de papel despolimerizando la pectina y, consecuentemente, reduciendo la demanda catiónica de la solución de pectina y del filtrado proveniente del peróxido utilizado en el proceso de blanqueo [52, 53].

Pectinasas en el procesamiento de textiles y biofregado de fibras de algodón

Las pectinasas han sido utilizadas en conjunto con las amilasas, lipasas, celulasas y hemicelulasas, para remover agentes provenientes del algodón de forma segura y aceptada desde el punto de vista medioambiental, reemplazando así la soda cáustica usada actualmente para el mismo propósito. El biofregado es un proceso novedoso utilizado para la remoción de impurezas no celulósicas provenientes de la fibra utilizando para ello enzimas específicas. Las pectinasas han sido usadas para este propósito sin identificar efectos negativos en la degradación de la celulosa [54].

Pectinasas en el tratamiento de aguas residuales

Las aguas residuales provenientes de la industria de procesamiento de cítricos y otros vegetales, contienen por lo general materiales con pectina que no son descompuestos fácilmente por los microorganismos que participan en el tratamiento de lodos activados [55]. El pretratamiento de estas aguas residuales con enzimas pectinolíticas facilita la remoción del material con pectina y hace posible su descomposición por el tratamiento con lodos activados [54].

Pectinasas para la nutrición animal

Las pectinasas son utilizadas para la elaboración del coctel enzimático utilizado en la producción de alimentos para animales. Este coctel tiene la particularidad de reducir la viscosidad en el alimento, lo cual a su vez incrementa la absorción de nutrientes y por lo tanto reduce la cantidad de heces producidas por el animal [54].

En la actualidad, la industria de alimentos emplea una amplia gama de enzimas, tales como amilasas, celulasas, invertasas, glucanasas, enzimas proteolíticas y

enzimas pécticas, entre otras [55]. Según se afirma [56], las aplicaciones en la industria de alimentos de las pectinasas corresponden a un 25 % de las ventas globales de enzimas de grado alimentario, ya que tienen la capacidad de degradar pectinas (polisacáridos complejos presentes en los tejidos vegetales) en moléculas más simples como el ácido D-galacturónico [57]. En el procesamiento de jugos de frutas, el uso de enzimas comerciales ayuda a tener mayores rendimientos y mejor calidad del producto final. Estas trabajan destruyendo las estructuras de los componentes de la fruta y disminuyendo su capacidad de retención de agua. Las pectinasas son un complejo sistema de enzimas que incluyen hidrolasas, liasas y oxidasas que degradan o modifican la pectina [58], [59].

De acuerdo con lo anterior, se debe tener en cuenta que la región del departamento del Valle del Cauca produce cerca de 721 000 toneladas de frutas por año [60], que estas frutas presentan características que favorecen la presencia de especies [61], [9] y que son pocas las investigaciones orientadas a la caracterización de especies levaduriformes presentes en frutas cultivadas en la región, al igual que las presentes en sus suelos. Además, se tienen 62000 ha destinadas al cultivo de caña de azúcar para la producción de azúcar y 41000 ha para la producción de etanol [62]. En este sentido, esta investigación tuvo como propósito caracterizar e identificar la capacidad pectinolítica de las especies de levaduras presentes en las frutas: guanábana (*Annona muricata*), mora (*Rubus glaucus*), naranja (*Citrus sinensis*), guayaba (*Psidium guajava*), piña (*Ananas comosus*) y uva (*Vitis vinicola*), y en muestras de suelos utilizados en cultivos comerciales de la caña de azúcar. Ambas clasificaciones de sustratos provenientes del departamento del Valle del Cauca, Colombia.

Métodos

Recolección de muestras

Los aislamientos levaduriformes se obtuvieron a partir de fermentos de pulpas de frutas cultivadas en el departamento del Valle del Cauca. Se utilizaron las pulpas de guanábana (*Annona muricata*), mora (*Rubus glaucus*), naranja (*Citrus sinensis*), guayaba (*Psidium guajava*), piña, (*Ananas comosus*) y uva (*Vitis vinifera*). Estas fueron obtenidas en centros de mercado de los municipios de Jamundí, Pradera, Buga y Cali. Por otra parte, se obtuvieron dos muestras de diferentes suelos destinados al cultivo de la caña de azúcar ubicados en las siguientes coordenadas geográficas: suelo A: 3.277278,0N -76.315074W y suelo B: 3.499448,0N -76.433446W. Dichas muestras fueron tomadas de tierra superficial aledaña a los cultivos de caña de azúcar en tiempo de cosecha.

Aislamiento de las especies levaduriformes

Las frutas se lavaron con abundante agua estéril y se dejaron secar en una cámara de flujo laminar por espacio de dos horas a 25 °C. Posteriormente, se retiraron 200 g de pulpa separados de la cáscara, se depositaron en un frasco de vidrio y se adicionaron 60 g de sacarosa (Merck®) y agua estéril hasta un volumen de 1000 mL. La suspensión se licuó (licuadora Oster® mod 4655) hasta obtener una solución homogénea. Para las muestras de suelo, se depositaron 10 g de cada una, se adicionaron 90 mL de agua, y se agitó a 60 rpm hasta homogenizar. A las soluciones obtenidas se les agregó sacarosa hasta obtener 12°Brix. Se suplementó con 25mgL⁻¹ de cloranfenicol y se incubó a 30°C por 72 horas. El aislamiento se hizo inoculando 20 µl en medio YPDA (Difco®, Le Port de Claix, France) suplementado con 25 mgL⁻¹ de cloranfenicol e incubando a 30 °C por 72 horas.

Los cultivos puros se obtuvieron mediante replicación y siembra en superficie de colonias individuales en YPDA e incubación a 30 °C por 72 horas. Este procedimiento se repitió hasta obtener cultivos axénicos, los cuales se preservaron en medio YPD-glicerol 20 % a -20 °C.

Caracterización de fenotípica de levaduras

La caracterización fenotípica de los aislados levaduriformes se hizo evaluando su morfología y sus características bioquímicas y fisiológicas y empleando los criterios descritos por Kurtzman *et al.* [63].

Caracterización molecular de levaduras

La caracterización molecular requirió la extracción de ADN geonómico, la amplificación y secuenciación de las regiones ITS1-ITS2 del gen 5.8S rRNA, siguiendo los protocolos descritos por Osorio-Cadavid *et al.* [64]. Los amplificadores purificados fueron enviados a secuenciar en MACROGEN®, laboratorio externo que ofrece este servicio. La metodología empleada se estandarizó a las condiciones de laboratorio.

Posteriormente, las secuencias (*forward* y *reverse*) fueron ensambladas y corregidas con el programa Chromas Pro v. 1.42 ® y comparadas con las secuencias reportadas en el GenBank® mediante alineamiento de secuencias con la herramienta BLAST.

Análisis de diversidad ecológica

Para el análisis de diversidad ecológica de las especies levaduriformes, se utilizaron el índice de diversidad de Shannon, el cual representa la cantidad de especies presentes en el área de estudio (riqueza de especies) y la cantidad relativa de

individuos de cada una de esas especies (abundancia); y el índice de Simpson, el cual describe el grado de dominancia de especies de levadura individuales [65].

Evaluación de la actividad pectinolítica

Selección primaria de levaduras

Las colonias activadas anteriormente se sembraron en un medio que contenía pectina como única fuente de carbono. El medio estaba compuesto de la siguiente manera (g/100 mL de agua destilada): pectina cítrica 2; extracto de levadura, 1; agar, 15; KH_2PO_4 , 0,2; CaCl_2 , 0,05; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1; MgSO_4 ; $7\text{H}_2\text{O}$, 0,8; MnSO_4 , 0,05; pH=5. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 48 horas. La selección se hizo de forma visual mediante la identificación de las colonias desarrolladas luego del agregado de lugol. Se detectó una zona clarificada alrededor de las colonias. Se seleccionaron solo las levaduras que presentaron mayor tamaño de halo de clarificación.

Selección secundaria de levaduras

Las cepas seleccionadas se sometieron a un segundo ciclo de selección, según su capacidad de crecimiento y de producción de pectinasas a bajas temperaturas (12 °C). El mismo procedimiento se llevó a cabo por medio de la determinación en placa con el medio descrito anteriormente, con pectina como única fuente de carbono y posterior revelado con lugol. Se seleccionaron las mejores cepas según dos criterios:

1. Las que presentaron mayor relación diámetro de halo/diámetro de colonia.
2. Las que resultaron con mayor tamaño de colonia, aunque con una mediana relación diámetro de halo/diámetro de colonia.

Obtención de los extractos enzimáticos

Se sembraron las cepas seleccionadas previamente como las mejores a 30 °C (inóculo al 5 %) en caldo YEPD (g/100 mL buffer cítrico-citrato, pH 3,5): D-(+)-Glucosa, 2,0; peptona de soja, 1,0; peptona de carne, 1,0; extracto de levadura, 1,0 y peptina (0,5%). Se incubaron a dicha temperatura durante cinco días. Los cultivos se sometieron a agitación a una velocidad de 130 rpm. Luego, los extractos obtenidos se centrifugaron a 5.000 g durante 15 minutos y se filtraron a través de una membrana de 0,22 μm de tamaño de poro. De esta forma se obtuvieron los extractos enzimáticos crudos a los cuales les se les evaluó su capacidad pectinolítica.

Evaluación de actividad enzimática en los extractos obtenidos

Los extractos enzimáticos extracelulares libres de células se utilizaron para la determinación cuantitativa de la actividad pectinolítica a 12 °C. La misma fue ensayada por la cuantificación de los azúcares reductores liberados desde una solución de pectina (0,25 % de pectina en buffer cítrico-citrato, pH 3,5) usando el reactivo ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) [66]. El ácido galacturónico fue utilizado como estándar (Sigma Chem. Co.). La mezcla de reacción incluyó 0,45 mL de sustrato y 0,05 mL de extracto enzimático. Dichas soluciones se incubaron a 12 °C durante 30 minutos. La determinación se llevó a cabo por triplicado. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de ácido galacturónico por minuto bajo las condiciones del ensayo.

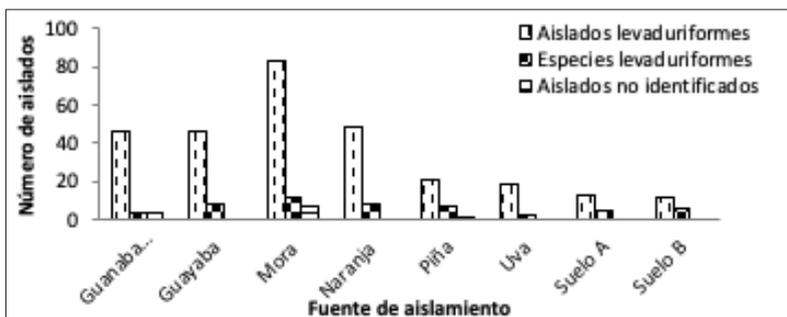
Resultados

Se obtuvieron un total de 299 aislamientos levaduriformes, 275 de las muestras de frutas y 24 de las muestras de suelos. En frutas, el mayor número de aislamientos por fruta fue de 90 (30,10 %) a partir de mora, seguido por 50 (16,72 %) en guanábana, 46 (15,38 %) en guayaba, naranja con 49 (16,39 %) aislados, piña con 22 (7,36 %) y uva con 18 (6,02 %) aislados.

En los suelos A y B, se obtuvieron 13 (4,35 %) y 11 (3,68 %) aislados respectivamente; respecto a los aislados no identificados se presentaron 4, 7 y 1 aislados en guanábana, mora y piña, respectivamente (Figura 11).

Figura 11

Número de aislados y especies levaduriformes encontradas en frutas y suelos de los Ingenios Incauca y Providencia, Valle del Cauca, Colombia



Al hacer la identificación fenotípica (morfología, color, elevación de colonia y célula) y molecular (amplificación y secuenciación de las regiones ITS1 y ITS2) se identificaron 37 especies y 12 aislados no identificados (Tabla 12). Se encontró

un total de 14 géneros correspondientes a *Candida* con 10 especies, *Pichia* con 9 especies, *Cryptococcus* y *Hanseniaspora* con 4 especies, y a los géneros *Debaryomyces*, *Kazachstania*, *Lodderomyces*, *Metschnikowia*, *Pseudozyma*, *Rhodotorula*, *Pseudozyma*, *Saccharomyces*, *Torulaspota* y *Wickerhamomyces*, con una especie.

Tabla 12

Relación de las especies levaduriformes identificadas en cada uno de los sustratos analizados

Especies	Frutas								Total	
	G	Gu	M	N	P	U	SA	SB	N	%
	N	N	N	N	N	N	N	N		
<i>Candida azyma</i>						15			15	5,02
<i>Candida boidinii</i>			5		1				6	2,01
<i>Candida ethanolica</i>	14		1						15	5,02
<i>Candida oleophila</i>			4						4	1,34
<i>Candida parapsilosis</i>	7								7	2,34
<i>Candida pseudointermedia</i>					1				1	0,33
<i>Candida pseudolambica</i>							1		1	0,33
<i>Candida railenensis</i>			3						3	1,00
<i>Candida sergipensis</i>	20								20	6,69
<i>Candida sp</i>			1						1	0,33
<i>Cintractia fimbriatylicola</i>							1	1	2	0,67
<i>Cryptococcus flavus</i>								1	1	0,33
<i>Cryptococcus podzolicus</i>								5	5	1,67
<i>Cryptococcus diffluens</i>		1							1	0,33
<i>Cryptococcus laurentii</i>							6		6	2,01
<i>Debaryomyces nepalensis</i>		11							11	3,68
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>		4							4	1,34
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>		6		2					8	2,68
<i>Hanseniaspora pseudoguilliermondii</i>					3				3	1,00
<i>Hanseniaspora Uvarum</i>		4	13	1					18	6,02
<i>Issatchenkia occidentalis (Pichia occidentalis)</i>								2	2	0,67
<i>Issatchenkia terricola (Pichia terricola)</i>			5			3			8	2,68
<i>Kazachstania exigua</i>	5								5	1,67
<i>Kodamaea ohmeri (Pichia ohmeri)</i>				2					2	0,67
<i>Lodderomyces elongisporus</i>				3					3	1,00

<i>Metschnikowia koreensis</i>				2					2	0,67
<i>Meyerozyma caribbica</i> (<i>Pichia caribbica</i>)				4					4	1,34
<i>Pichia fermentans</i>				8					8	2,68
<i>Pichia guilliermondii</i> (<i>Meyerozyma guilliermondii</i>)		3		1			3		7	2,34
<i>Pichia kluyveri</i>		7	7						14	4,68
<i>Pichia membranaefaciens</i>		1			2				12	1,00
<i>Pichia pijperi</i> (<i>Wickerhamomyces pijperi</i>)			25		2				27	9,03
<i>Pseudozyma pruni</i>								1	1	0,33
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>							2		2	0,67
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			13	33					46	15,38
<i>Torulopsis globosa</i>								1	1	0,33
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>			6	5					11	3,68
No identificadas (posibles nuevas especies)	4		7		1				12	4,01
Total por sustrato	50	46	90	49	22	18	13	11	299	100,00

G (guanábana), Gu (guayaba), M (mora), N (naranja), P (piña), U (uva), SA (suelo A destinado al cultivo de la caña de azúcar) y SB (suelo B destinado al cultivo de la caña de azúcar).

Al evaluar la diversidad de microorganismos no se observó relación entre el número de aislados y la diversidad de especies. Se encontró que a excepción de la mora y la guanábana que presentaron índices de diversidad de 2,96 y 2,67, respectivamente. Solo la mora mostró el mayor número (90 aislamientos). Los índices de diversidad para frutas con números medios de aislados (entre 46 y 50) como la guanábana y la naranja, presentaron valores de 1,80 y 1,76 inferiores a los observados en piña, suelos A y B con valores de 2,45, 1,98 y 2,22, respectivamente, muestras que solo presentaron 22, 13 y 11 aislamientos, respectivamente. Respecto de la dominancia específica, esta se observó en los aislados obtenidos a partir de uva, naranja y guanábana. Las especies con mayor número de individuos fueron *Candida azyma*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida sergipensis*, respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13

Índices de diversidad de Simpson y de Shannon para las levaduras obtenidas de suelos y frutas.

Índice	G	Gu	M	N	P	U	SA	SB
Simpson	0,30	0,15	0,15	0,46	0,18	0,67	0,24	0,20
Shannon	1,80	2,67	2,96	1,76	2,45	0,65	1,98	2,22

Se identifican por G (guanábana), Gu (guayaba), M (mora), N (naranja), P (piña), U (uva), SA (suelo A destinado al cultivo de caña de azúcar) y SB (suelo B destinado al cultivo de caña de azúcar).

Evaluación de la actividad pectinolítica

De los microorganismos aislados y estudiados fueron identificadas diez cepas pectinolíticas. A todos los aislados se les determinó la capacidad pectinolítica utilizando los métodos anteriormente mencionados. Se lograron identificar diez cepas levaduriformes con posible capacidad pectinolítica, escogidas por poseer un mayor halo de clarificación, todas pertenecientes al género *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 12).

Figura 12

Halo de clarificación observado en las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* asiladas en la región de Valle del Cauca

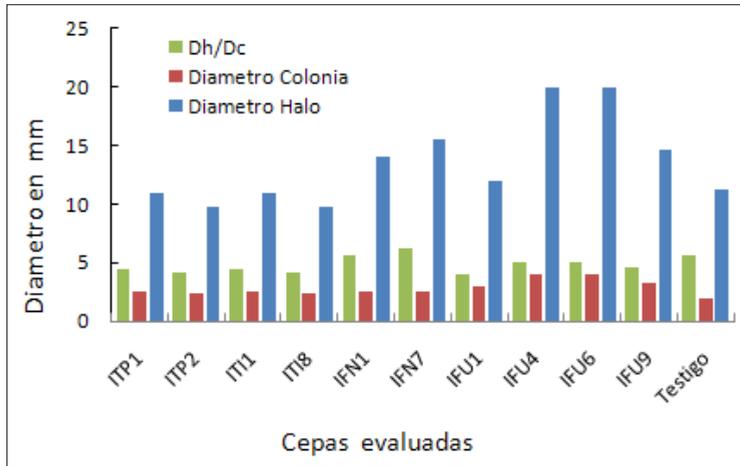


Selección secundaria de levaduras

Las diez cepas levaduriformes seleccionadas fueron sometidas a una segunda selección a 30 °C. Lo anterior se llevó a cabo con un sembrado en profundidad por el método de punción. Se hizo una repetición en cajas de Petri de seis colonias por placa. Luego de la incubación a la temperatura anteriormente mencionada, se pudo determinar la relación entre el tamaño del halo desarrollado y el tamaño de las colonias presentes (Dh/Dc) de cada una de las cepas (Figura 13).

Figura 13

Relación del diámetro del halo (Dh) y de la colonia (Dc), en las cepas levaduriformes aisladas en la región de Valle del Cauca, con actividad peptinolítica



En el eje X se observan las cepas a las cuales se les evaluó el diámetro de colonia (en rojo), el diámetro de halo (en verde) y la relación entre el diámetro de halo y colonia (en verde). En el eje Y se observa la relación de cada uno de estos diámetros en mm.

Las relaciones Dh/Dc estuvieron comprendidas en un rango de tres a ocho unidades. Todas las cepas seleccionadas se caracterizaron por su alta relación Dh/Dc, lo cual permite entrever una alta capacidad de producción de pectinasas (Tabla 14). En cuanto al crecimiento de estas cepas en un medio de cultivo rico en pectina todas tuvieron un crecimiento óptimo y lograron una multiplicación notoria a las 24 horas en medio sólido y 18 horas en medio líquido (duplicación de la población. Figura 12).

Tabla 14

Cepas de levaduras seleccionadas a 30°C con una mayor relación diámetro de halo/diámetro de colonia (Dh/Dc)-

Cepas	Diámetro del halo (mm)	Diámetro de la colonia (mm)	Dh/Dc
ITP1	11,0	2,5	4,4
ITP2	9,7	2,3	4,2
ITI1	11,0	2,5	4,4
ITI8	9,7	2,3	4,2
IFN1	14,0	2,5	5,6
IFN7	15,5	2,5	6,2

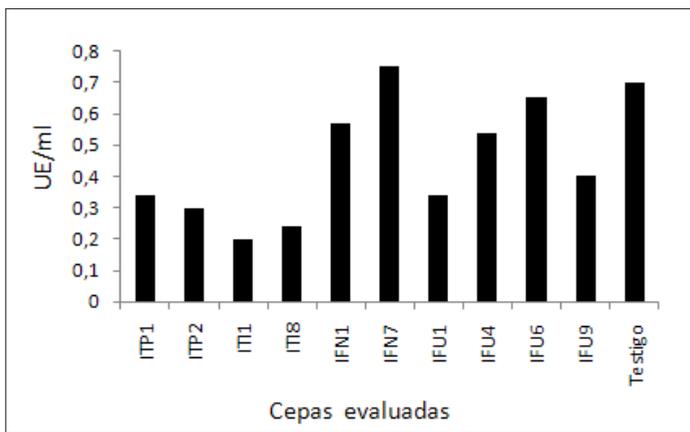
IFU1	12,0	3,0	4,0
IFU4	20,0	4,0	5,0
IFU6	20,0	4,0	5,0
IFU9	14,7	3,2	4,6
Testigo	11,2	2,0	5,6

Determinación de la actividad enzimática en los extractos obtenidos

Las diez cepas levaduriformes seleccionadas se crecieron a 30 °C y se seleccionaron con la mayor actividad pectinolítica, el cual fue determinado por el método DNS (Fig 2.4).

Figura 14

Determinación de la actividad enzimática de las cepas levaduriformes aisladas en la región de Valle del Cauca



Se plantea el método DNS como parte de la selección secundaria debido a que la técnica en placa (Dh/Dc) posee la limitante de la difusión de la enzima pectinolítica a través del medio sólido en el cual se encuentra la pectina que se va a degradar.

Lo anterior hace necesario un análisis en medio líquido en el que se encuentre tanto la enzima como el sustrato. Esta técnica es, entonces, utilizada para dar validez y seguridad científica a la selección hecha.

Las cepas que tuvieron mayor actividad pectinolítica por el método del DNS resultaron ser prácticamente todas aquellas seleccionadas por el método en placa con buen crecimiento y una alta relación Dh/Dc. Esto apoya la decisión tomada

de hacer ensayos complementarios en medio líquido, para escoger finalmente las mejores cepas productoras de pectinasas. Por lo tanto, se seleccionaron finalmente las tres mejores cepas con actividad pectinolítica: las cepas IFN1, IFN7 y IFU6, con actividades enzimáticas de 0,57, 0,75 y 0,65 UE/mL extracto enzimático, respectivamente. Cabe anotar que solo la cepa IFN 7 tuvo una actividad enzimática superior a la testigo; sin embargo, las otras dos cepas aisladas tenían actividades enzimáticas cercanas al testigo. El testigo corresponde a una cepa de *Kleuveromyces marxianus* (ATCC #) con actividad pectinolítica. Las cepas IFN1 y IFN7 correspondían a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y fueron aisladas del zumo fermentado de naranja, mientras la cepa IFU6, aunque también correspondía a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, fue aislada del zumo fermentado de la uva.

Algunos autores mencionan valores de actividad enzimática medida por el método del DNS en los sobrenadantes de cultivos, desde 0,107 hasta 0,679 UE/mL, a pH 5,0 y 50 °C [67]. Por su parte, Martin y col. [68] estudiaron la actividad PG de cepas indígenas y mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* PGU1 y resultaron valores dentro del rango 0,103-0,974 UE/mL, a 37 °C y pH 5,2. Las cepas levaduriformes nativas con potencial agroindustrial aisladas en este trabajo, producen pectinasas a 30 °C y pH 3,5, comparable con los trabajos citados, con actividades a 50 °C y 37 °C, a pH 5,0 y 5,2, respectivamente, lo que revela que las cepas seleccionadas en el presente estudio tienen muy buenos niveles de actividad en medio ácido.

Asimismo, debido a que el medio de cultivo utilizado para la obtención del extracto enzimático no contuvo pectina sino glucosa como única fuente de carbono, se concluye que la producción de enzima no es inducible y por lo tanto las levaduras seleccionadas son constitutivas. De este modo, la producción enzimática industrial no estará sujeta a las condiciones ambientales.

Discusión

A partir de la pulpa de mora, guayaba, naranja, piña, guanábana y uva y muestras de suelos dedicadas al cultivo de caña (suelos A y B), se obtuvo un total de 299 aislados representados en 37 especies levaduriformes, de las cuales el 92 % (275) se aislaron a partir de frutas cuyo hábitat es más adaptado a las necesidades de las levaduras y corresponden a los géneros *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Kazachstania*, [69], *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulasporea*, *Wickerhamomyces* [70]; así mismo, el género *Debaryomyces* [71], frecuente en suelos. En este mismo sustrato, se observaron aislados de los géneros *Pseudozyma*

y *Rhodotorula*, y en la naranja se encontraron *Lodderomyces* y *Metschnikowia*. En la literatura consultada no se han reportado los géneros aislados hallados en los dos sustratos anteriores.

De las 37 especies descritas en este estudio, cuatro se han reportado como patógenas oportunistas que podrían desarrollar enfermedades en humanos. Corresponden a: *C. laurentii*, *K. ohmeri*, *L. elongisporus*, *R. mucilaginosa* y *M. guilliermondii*, asociados a infecciones sanguíneas [72], meningitis [73] e infecciones en pacientes inmunosuprimidos [74], [75], [76]. La presencia de este tipo de especies estaría asociada a la manipulación por personal expuesto, presente en las plazas de mercado.

En este estudio se caracterizaron las especies levaduriformes presentes en diferentes frutas cultivadas en la región de Valle del Cauca, en las cuales se encontraron las especies *H. uvarum*, *L. elongisporus*, *M. korensis*, *H. opuntiae*, *L. elongisporus* y *Pichia guilliermondii* (*Meyerozyma guilliermondii*) en la naranja, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura [77], [78]. Adicionalmente, se reportó para este sustrato la presencia de *K. ohmeri* (*P. ohmeri*), levadura asociada a infecciones oportunistas y que posiblemente se presentó por la manipulación en el mercado donde fue adquirida [79]. Aunque se tienen reportes de aislamiento de levaduras en uva (*V. vinifera*) y piña (*A. comosus*), en este estudio se identificaron las especies *C. azyma*, *I. terrícola* (*P. terrícola*) y *C. boidinii*, *C. pseudointermedia*, *H. pseudoguilliermondii*, *M. caribbica* (*P. caribbica*), *P. fermentans*, *P. membranaefaciens*, *P. pijperi* (*W. pijperi*) respectivamente, de las cuales no se posee registro de aislamiento en este tipo de frutas. Adicionalmente, se hicieron aislamientos a partir de guanábana (*A. muricata*), guayaba (*Psidium guajava*) y mora (*Rubus glaucus*). En estos casos, los reportes fueron escasos y en algunos casos nulos. Se registraron aislados de *C. diffluens*, *D. nepalensis*, *H. guilliermondii*, *H. opuntiae*, *H. uvarum*, *P. guilliermondii* (*M. guilliermondii*), *P. kluyveri* y *P. membranaefaciens* en guayaba. En guanábana se encontraron aislados de *C. ethanolica*, *C. parapsilosis*, *C. sergipensis*, *K. exigua*, y en guayaba de *C. ethanolica*, *C. parapsilosis*, *C. sergipensi*, *K. exigua* y en mora de *C. boidinii*, *C. ethanolica*, *C. oleophila*, *C. railenensis*, *H. uvarum*, *I. terrícola* (*P. terrícola*), *P. kluyveri*, *P. pijperi* (*W. pijperi*), *S. cerevisiae*, y *W. anomalus*. Aunque estas especies se reportan por primera vez para estas frutas, se les han detectado como parte del microbiota en frutas tropicales [8], [7], [78], [80]. La similitud entre las especies de levaduras aisladas podría estar asociada a las características ambientales compartidas entre las regiones donde se hacen los reportes previos y en el departamento de Valle del Cauca.

En las muestras de suelo estudiado, se identificaron las especies *P. guilliermondii*, *C. laurentii*, *C. Flavus*, *R. mucilaginosa*, *C. flavus* y *T. Globosa* empleadas en

el cultivo industrial de caña de azúcar. Los reportes sugieren que estas especies forman parte del microhábitat de este tipo de suelos [81] [82] [3], al igual que su presencia en la planta de caña de azúcar (hojas, raíz), ya sea de forma epífita o endófito [83], que pueden estar asociadas al crecimiento de estas [84], [85]. Adicionalmente, se identificaron las especies *C. pseudolambica* y *C. fimbriatylicola*, de las cuales se cuenta con poca información.

En este estudio se observaron diferencias marcadas en la diversidad de especies identificadas a partir de cada uno de los sustratos (frutas), y está asociada al número de aislamientos a excepción de uva. Esta diversidad indicaría que la relación de disponibilidad de nutrientes en frutas correspondería en orden descendente, que inicia con mora, guayaba, guanábana, naranja y finaliza en la uva. De igual forma, se asocia a las condiciones de madurez de la fruta y al ambiente donde fueron producidas. Esta combinación de variables finalmente determinará la composición de la comunidad de microorganismos presentes [86], [87].

Entre las cepas aisladas en este estudio se tienen algunas de interés biotecnológico y agroindustrial. Uno de los campos de interés es el control de infecciones fúngicas en la poscosecha. Entre las especies levaduriformes con potencial aplicación, se encuentran *P. membranaefaciens* y *P. caribbica* [88] en el control de *P. italicum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *A. alternata*, *B. cinerea* y *R. stolonifer* [89], [90], [91]. *W. anomalus* se ha empleado por su capacidad antifúngica contra *P. digitatum* [92] y *M. laxa* [93] y *H. uvarum* como potenciales controladores de *B. cinerea* [94]. Adicionalmente, se reporta que su aplicación previa a la cosecha, disminuye las afecciones propias en la poscosecha [95].

Entre los aspectos importantes se encuentra la potencialidad de estas especies en la enología, asociado al realce de aromas y sabores por la liberación compuestos aromáticos, como es el caso *H. uvarum* y *H. guilliermondii* [96], [97], al igual que en la producción de fermentos y alimentos como el chocolate, en el que la inoculación como especies cofermentativas de *P. kluyveri* y *H. opuntiae*, alteran las características organolépticas [98], [99]. Adicionalmente, se identificaron especies con potencial en la producción de enzimas involucradas en la industria, como es el caso de *K. exigua*, *S. cerevisiae* en la producción de fitasas [99] y pectinasas [100] y en la producción de etanol a partir hemicelulosa hidrolizada, como es el caso de *Candida boidinii* [101] y manitol a partir de glicerol por *Candida azyma* [14]

Conclusiones

La caracterización de un total de 299 especies levaduriformes en sustratos de frutas y suelos del departamento de Valle del Cauca, es un aporte importante al desarrollo biotecnológico y científico en materia de diversidad y pertinente, si se tiene en cuenta la vocación agroindustrial de la región.

Este estudio permitió evidenciar la gran diversidad de especies presentes en frutas de la región de Valle del Cauca (Colombia) y cómo podrían, potencialmente, ser empleadas en las industrias de la región, como la producción de alimentos, bebidas fermentadas, etanol y como biocontroladores.

De esta diversidad se aislaron levaduras nativas con capacidad de producir pectinasas, las cuales poseen un alto potencial para ser utilizadas en la industria de producción de jugos a partir de frutas, logrando con ello el aislamiento y selección de diez cepas levaduriformes pertenecientes al género *Saccharomyces cerevisiae* con propiedades pectinolíticas. A las cepas levaduriformes aisladas se les determinó su producción de pectinasas a 12 °C y presentaron buenos niveles de actividad enzimática, si se tiene en cuenta que la evaluación se hizo en extractos crudos sin que este haya sido sometido a concentración o algún método de purificación que aumentaría la actividad enzimática. Las cepas de levaduras seleccionadas son constitutivas. Esta es una importante característica que significa una ventaja industrial, debido a que la producción enzimática no está sujeta a las condiciones ambientales.

Agradecimientos

Esta investigación fue posible gracias al apoyo financiero obtenido de la Universidad Santiago de Cali y la Universidad de San Buenaventura Cali.



CAPÍTULO III

Los hongos como determinantes de la calidad alimentaria

CAPÍTULO 3

Los hongos como determinantes de la calidad alimentaria

Johannes Delgado Ospina,^{1,2} Fabián Felipe Fernández,³ Leidy Vanessa Balanta,⁴ Richard Andrés Martínez⁴ y Clemencia Chaves López.²

Introducción

El cacao es el ingrediente de un número indefinido de alimentos, entre los que se encuentran los chocolates, los pasteles, los helados y los dulces. Este fruto se obtiene de plantaciones y se cultiva en su mayoría en África, Centroamérica y Suramérica, donde las condiciones de almacenamientos de esta semilla no son estrictas, pudiendo con ello ser susceptibles a eventos de contaminación por hongos tanto en el almacenamiento como en el proceso fermentativo, pasos iniciales en la producción [1].

La contaminación fúngica en el cacao, generalmente es producida por especies de los géneros *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium* y *Rhizopus* [1], presentes en

1 Grupo de Investigación Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Buenaventura Cali, Carrera 122 # 6-65, 76001, Cali, Colombia.

2 Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, University of Teramo, Via R. Balzarini 1, 64100, Teramo, Italy.

3 Grupo Salud, Ambiente y Productividad (GISAP), Facultad de Educación Virtual y a Distancia, Institución Universitaria Antonio José Camacho, Avenida 6N # 28N-102, 25663, Cali, Colombia.

4 Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Universidad Santiago de Cali, Calle 5 No 62-00, 760035, Cali, Colombia.

el grano seco y en bebidas preparadas con semillas contaminadas. Esto puede desencadenar problemas de salud pública, ya que diferentes especies de *Aspergillus* y *Penicillium* producen micotoxinas, entre las cuales se encuentran las aflatoxinas y las ocratoxinas [2], [5], consideradas posibles agentes carcinogénicos por la IARC. Por ello, se encuentran reguladas las concentraciones máximas permitidas. Por ejemplo, la comisión de la Comunidad Europea restringe su cantidad éstas a $2\mu\text{g}$ y $1\mu\text{g}$, respectivamente, en productos que integren cacao.

Si bien se tienen hongos que podrían contaminar y causar daños en la salud, es durante el proceso fermentativo cuando se involucran otras especies que pueden otorgar características de olor y sabor únicas, permitiendo así incrementar el valor del producto, razón por la cual se requiere el reconocimiento de la micoflora presente en estos productos. En este capítulo, se mostrarán las generalidades asociadas a los hongos como agentes contaminantes en alimentos con un enfoque en la descripción de las micotoxinas, ya que estos organismos se encuentran presentes en los diferentes procesos asociados a alimentos, entre los cuales se registran el cultivo, el almacenamiento y la producción. Así mismo, se muestra una investigación llevada a cabo con el fin de caracterizar los hongos presentes en granos del cacao seco de la región geográfica del valle del río Cauca.

Micotoxinas

En la actualidad se conocen más de 500 micotoxinas, metabolitos secundarios producidos por hongos hallados como contaminantes en alimentos ya sea durante la cosecha, el almacenaje, la ingesta, el contacto o inhalación de estas. En algunos casos generan efectos tóxicos en humanos y animales que pueden producir la muerte del individuo en casos de exposición crónica [6], [7].

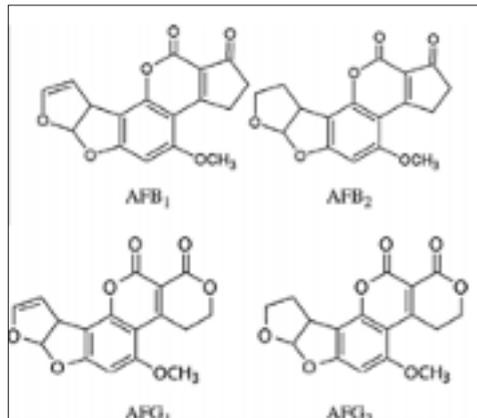
Las micotoxinas, denominadas aflatoxinas, esterigmatocistinas, fumonisinas, ocratoxinas, tricotecenos y zearalenona [2], [3], [8], son consideradas entre las más importantes en la agricultura y derivados. A continuación, se describe cada una de estas.

Aflatoxinas

Son las más importantes de las micotoxinas por su abundancia, toxicidad e impacto en la salud humana. Son producidas principalmente por *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus nomius*, *Aspergillus pseudotamarii* y *Aspergillus bombycis*. Se han descrito 20 tipos de esta micotoxina, entre las cuales se destacan las aflatoxinas B₁, B₂, G₁, G₂, M₁ y M₂. El sufijo 2 señala en el isómero

la pérdida de doble enlace, comparado con el sufijo 1 y las letras B (azul) y G (verde), a la coloración de estas al ser expuestas a luz UV [2]. Es importante señalar que las aflatoxinas M_1 y M_2 son el resultado del metabolismo, en mamíferos, de las aflatoxinas B_1 y B_2 . Estas primeras se pueden encontrar en la leche [2]. Las aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2 (Figura 15) pueden encontrarse en productos de climas tropicales como cacahuetes, pistachos, maíz, arroz [9] y cacao [4], [10]. Su contaminación ocurre, generalmente, por *A. flavus* [7]. En referencia a los efectos en la salud, la aflatoxina B_1 se encuentra asociada a carcinoma hepático, en especial en personas con historial de hepatitis B, efectos inmunosupresores y déficit nutricionales. Sus efectos cancerígenos se asocian a la capacidad de producir mutaciones en el gen P53, el que se produce la transversión de una guanina a tiamina en el codón 249 [2], [4], [8], [9].

Figura 15
Estructura molecular de las aflatoxinas B_1 , B_2 , G_1 y G_2



Fuente: Marín *et al.*, 2013

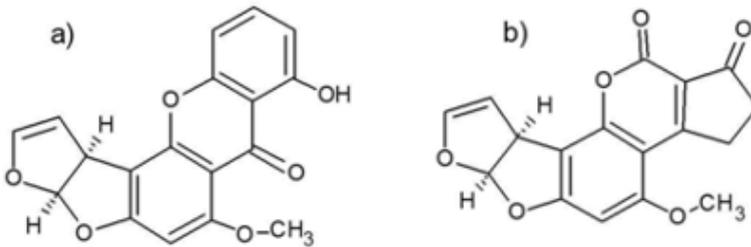
Esterigmatocistinas

Son producidas por diferentes especies de *Aspergillus*, entre las que se encuentran *Aspergillus versicolor* (principal productor de esta aflatoxina), *Aspergillus chevalieri*, *Aspergillus ruber*, *Aspergillus amstelodami*, *Aspergillus aureolatus*, *Aspergillus quadrilineatus* y *Aspergillus sydowii*; y especies que incluyen *Bipolaris*, *Chaetomium*, *Emiricella*, y *Penicillium*. La producción de esta micotoxina por *A. versicolor* ocurre entre los 23 °C y los 29 °C y a una actividad de agua de 0,76 [2], [4], [11]. La esterigmatocistina (Figura 16) es un metabolito tardío de la vía de síntesis de la aflatoxina B_1 . Entre los diferentes efectos en modelos animales, se incluyen car-

cinoma hepatocelular [12], adenoma pulmonar, adenocarcinoma, inhibición de síntesis de ARN, tumores en piel, diarrea sanguinolenta y apoptosis en neuronas, por lo cual ha sido reconocida por la IARC como carcinógeno 2 B [11], [13].

Figura 16

Estructura química de la esterigmatocistina (a) y de la aflatoxina B₁ (b).



Fuente: Díaz *et al.*, 2018.

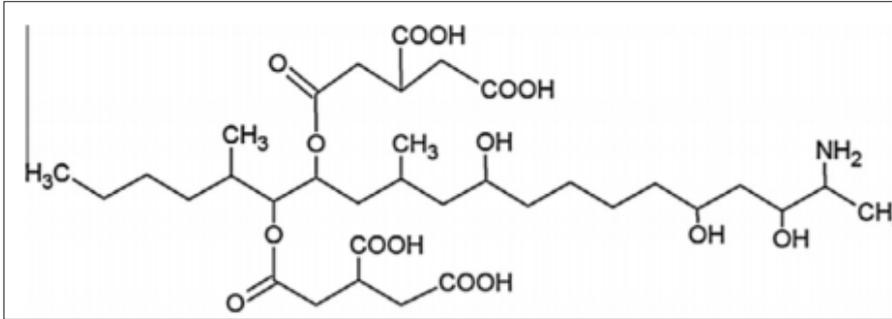
Fumonisin

Esta micotoxina fue descrita primeramente en *Fusarium verticillioides* (*Fusarium moniliforme*) y es un contaminante frecuente en el maíz. Adicionalmente, se ha descrito su producción en catorce especies de *Fusarium*, entre las que se destacan *Fusarium proliferatum*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium globosum*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium nygamai* [2], [3], [8], [9].

Las fumonisin (Figura 17) se agrupan en cinco categorías: A, B, C, D y P. La fumonisin B₁ es la más abundante y de mayor toxicidad, ya que se ha descrito en maíz y en alimentos derivados, cebada, avena, trigo, arroz, pan e incluso comida para recién nacidos. Adicionalmente, es termoestable y solo a temperaturas superiores a 150 °C la toxicidad se reduce [14].

El efecto tóxico de las fumonisin se asocia a la inhibición de la síntesis de esfingolípidos, lo cual incrementa la cantidad de esfingosina intracelular, lo que resulta en un efecto tóxico. Adicionalmente, producen cáncer de hígado y riñón en murinos, hipertrofia arterial en cerdos, edema pulmonar en ovejas y arterosclerosis en simios. A esto se suma su detección en la leche materna cuando son ingeridas por madres lactantes. En consecuencia, la IARC ha clasificado las fumonisin como posible carcinógeno en humanos (grupo B) y la FAO/WHO establece como dosis tolerable de ingesta diaria 2 µg/kg [2].

Figura 17
Estructura química de la fumonisina

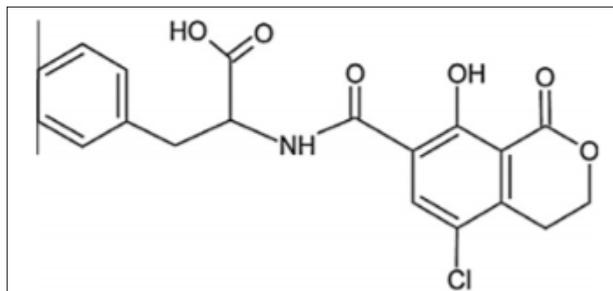


Fuente: Marin *et al.*, 2013

Ocratoxinas

Estas micotoxinas (Figura 18) son originadas principalmente por los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Las principales especies productoras son *Aspergillus seccion Circumdati*, *Aspergillus seccion Nigri*, *Penicillium verrucosum* y *Penicillium nordicum* [7]. Se pueden encontrar en cereales, cacao [5], nueces, frutas, vino, cerveza, regaliz, especias, carne, leche, café, preparados para lactantes y alimentos infantiles [2]. Las ocratoxinas se clasifican en A, B, C, α y β , entre las cuales la ocratoxina A es la más tóxica, con efectos nefrotóxicos, cancerígenos y mutagénicos. Adicionalmente, esta toxina es termoestable y se puede encontrar activa hasta 250 °C [2], [7].

Figura 18
Estructura química de las ocratoxinas

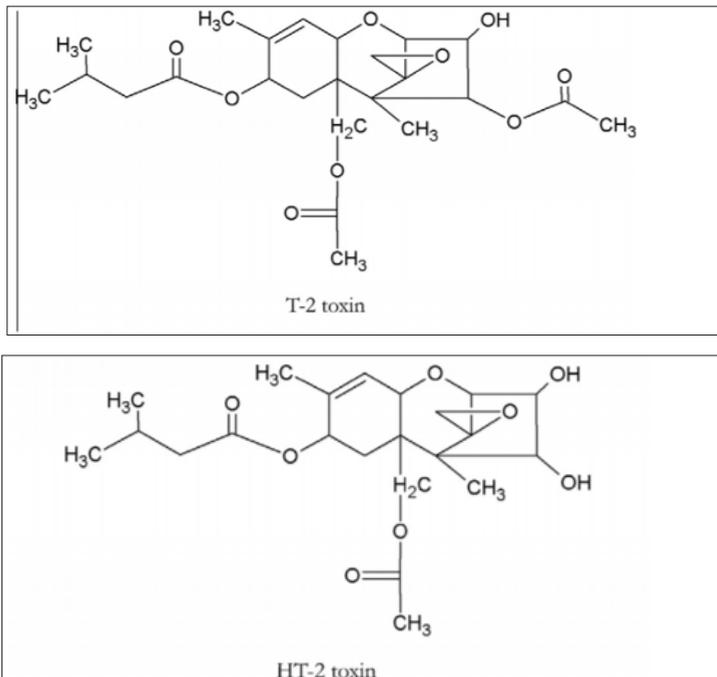


Fuente: Marín *et al.*, 2013.

Tricotecenos

Producidas por hongos del género *Fusarium*. Se destacan las especies *Fusarium tricinctum*, *Fusarium nivale*, *Fusarium roseum*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium poae*, así como especies de otros géneros que incluyen *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, *Trichoderma*, y *Trichothecium*. En la actualidad se conocen más de 200 derivados, los cuales se dividen en dos grupos: A y B. Las toxinas de mayor interés por sus efectos en la salud, corresponden a la toxina T₂, la toxina HT-2, diacetoxiscirpenol, monoacetoxiscirpenol, triacetoxiscirpenol y escirpentriol del grupo A, y la vomitoxina o deoxinivalenol, fugarenona X, nivalenol del grupo B. Los tricotecenos (Figura 19) tienen múltiples mecanismos de acción, que incluyen inhibición de la síntesis de ARN, ADN y proteínas, apoptosis, peroxidación de lípidos, inhibición de la función mitocondrial, cambios en los neurotransmisores y activación de citoquinas [2], [7]. Estas se han asociado a afecciones gástricas y a anorexia [15].

Figura 19
Estructura química de los tricotecenos

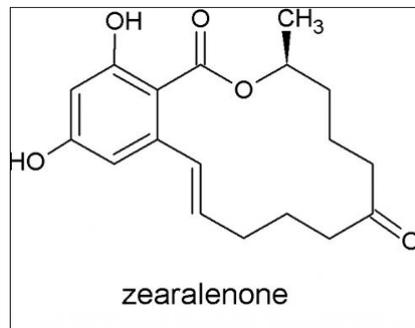


Zearalenona (ZEA)

Es conocida como toxina F-2 y producida por especies de *Fusarium*, que incluye a *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium equiseti*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium cerealis* y *Fusarium crookwellense*. El maíz es el cereal más susceptible a riesgo de contaminación, pero la toxina también se ha detectado en el trigo, la cebada, la avena, el sorgo, el centeno, el arroz y los productos de soja. Esta micotoxina se ha asociado a micotoxicosis agudas en personas, hiperestrogenismo en animales –especialmente cerdos– caracterizado por vulvovaginitis, mamitis e infertilidad. En estudios con animales de experimentación, se han obtenido pocas pruebas de la carcinogenicidad de la zearalenona [2], [7] (Figura 20).

Figura 20

Estructura química de la zearalenone



Tomado de <http://europroxima.com/blog/zearalenone-and-zeranol/>

Investigación sobre microbiota de granos secos de cacao (*Theobroma cacao* L)

Theobroma cacao L. es un árbol originario de la cuenca del río Amazonas, desde donde se extendió a todo el mundo gracias a las civilizaciones precolombinas consumidoras de sus semillas o granos, especialmente en Mesoamérica. Las semillas de este fruto se conocen como cacao y son la materia prima para la elaboración de chocolate.

El cacao es cultivado en varios países tropicales, entre los cuales Costa de Marfil, Ghana, Indonesia, Ecuador, Nigeria, Camerún y Brasil son los mayores productores (ICCO, 2017). En Colombia, los métodos de producción se basan en un sistema de pequeños agricultores, por lo que la producción solo alcanza un

1 % de la producción mundial, a pesar de tener el clima y los suelos apropiados para este cultivo [16].

Los principales importadores del grano entero o partido, crudo o tostado, utilizado como materia prima para la fabricación de diferentes productos, son Países Bajos, Estados Unidos, Alemania, Bélgica, Francia, España, Italia y Turquía, entre otros [16]. Estos mercados requieren cacao de excelente calidad para lograr preparaciones de productos con mayor valor agregado y aumentar así su competitividad.

Los granos de cacao se clasifican de acuerdo con su calidad, en dos categorías: los de baja calidad, que se catalogan como ordinario o de bulto, destinados a la producción de manteca de cacao, cacao en polvo y otros derivados. Los granos de cacao de excelente calidad se catalogan como finos o de aroma y se utilizan en la industria de chocolates finos, ya que le otorgan al producto características de aroma y sabor especiales. Dentro de esta última clasificación se encuentra el cacao colombiano, declarado por la Organización Internacional del Cacao como fino y de aroma, gracias a las características agroecológicas de los lugares en los que se cultiva y a los adecuados procesos de poscosecha que se llevan a cabo, categoría que alberga solo el 5 % del grano mundial. Según los datos de ICCO Panel (2016), que reconoce 23 países exportadores de estos granos, el 95 % del cacao que Colombia exporta pertenece a esta categoría.

La mayoría de los fabricantes de chocolate que tienen entre sus productos cacao de primera calidad, con un sabor distinto, de origen, requieren de este grano fino para sus productos. Los países consumidores –por tradición– de cacao de Europa Occidental (Bélgica, Francia, Alemania, Italia, Suiza y Reino Unido), así como Japón, son los principales mercados de consumo de cacao fino. Algunos países de América Latina también tienen un gran mercado interno para el uso de cacao fino, principalmente con el objetivo de exportar el producto final.

Se distinguen tres grupos genéticos o variedades principales de cacao [17]. En primer lugar, el criollo, cultivado en Colombia y otros países de Latinoamérica. Es reconocido por su gran calidad, sus aromas afrutados de intensidades medias, con notas de frutos secos y ligeramente amargo pero refinado. Con él se elaboran chocolates finos. Sin embargo, su rendimiento es bajo y representa aproximadamente el 10 % de la producción mundial. En segundo lugar, se tiene el forastero, un cacao más resistente a las enfermedades y de mayor rendimiento, pero con el que difícilmente se pueden elaborar chocolates finos (esto se logra en muy pocos países, como Ecuador) por poseer un sabor fuerte y amargo, ligeramente ácido, con mucho tanino y astringencia. Representa aproximadamente el 70 %

de la producción mundial. Y en tercer lugar el trinitario, originado por el cruce entre el criollo y el forastero. Del cacao forastero heredó la resistencia y del cacao criollo algunos sabores. Aunque normalmente se usa mezclado con otras variedades, alcanza un 20 % de la producción mundial [18]. En Colombia, las investigaciones avanzan en el sentido de evaluar, seleccionar y propagar clones regionales de cacao de alto rendimiento, tolerantes a plagas y enfermedades como la moniliasis [19].

Para la cosecha, las mazorcas se cortan del árbol cuando están maduras para extraer los granos. Después de la extracción, los granos se someten a un proceso de fermentación y secado antes de ser procesados. Estas son las etapas más importantes y determinantes, durante las cuales ocurren los verdaderos cambios en el cacao, que garantizan que obtenga sus sabores y aromas característicos [20].

La fermentación se lleva a cabo de manera natural, aunque se han hecho estudios para tratar de encontrar microorganismos (*starter culture*) que potencialicen este proceso [21]. Durante esta etapa se pierde el mucílago que cubre los granos. La etapa efectúa en dos etapas: una anaeróbica, en la que los granos son almacenados en contenedores de madera cubiertos con hojas de banano y en este espacio se desarrollan levaduras y bacterias ácido-lácticas (LAB). La segunda o etapa aerobia, comienza al tercer día cuando periódicamente se mezclan los granos para que se oxigenen hasta el sexto día, cuando se favorece el desarrollo de bacterias ácido-acéticas (AAB) [22].

El secado se hace sobre el piso bajo la luz del sol después de la fermentación, sin exceder los 65°C, con el fin de reducir el contenido de humedad del 70 % al 10 %, aproximadamente. El secado se efectúa lentamente para favorecer algunas de las reacciones químicas iniciadas durante el proceso de fermentación, reacciones que inciden sobre el desarrollo de sabores amargos si se excede la temperatura para disminuir los tiempos de secado.

Una vez seco el cacao, se termina este proceso y está listo para su comercialización. Los precios del cacao para los campesinos colombianos son fluctuantes y con tendencia a la baja. Gracias a los esfuerzos del Gobierno para implementar este cultivo con miras no solo a satisfacer la demanda nacional del grano, sino también con fines de exportación, se espera que para el 2018 se siembren 60 000 nuevas hectáreas [19].

Durante las diferentes etapas del proceso –en especial la etapa de secado que se hace al aire libre–, es posible que por medio de esporas transportadas por el aire o por vectores –insectos– que interactúan con los sitios de secado del cacao, se anclen al grano algunos hongos filamentosos. Estas esporas se desarrollan en

estructuras de hongos filamentosos, pero ello depende, principalmente, de factores como la humedad, la temperatura de almacenamiento y la disponibilidad de nutrientes en la superficie del grano (derivada de una mala etapa de fermentación), aunque no es tan evidente que luego de la etapa de secado se puedan desarrollar durante el almacenamiento de los granos.

Para que la humedad sea baja y se evite el desarrollo de los hongos, la etapa de secado desempeña un papel vital. Se debe garantizar que la humedad relativa del sitio de secado esté por debajo del 70 %, lo que sucede en la mayor parte de las regiones donde se siembra el cacao, a menos que las condiciones ambientales cambien, como en la temporada de lluvias. En este periodo no se debe hacer el secado al aire libre sino en sitios cubiertos con paso de luz solar. Se debe garantizar un secado uniforme y una humedad final entre el 6 % y el 7 %. Si se cumplen estas condiciones, la posibilidad de que se desarrollen las estructuras de los hongos es muy baja y el cacao conserva las características de calidad necesarias, incluso en periodos de almacenamiento prolongados.

El objetivo de esta investigación fue caracterizar la presencia de hongos asociados al cacao seco por medio de la búsqueda de esporas en la superficie de los granos, con base en una muestra cultivos de cacao no tecnificados de la región del Valle geográfico del río Cauca.

Metodología

Recolección

Las muestras se recolectaron en diferentes mercados de Valle del Cauca donde los agricultores comercializan el cacao seco. Se adquirieron 18 muestras de 1000 g cada una, correspondiente a diferentes agricultores.

Procesamiento de muestras y preparación de las diluciones

Para el procesamiento de las muestras se adicionaron 10 g en 90 mL de agua destilada estéril y se agitó constantemente durante 10 minutos, para obtener la dilución 10^{-1} . Posteriormente, se tomó 1 mL de la dilución 10^{-1} y se adicionó en 9 mL de agua destilada estéril (dilución 10^{-2}). Este paso se repitió hasta obtener una dilución de 10^{-5} con cada una de las muestras.

Siembra, aislamiento y preservación de los hongos

Se tomaron 100 μ l de las últimas tres diluciones (10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5}) y se sembraron en superficie en el medio PDA (agar papa dextrosa). Se incubaron durante tres

a siete días a una temperatura de 30° C. Una vez las primeras colonias aparecieron, se hizo un aislamiento de cada una en diferentes platos de agar y se llevó a incubadora de nuevo. Este procedimiento se repitió hasta que se observó un crecimiento individual de cada hongo aislado. Para la conservación, se tomó un círculo de 6 mm de diámetro de cada hongo y se conservó por duplicado en microtubo con caldo YPD y glicerol al 20 %.

Caracterización morfológica

Los hongos se activaron en placas con PDA a una temperatura de 30° C, con un periodo de tiempo de tres a siete días, tras lo cual se evaluaron las características macroscópicas tomando en consideración la forma de la colonia, consistencia en la superficie, elevación y color. De acuerdo con la visualización microscópica, se hicieron preparaciones teñidas de azul de metileno 1M para ser observados en un microscopio óptico a 100X. Se logró obtener la identificación a nivel de género, teniendo en cuenta esporangióforo, esporangios, conidióforos [23], [24]. Se establecieron posibles especies de acuerdo con búsquedas exhaustivas.

Resultados

Los resultados mostraron la presencia de seis géneros de hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Moniliniophthora*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Nigrospora*), los cuales se encontraron en diferentes concentraciones de hasta 10⁸ UFC/g muestra.

Aspergillus

El género *Aspergillus* es un hongo filamentosos que pertenece al filo *Ascomycota*. Su reproducción se puede clasificar en sexual (teleomorfo) y asexual (anamorfo). La sexual es la formación de ascosporas en el interior de las ascas y la asexual hacen referencia a la reproducción a partir de esporas llamadas conidias. Es un organismo ubicuo presente en el suelo, agua, y aire, principalmente en la materia en descomposición. Tiene la capacidad de crecer en cualquier tipo de sustrato, es termotolerante, vive entre los 12 °C y 57 °C y sus esporas pueden sobrevivir hasta los 70 °C. La posibilidad de crecer a 37° C diferencia las especies de *Aspergillus* de los mohos saprófitos ambientales. Su tiempo de crecimiento varía de según la especie [25].

Sus hospederos más comunes son humanos, bovinos, equinos, aves y cetáceas. El mecanismo de transmisión se produce principalmente por medio de los conidios presentes en el ambiente de trabajo en forma de bioaerosoles que penetran en el

organismo por vía respiratoria. También es posible la transmisión por contaminación de heridas o mucosas y la aparición de efectos tóxicos por ingestión de alimentos contaminados. Son responsables de casos de enfermedad nosocomial. No se produce transmisión de persona a persona. Las principales manifestaciones clínicas abarcan las reacciones alérgicas, la colonización asintomática, la infección superficial y la enfermedad invasora. [26]

Algunas características particulares pueden ayudar en la identificación de especies. Por ejemplo, *A. terreus* presenta resistencia intrínseca a varios antimicóticos, especialmente a anfotericina B; *A. niger* es un colonizante común y puede causar infecciones superficiales tales como otitis externa y *A. flavus* se encuentra con relativa frecuencia en casos de sinusitis, infecciones en la piel y en aspergilosis invasora [25].

Los hongos filamentosos son alteradores comunes de semillas y alimentos y causan reducciones significativas de la producción al disminuir la capacidad germinativa de los granos, lo que afecta su calidad nutricional [1] conllevando así pérdidas económicas, produce también micotoxinas [2].

Algunos hongos de este género son capaces de producir micotoxinas, producto del metabolismo secundario de algunas especies de hongos filamentosos. Las micotoxinas pueden causar a los animales, incluido el hombre, alteraciones biológicas perjudiciales para la salud. Su consumo por medio de los alimentos está relacionado con intoxicaciones alimentarias y micotoxicosis, que pueden llevar, en algunos casos, a la muerte. Estos metabolitos son químicamente diversos y pueden estar contenidos en el micelio, en el interior de las esporas o al ser liberados en el alimento. Las micotoxinas presentes en el género *Aspergillus* son aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, ocratoxina a, patulina y ácido ciclopiazónico [27].

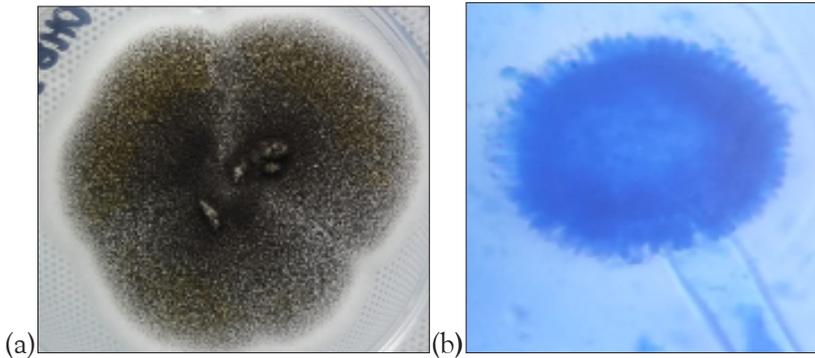
Aspergillus niger

El hongo *Aspergillus niger* (Figuras 20 y 21), se caracteriza por producir diversos y variados compuestos de interés para las industrias farmacéutica y de alimentos, entre ellos ácido cítrico, ácido glucónico, enzimas glucoamilasa y galactosidasa. Es el principal productor de ácido cítrico industrial por medio del cultivo líquido. *Aspergillus niger* es un hongo prácticamente inocuo para los seres humanos y no causa tantas enfermedades como otras especies de *Aspergillus*. Sin embargo, en grandes cantidades puede producir aspergilosis, provocando así alteraciones pulmonares o causar infecciones superficiales tales como otitis externa. Este hongo puede desarrollarse y contaminar algunos cultivos, principalmente en su

fase de poscosecha cuando las condiciones de humedad relativa y actividad de agua le son favorables.

Figura 20

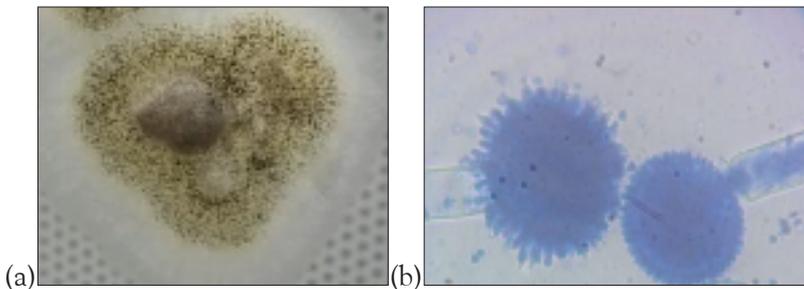
Características macroscópicas y microscópicas de la muestra DHB 3-1.



(a) *Aspergillus niger* vista macroscópica. Presenta forma irregular, elevación plana, de textura polvoronosa con borde blanco, color negro. (b) *Aspergillus niger* vista microscópica. Aumento 100X.

Figura 21

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra TCO 3-1



(a) *Aspergillus niger* vista macroscópica. Presenta forma irregular, elevación plana, de textura polvoronosa con borde blanco, color café con esporas negras. (b) *Aspergillus niger* vista microscópica. Aumento 100X.

Aspergillus ochraceus

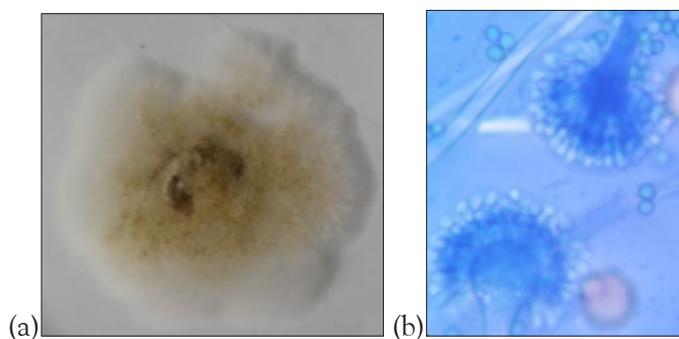
Algunas cepas de *Aspergillus ochraceus* (Figura 22) tienen la capacidad de producir una micotoxina nefrotóxica llamada ocratoxina A (OTA) [28]. Por lo general, este hongo ha sido aislado de muestras de café, por lo que se le atribuye la

presencia de ocratoxina A en dicho producto. Sin embargo, también se encuentra relacionado con un amplio número de alimentos, entre los que se encuentran los frutos secos, las semillas ricas en aceites, el vino y la pimienta, entre otros.

Investigadores en Brasil determinaron que el punto crítico de la contaminación con ocratoxina A en granos de cacao se produce durante la etapa de secado, cuando los granos empiezan a perder agua y se disminuye el número de competidores debido a la alta sensibilidad de bacterias y levaduras por la disponibilidad de agua [29]. Sin embargo, se reporta una baja ocurrencia de contaminación en cacao de América y del Pacífico comparado con otros países productores [30].

Figura 22

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra ODL 2-2



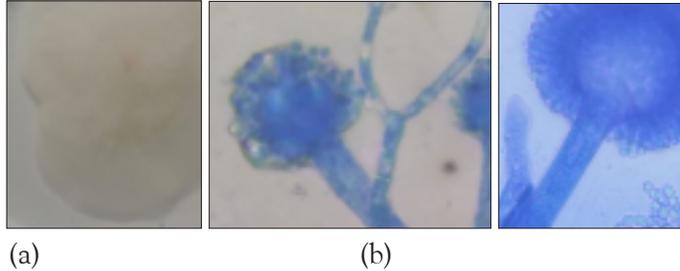
(a) *Aspergillus ochraceus* vista macroscópica. Presenta forma circular, elevación plana, de textura polvorosa con borde blanco, color café claro en el centro. (b) *Aspergillus ochraceus* vista microscópica 100X.

Aspergillus oryzae

Aspergillus oryzae (Figura 23) es un hongo muy usado en la cocina japonesa para fermentar soja y producir miso y salsa de soja. También es utilizado en el primer paso de la preparación del sake y el shochu, pues sus enzimas (principalmente amilasas) degradan el almidón y producen azúcares necesarios para la fermentación. Es un hongo muy apreciado para procesar alimentos de forma natural, lo que hace que resulten más nutritivos y asimilables y se conserven por mayor tiempo. El hongo puede ser utilizado para la elaboración de bebidas y productos a partir de legumbres y cereales como el miso hacho (miso de haba de soja) o amazake (dulce de arroz). Es considerado probiótico y recientes estudios lo consideran un nuevo prebiótico [31].

Figura 23

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra CBT 2-1



(a) *Aspergillus oryzae* vista macroscópica. Presenta forma irregular, elevación, textura filamentosa y color blanco. (b) *Aspergillus oryzae* vista microscópica 100X.

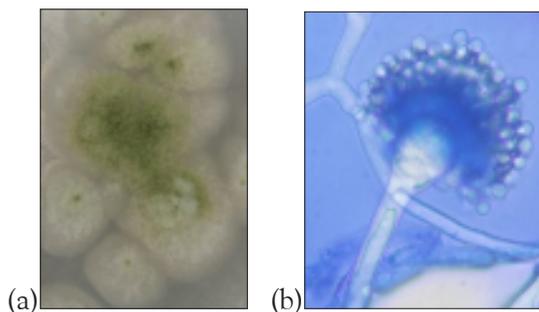
Aspergillus flavus

Aspergillus flavus (Figura 24) es un hongo saprófito, patógeno oportunista que se desarrolla en diversos cultivos en los que puede producir aflatoxinas (como un metabolito secundario) en las semillas antes y después de la cosecha. Se encuentra comúnmente en el suelo. También es un patógeno de animales e insectos. En los humanos es predominantemente un patógeno oportunista de pacientes inmunodeprimidos [32].

La aflatoxina es un potente carcinógeno altamente regulado en la mayoría de los países. En el campo, la aflatoxina se asocia con cultivos de semillas oleaginosas estresadas por la sequía, como el maíz, el maní y el algodón, entre otras. Algunas cepas pueden producir aflatoxina en casi cualquier semilla almacenada incluido el cacao, siempre que las condiciones de almacenamiento le sean favorables para su desarrollo.

Figura 24

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra JAP 2-2



(a) *Aspergillus flavus* vista macroscópica. Presenta forma irregular, elevación plana, textura polvorosa con borde blanco y color verde claro. (b) *Aspergillus flavus* vista microscópica 100X.

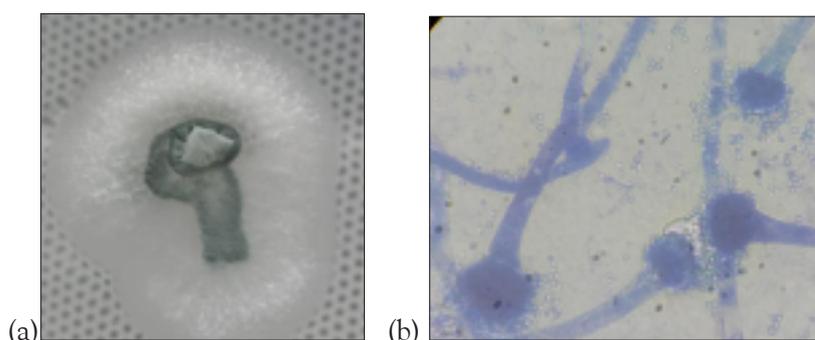
Aspergillus fumigatus

El hongo saprofito *Aspergillus fumigatus* (Figura 25) crece en cualquier tipo de sustrato, especialmente en suelos y materiales en descomposición. Es un contaminante habitual de los ductos de climatización-ventilación. Es la especie que con mayor frecuencia causa enfermedad en pacientes fundamentalmente inmunodeprimidos y es el principal agente etiológico del aspergiloma, una infección oportunista asociada a pacientes con antecedentes de tuberculosis pulmonar cavitaria [33].

Algunas cepas de este hongo pueden producir gliotoxina, una micotoxina cuyo mecanismo de toxicidad está basado en la habilidad para producir especies reactivas del oxígeno y generar radicales libres capaces de dañar el ADN [34].

Figura 25

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra DPA 1-1



(a) *Aspergillus fumigatus* vista macroscópica. Presenta forma irregular, elevación plana, textura polvornosa con borde blanco y color verde. (b) *Aspergillus fumigatus* vista microscópica 100X.

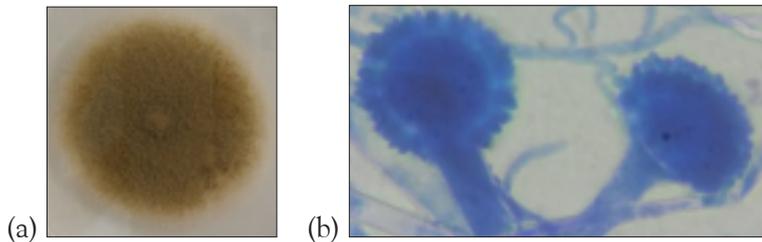
Aspergillus terreus

Aspergillus terreus (Figura 26) es un hongo saprófito que se encuentra en todo el mundo, especialmente en el suelo, en lugares donde hay vegetación en descomposición y polvo. *A. terreus* se usa comúnmente en la industria para producir importantes ácidos orgánicos, como el ácido itacónico y el ácido cisaconítico, así como también enzimas como la xilanasa. Adicionalmente, fue la fuente inicial de lovastatina, un metabolito llevado a medicamento utilizado para reducir el colesterol sérico [35].

Aspergillus terreus puede causar una infección oportunista en personas con sistemas inmunitarios deficientes, aunque con mucha menor frecuencia que otras especies de *Aspergillus*. Es relativamente resistente a la anfotericina B, un medicamento antifúngico común. *Aspergillus terreus* produce varios metabolitos secundarios como las astatinas: pravastatina, simvastatina y lovastatina, y micotoxinas como territrema A, citreoviridina, citrinina, gliotoxina, patulina, terreína, ácido terreico y terretonina [35].

Figura 26

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra DPA 8-1



(a) *Aspergillus terreus* vista macroscópica. Presenta forma regular, elevación plana, textura polvorosa con borde blanco y color marrón. (b) *Aspergillus terreus* vista microscópica 100X.

Penicillium

Es un género de hongos filamentosos (Figura 27), aerobios y saprofitos que pertenece al filo *Ascomycota*. Son organismos ubicuos. Es un género con numerosas especies que puede encontrarse casi por todas partes, siendo el más abundante en suelos. Se presenta en el suelo, compost, alimentos vegetales, (fruta, zumos, cereales, frutos secos, hortalizas, carne, leche, quesos, embutidos) y fómites (papel, pintura, paneles de yeso, gomas, fibra de vidrio e incluso gasoil) [36]. Su temperatura óptima de crecimiento es de 20° C a 30 °C, aunque según la especie puede crecer entre 5 °C y 37 °C, produciendo de esta manera la alteración de alimentos en refrigeración. También tolera grandes variaciones de pH entre 3,5 y 10,0, aunque crece mejor y más rápido a un pH cercano a 4,0. Sus esporas se encuentran en forma de bioaerosol en el aire, con una concentración ambiental más o menos estable a lo largo del año, aunque se dan concentraciones pico en invierno y primavera. Es un contaminante habitual en los edificios al formar parte del polvo, principalmente en los edificios húmedos en los que deteriora los materiales de construcción o decoración (aglomerados de madera, papel de

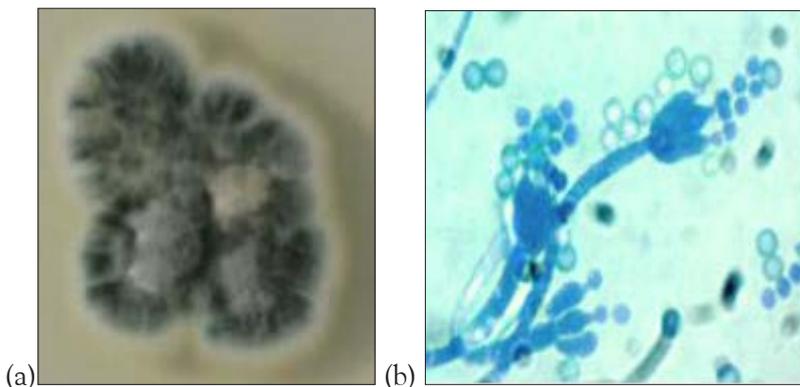
decoración, gomas o sellos aislantes de puertas y ventanas, material de aislamiento del sistema de ventilación y climatización, entre otros) [36].

La fácil proliferación de los *Penicillium* en los alimentos es un problema, pues provocan intoxicaciones. Algunas especies producen toxinas como ocratoxina A, citrinina y ácido ciclopiazónico, entre otras. Sin embargo, muchas especies de *Penicillium* son beneficiosas para los seres humanos. Quesos como el roquefort, brie, camembert, y stilton, entre otros, se crean a partir de la acción de diferentes especies de *Penicillium* sobre la leche y son absolutamente seguros de comer [37]. El antibiótico penicilina es producido por el hongo *Penicillium chrysogenum*.

La taxonomía del género *Penicillium* es compleja y la identificación precisa basada únicamente en criterios macro y micromorfológicos es difícil, aunque posible. Sin embargo, algunos rasgos comunes son compartidos por las especies de *Penicillium* más comunes. Las colonias consisten principalmente en un denso sentido de conidióforos y suelen ser de crecimiento rápido, en tonos de verde a blanco (a veces) y ocasionalmente otros colores. La superficie presenta a menudo algunos exudados y el reverso puede ser de color pálido a amarillento. Las hifas hialinas septadas ($1,5-5\ \mu\text{m}$ de diámetro) llevan conidióforos ramificados o no ramificados. La primera célula del conidióforo se llama estípite y las ramas secundarias se conocen como métulas. Las métulas son más o menos cilíndricas, fialidas, en forma de matraz, de paredes lisas y de tres a seis, en largas cadenas secas de esporas redondas a ovaladas ($2,5-5\ \mu\text{m}$).

Figura 27

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra TCO 6-1



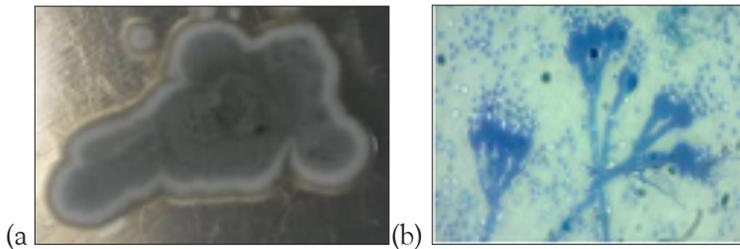
(a) *Penicillium* spp. *ochraceus* vista macroscópica. Presenta forma irregular, elevación acuminada, textura rugosa y color verde. (b) *Penicillium* spp. vista microscópica 100X.

Penicillium digitatum

Es el principal fitopatógeno que ataca cítricos en etapa de poscosecha, causando con ello grandes pérdidas económicas en parte debido a que han aparecido cepas resistentes a los fungicidas, por lo que las investigaciones avanzan en el sentido de desarrollar alternativas de control biológico. *Penicillium digitatum* (Figura 28) es conocido como moho verde, un hongo necrotrófico que se adhiere a la superficie de los cítricos y comienza a colonizar cuando se produce una herida en la corteza del fruto. Crece en forma de filamentos y se reproduce asexualmente a través de la producción de conidias. Tiene un desarrollo relativamente fácil a 20°C y alta humedad relativa.

Figura 28

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra CLO 3-1



(a) *Penicillium digitatum* vista macroscópica. Presenta forma regular, elevación plana, textura lisa polvorosa y color verde. (b) *Penicillium digitatum* vista microscópica 100X.

Moniliophthora

El género *Moniliophthora* apareció en 1978 cuando Evans *et al.* descubrieron que el hongo *Monilia roreri* no se ajustaba a las características del género *Monilia*, ya que las esporas no formaban las cadenas moniloides típicas del género y las hifas se parecían más a las del grupo *Basidiomycetes* al presentar septos del tipo doliporo, por lo que se decidió instaurar el nuevo género *Moniliophthora* (Figura 29), para acomodar este patógeno. En el 2005 se adicionó una nueva especie a este género, la especie *M. pernicioso*, que comparte muchas características típicas del género.

Moniliophthora roreri, especie representativa del género, se caracteriza por ser un hongo mitosporico dentro del orden de los agaricales. Estudios por microscopía electrónica revelaron que este hongo presenta una única espermatogénesis basipetal y posee septos doliporos en el micelio. Las conidias han sido postuladas a

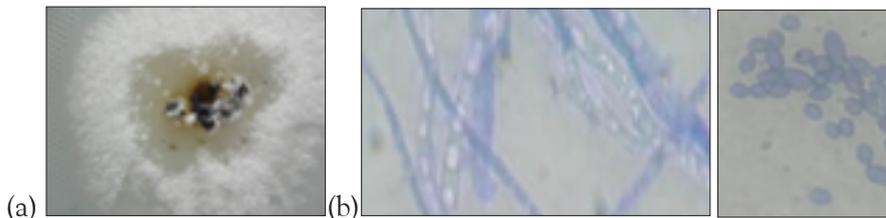
servir como meiosporas, lo que sugiere que estas esporas representan un basidium modificado que perdió la forma, el espesor y la carnosidad del basidiocarpio. Las esporas son multifuncionales y sirven no solo para el intercambio genético, sino también para la dispersión, infección y sobrevivencia. La geometría de las esporas varía de esféricas a ovaladas y presentan dos casos de germinación, ya sea por medio del poro germinativo o en ocasiones directamente desde la pared celular. El tubo germinativo se localiza en el extremo distal y se pueden encontrar estructuras similares a un apresorio. Las esporas de mayor edad se caracterizan por sus paredes con mayor grosor y tonalidades oscuras [39].

Las condiciones ambientales desempeñan un papel fundamental en el avance de *M. royeri*. El ciclo se inicia en el momento en que la humedad ambiental es baja (época seca) y se generan millones de esporas. Luego, estas conidioesporas son diseminadas por el viento y la lluvia y se depositan en la superficie de las hojas y frutos del hospedero. Los conidios germinan en ambientes húmedos y a temperaturas superiores a 24 °C, en un lapso de seis a ocho horas, seguido por la penetración en la epidermis con uso de las hifas infectivas. Es así como las hifas se dirigen hacia los tejidos centrales (mesodermo y semillas) para inducir la producción de proteínas relacionadas con la necrosis, lo cual provoca la muerte del tejido interno y posteriormente del externo. Estas proteínas relacionadas con la patogénesis, tienen altas identidades con proteínas halladas en *Moniliophthora perniciosa*. Se sabe que son secretadas al apoplasto e inducen necrosis en tejidos infectados [39].

M. royeri y *M. perniciosa* causan dos de las tres enfermedades más agresivas en el cacao (*Theobroma cacao*): la enfermedad llamada moniliasis y la enfermedad llamada “escoba de bruja”. Ambas causan grandes pérdidas económicas a los agricultores.

Figura 29

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra CLO 2-1



(a) *Moniliophthora* spp. vista macroscópica. Presenta forma irregular, elevación, textura aterciopelada y color blanco. (b) *Moniliophthora* spp. vista microscópica 100X.

Trichoderma

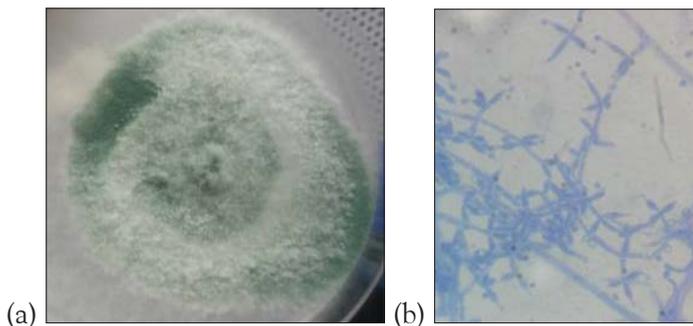
El género *Trichoderma* (Figura 30), son hongos de crecimiento muy rápido, saprofitos del suelo y de la madera en descomposición y restos de planta. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes y se presentan naturalmente en diferentes ambientes. Son aeróbicos, pueden estar en los suelos con pH de neutro hasta ácido y pertenecen al filo *Ascomycota* [40]. Por lo general, *Trichoderma* presenta conidias hialinas uniceluladas, ovoide en conidióforo hialino largo no verticilado y nace en centros pequeños. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales, estructuras que ayudan a la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones drásticas.

Se desarrolla preferentemente en sustratos con alta presencia de humedad y en suelos con un 61 % de capacidad de retención de humedad. Su crecimiento se ve favorecido en condiciones de pH bajas –lo que favorece la formación de conidióforos, la germinación de conidias– y por una menor competencia de microorganismos (actinomicetos y bacterias) que no se encuentran en ambientes ácidos. Crece fácilmente en suelos con temperaturas mayores a 15 °C y alta disponibilidad de nutrientes, por lo que en algunas ocasiones se utiliza como referente para determinar la calidad de un suelo [41].

La capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, les confiere la posibilidad de ser utilizados en la industria biotecnológica como agentes de control biológico de enfermedades vegetales y como estimuladores del crecimiento vegetal [40].

Figura 30

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra LPP 1-1



(a) *Trichoderma* spp. vista macroscópica. Presenta forma circular, elevación plana, textura aterciopelada y color blanco verdoso. (b) *Trichoderma* spp. vista microscópica 100X.

Rhizopus

Rhizopus spp. (Figura 31) es un género de hongos filamentosos que se caracterizan por un cuerpo de micelios ramificados compuestos de tres tipos de hifas: estolones, rizoides y esporangióforos no ramificados. Los esporangios negros en las puntas de los esporangióforos son redondeados y producen numerosas esporas multinucleadas no móviles para la reproducción asexual. *Rhizopus* puede reproducirse sexualmente cuando están presentes dos micelios compatibles y fisiológicamente distintos. Las colonias de rápido crecimiento se desvanecen de blanco a oscuro a medida que producen esporas y son similares al algodón de azúcar en su textura.

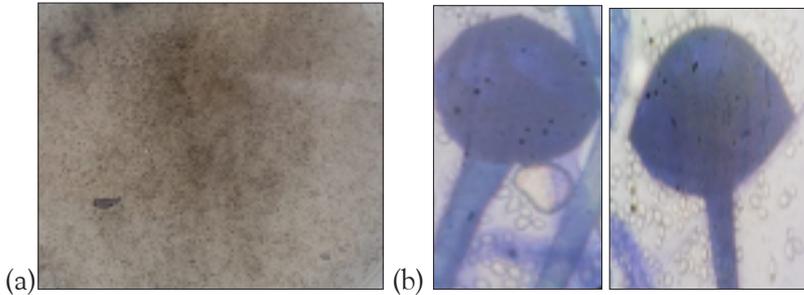
Las especies de *Rhizopus* son contaminantes comunes. Algunas especies son oportunistas en humanos y causan enfermedades como zigomicosis, es una enfermedad rara y grave causada principalmente por *R. arrhizus* en víctimas por quemaduras, personas con desnutrición grave, pacientes con cetoacidosis diabética o personas inmunocomprometidas. La infección invade los vasos sanguíneos en humanos y otros animales y puede progresar a otras áreas del cuerpo, incluidos el cerebro y los pulmones.

Este género se puede encontrar en suelo, frutas y verduras en descomposición, excrementos de algunos animales, así como también en alimentos como el pan viejo (*R. nigricans*). Muchos se utilizan comúnmente en procesos industriales. *R. oryzae* es útil para la producción de ácido láctico y cortisona, para la fermentación alcohólica y para la biosorción de metales pesados. *R. stolonifer* –un fitopatógeno– se utiliza para producir ácido fumárico, ácido láctico y cortisona. *R. delemar* produce ácido fumárico y biotina; otras son usadas con grandes beneficios como la producción de tempe fermentado (*R. microsporas*), y actualmente la investigación biotecnológica avanza hacia la producción de metabolitos, como el ácido málico (*Rhizopus oryzae*) [42].

Algunas especies fitopatógenas como *R. stolonifer* y *R. arrhizus* pueden producir enfermedades conocidas como podredumbre por almacenamiento, que pueden afectar los tejidos blandos de las frutas cosechadas y causar una fuga acuosa que los hace no comestibles, afectando así cultivos como tomate, papayas, fresas, entre otras.

Figura 31

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra DPA 4-2



(a) *Rhizopus* spp. vista macroscópica. Presenta, elevación, textura algodonosa, y color blanco que se torna café grisáceo. (b) *Rhizopus* spp. vista microscópica 100X.

Nigrospora

Nigrospora (Figura 32) es un género importante de ascomicetos fúngicos con una distribución cosmopolita y una amplia gama de huéspedes. Las especies de *Nigrospora* se han aislado como endófitos de hojas y tallos de diversas plantas o como saprofito de larvas muertas u hojarasca. También se han registrado comúnmente como patógenos de plantas como *N. oryzae* que causa el tizón del tallo en *Brassica juncea* en India, *N. sphaerica* que causa el tizón de la hoja en *Camellia sinensis* en China y *N. musae* que causa la enfermedad del squirter en bananos. Además, *N. sphaerica* es un patógeno oportunista que causa onicomiosis en humanos y úlcera corneal [43].

Las colonias crecen rápidamente y aparecen lanosas. Los conidióforos son cortos, surgen de micelio, aparecen de color translúcido y tienen un diámetro promedio de 8 a 11 μm . Los conidióforos suelen ser tallos rectos o ligeramente curvados y los conidios crecen a partir de las puntas de los conidióforos. Los conidios son de color marrón pardo, esferoides oblatos, unicelulares y en promedio, van desde 16 μm y 18 μm de diámetro. La colonia de aspecto translúcido blanco inicial de *N. sphaerica* se vuelve marrón/negra debido a la esporulación en masa de las conidias de los conidióforos [44].

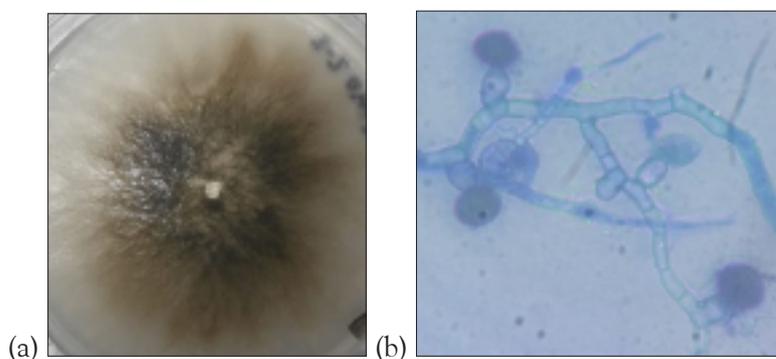
Las especies de *Nigrospora* están comúnmente aisladas del ambiente interior. *N. sphaerica* tiene un violento mecanismo de descarga de esporas a las que puede proyectar por la fuerza a una distancia de hasta 2 cm centímetros y 6,7 cm horizontalmente. Las esporas de *Nigrospora* son uno de los grupos más dominantes en la atmósfera, ya que están asociadas con tormentas de polvo. Además, algunas

esporas de *Nigrospora* son responsables de una respuesta alérgica de tipo I, rinitis estacional (fiebre del heno), asma o enfermedades alérgicas respiratorias [43].

Nigrospora se considera extremadamente interesante como fuente de productos naturales y a sus aplicaciones industriales potenciales. Los metabolitos producidos por *N. sacchari* mostraron una notable actividad herbicida en condiciones de invernadero. Adicionalmente, se encontró que la fomalactona, producida por *N. spherica*, es un componente activo contra los mosquitos. [43]

Figura 32

Características macroscópicas y microscópicas de la muestra CMO 2-2



(a) *Nigrospora* spp. vista macroscópica. Presenta forma circular, elevación plana, textura algodonosa con borde blanco y color marrón verdoso. (b) *Nigrospora* spp. vista microscópica 100X.

Discusión

Los productos elaborados a partir de cacao despiertan cada día mayor interés por parte de los consumidores. Sin embargo, no es así en lo que se refiere a la investigación de la micobiota presente en los granos de cacao, materia prima para la elaboración de dichos productos. En este estudio se encontraron seis géneros diferentes de hongos: *Aspergillus* (85 %), *Penicillium* (5 %), *Rhizopus* (4 %), *Trichoderma* (4 %), *Moniliniophthora* (1 %) y *Nigrospora* (1 %). Estos datos concuerdan parcialmente con estudios previos en los que la mayoría de los hongos encontrados en muestras de cacao de Ecuador, Guinea Ecuatorial y Sierra Leona, son de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* [45]. Estos resultados muestran unas poblaciones menores diferentes debido a que cada ecosistema tiene sus propias características ambientales que permiten la adaptación de especies particulares.

La mayor preocupación referente a la presencia de micobiota en los granos de cacao, es la posibilidad de contaminación con micotoxinas y dos de los géneros encontrados tienen especies productoras de micotoxinas. Entre las especies productoras de micotoxinas del género *Aspergillus* se encontraron: *A. ochraceus* (2 %), con algunas cepas que pueden producir diferentes toxinas entre ellas la ocratoxina A; *A. flavus* (13 %, con algunas cepas que pueden producir aflatoxinas y *A. fumigatus*, con algunas cepas que pueden producir gliotoxina. Del género *Penicillium* no se identificaron, a nivel de especie, cepas productoras de micotoxinas, aunque dentro de la especie *Penicillium* spp es posible que existan cepas productoras, ya que este porcentaje es alto (50 %). Aunque en este estudio no se evaluó la presencia de micotoxinas, se deja en evidencia la necesidad de profundizar más la investigación sobre el tipo de cepas encontradas, para formular planes de acción que lleven a evitar futuros riesgos en este sentido.

Otra de las grandes preocupaciones referidas al cultivo es la presencia del género *Moniliophthora*, cuyas especies *M. roreri* y *M. perniciosa* causan dos de las tres enfermedades más agresivas del cacao, la enfermedad llamada moniliasis y la enfermedad llamada “escoba de bruja” respectivamente, que causan grandes pérdidas económicas a los agricultores. La presencia de estos hongos es indicativo del estado fitosanitario de los cultivos. Se encontró en 1 % de las muestras, que aunque es un porcentaje bajo, debe atenderse para evitar brotes y diseminación a otras haciendas.

La presencia de *Penicillium digitatum*, (50 % del género *Penicillium*) patógeno que ataca preferentemente frutos de cítricos, se debe en parte a que en esta región el cacao se siembra en asociación con cultivos de cítricos (en especial limón), banano y plátano, los cuales le brindan sombra al árbol de cacao cuando está creciendo. Estos cultivos asociados, también le brindan al agricultor un ingreso adicional antes de que los árboles de cacao den sus primeras cosechas y trae múltiples beneficios en el mejoramiento de la calidad de los suelos. Aunque no se han encontrado relaciones directas entre este patógeno y el cacao, la alta incidencia de este patógeno puede poner en serios problemas la supervivencia de los árboles de cacao, sobre todo en edades tempranas cuando las necesidades de sombra en el cultivo se hacen más evidentes.

También es importante resaltar la presencia de los hongos descomponedores de materia orgánica (73 % del total encontrado), que se localizan normalmente en varios ecosistemas y que intervienen en la descomposición de la materia orgánica (hojas, cáscara de cacao, entre otros) y la recirculación de nutrientes del cultivo. Entre ellos se encontraron *Trichoderma* spp, *Rhizopus* spp, *Nigrospora* spp, *A. niger* (61 % del género *Aspergillus*), *A. oryzae* (2 % del género *Aspergillus*) y *A. terreus*

(13 % del género *Aspergillus*). Aunque estos no han sido reportados como tóxicos, su presencia en los granos de cacao puede ocasionar que la producción de enzimas de estos hongos cuando las condiciones le sean favorables, resulte en una pérdida de la calidad del cacao, en particular por el incremento de la acidez.

Conclusiones

La microbiota encontrada en los granos de cacao seco puede ser un indicativo de calidad de los procesos de cultivo, cosecha y poscosecha llevados a cabo por los agricultores, ya que cada etapa está influenciada por una microbiota específica, que, aunque difícil de controlar, su incidencia se puede disminuir al máximo.

Son de gran importancia las acciones para disminuir la microbiota presente en los granos de cacao seco, en especial la de géneros productores de micotoxinas, debido a que durante el proceso de almacenamiento es posible que los hongos produzcan las micotoxinas y contaminen el producto final.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada por “Colciencias, Patrimonio Autónomo Fondo Nacional de Financiamiento para la Ciencia, la Tecnología y la Innovación Francisco José de Caldas” (Contrato 808-2018. Acuerdo 240-2019. Número 123280864259).



CAPÍTULO IV

Biodegradación de
un colorante AZO
por una cepa de levadura
Galactomyces
geotrichum L-80.

CAPÍTULO IV

Biodegradación de un colorante AZO por una cepa de levadura *Galactomyces geotrichum* L-80.

Johannes Delgado Ospina,^{1,2} Natalia Ortega Moncanut,¹ Juan Carlos Muñoz Vargas,¹ Karen Andrea Hernández Salcedo,¹ Carlos David Grande Tovar³ y Clemencia Chaves López.²

Resumen

Por medio de la cepa *Galactomyces geotrichum* L-80 se extrajo un complejo enzimático con la capacidad de degradar residuos de coloración producida en las industrias textil; estos residuos pueden tener efectos tóxicos, además de inhibir el proceso fotosintético de las plantas. En este trabajo se utilizó la enzima extraída la cual rompió el grupo AZO que se encontraba en el colorante rojo de metilo, degradándolo completamente. El tiempo que le tomó a la enzima degradar el colorante dependió de la cantidad usada.

Palabras claves: enzima, grupo azo, rojo de metilo, decoloración, *Galactomyces geotrichum*.

1 Grupo de Investigación Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Buenaventura Cali, Carrera 122 # 6-65, 76001, Cali, Colombia.

2 Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, University of Teramo, Via R. Balzarini 1, 64100, Teramo, Italy.

3 Grupo de Investigación de Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico, Carrera 30 # 8-49, 081008, Puerto Colombia, Colombia.

Introducción

En Colombia, la industria textil es indudablemente uno de los sectores más destacables de la economía debido a que aporta el equivalente al 6 % del PIB y promueve aproximadamente el 24 % del empleo en el país [1]. Antioquia y Cundinamarca son los departamentos donde están ubicadas la mayoría de las industrias textiles del país. Las telas se pueden fabricar tejidas, trenzadas o en fieltros a partir de fibras naturales (lino, lana, algodón, y seda) o sintéticas (poliéster), que se transforman en hilos mediante el proceso de hilado y que finalmente se tejen para obtener las telas.

El color de las telas se obtiene mediante la adición de pigmentos minerales, vegetales o sintéticos, los cuales se puede incorporar en la fibra antes de ser hilada, una vez hilada o cuando ya es tela. A estos pigmentos también se los denomina colorantes y se caracterizan por ser reactivos y formar enlaces covalentes entre los grupos $-OH$, $-NH-$ o $-SH-$, y las fibras de las telas.

Dentro de la molécula del colorante, el grupo cromóforo es el responsable del color. Entre los cromóforos, los más representativos son los cromóforos etilénicos, los azo, los aromáticos, los derivados del trifenilmetano, los derivados de la antraquinona, los derivados heteroaromáticos y las ftalocianinas.

Los colorantes azo o azoicos contienen el grupo cromóforo $-N=N-$ del que deriva su nombre. Entre los principales se encuentran el rojo de metilo, el rojo ácido-138, el naranja ácido 7 y el azul directo-15, entre muchos otros, usualmente utilizados por la industria textil para la coloración de telas.

El uso de estos colorantes en la industria textil es un contaminante del agua debido al bajo grado de fijación en las telas, lo que ocasiona que las aguas residuales contengan colorantes y sus productos de degradación (aminas aromáticas), lo que hace de esta industria una de las mayores fuentes de contaminación del agua, la cual se incrementa día a día por el aumento en la demanda de productos textiles [2].

Las grandes cantidades de aguas residuales textiles pueden alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas del medioambiente acuático y podrían ser perjudiciales para la salud, la vida silvestre, los peces y otras especies biológicas [3], [4]. También pueden presentarse efectos tóxicos o mutagénicos [5] o simplemente impedir el paso de la luz solar, lo que suprime la fotosíntesis. Los colorantes son el principal contaminante de las aguas residuales [6].

La remoción de los colorantes de los efluentes es llevada a cabo por diversos métodos químicos (oxidación, electrólisis, ozonólisis), físicos (filtración, ósmosis

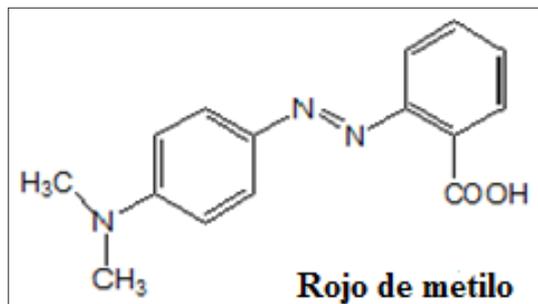
inversa, adsorción, coagulación, floculación) y biológicos (microorganismos, enzimas), pero la mayoría tiene alto costo o muy bajo rendimiento [7].

Entre los diversos métodos de decoloración, la degradación bacteriana de los colorantes azoicos ha cobrado fuerza como método de tratamiento, ya que es de bajo costo, respetuoso del medioambiente y se puede aplicar a una amplia gama de estos colorantes. Sin embargo, la utilización directa de enzimas puede proveer mayores ventajas siempre y cuando se conserven las condiciones fisicoquímicas de actividad enzimática.

Las enzimas, por ser compuestos de naturaleza proteica, se encuentran principalmente en el interior de las células y deben ser extraídas y purificadas para darles un uso comercial. Son muchos los microorganismos (especialmente bacterias y hongos) capaces de degradar colorantes [6], de los cuales se pueden extraer las enzimas responsables de esta degradación.

El objeto de este trabajo es evaluar un grupo de enzimas extraídas de una cepa de *Galactomyces geotrichum* y su potencial uso en la degradación de colorantes tipo azo utilizando el rojo de metilo como indicador de actividad (Figura 33).

Figura 33
Estructura molecular del rojo de metilo



Metodología

Microorganismos usados

Se utilizaron cepas de levaduras aisladas y caracterizadas a partir de diferentes productos fermentados, proporcionadas por el laboratorio de investigaciones de la Universidad de San Buenaventura Cali.

Actividad de decoloración

Un total de quince cepas de levaduras fueron examinadas por sus actividades de decoloración de rojo de metilo. En tubos de 10 mL se preparó caldo YPD adicionado de colorante rojo de metilo, a una concentración final de 100 mg l^{-1} y se inoculó con $100 \mu\text{l}$ de la cepa de levadura previamente diluida para obtener una concentración de 10^6 UFC en cada uno de los tubos. Se seleccionó para el trabajo la cepa que degradó el colorante, identificada como *Galactomyces geotrichum* L-80.

Crecimiento de la cepa

La cepa *G. geotrichum* (cultivo puro) se inoculó en 100 mL de medio lácteo estéril (elaborado a partir de leche en polvo descremada al 12,7 %), y se dejó crecer durante 72 horas en ambiente aerobio, a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) y agitación constante a 120 rpm. El conteo celular se hizo con cámara de Neubauer, con el objetivo de corroborar el número de células disponibles.

Extracción de las enzimas

Las células de *G. geotrichum* se precipitaron por centrifugado ($9000 \text{ rpm}/10 \text{ min}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$), con la finalidad de separar las células de otras sustancias (sobrenadante). Al haber separado las células, estas se resuspendieron en 50 mL de una solución *buffer* fosfato pH 7,0. Las células en suspensión fueron llevadas al ultrasonido con nueve ciclos de un minuto con intervalos de dos minutos. Su objetivo era romper las células y liberar los componentes que se encuentra en su interior, entre ellos las enzimas. Para separar las enzimas de las células y otros componentes celulares, se llevó nuevamente la suspensión a la centrifuga ($9000 \text{ rpm}/10 \text{ min}$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$).

El sobrenadante que contenía las enzimas se filtró con filtro de jeringa de $0,22 \mu\text{m}$ pvdf y se llevó a congelación ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) para proceder a liofilizarlo en un equipo Labconco 4.5 L, temperatura de calentamiento constante de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y presión de vacío de $0,12 \text{ mbar}$.

Actividad enzimática

Para determinar la actividad del extracto enzimático y la cantidad necesaria para degradar los colorantes en un tiempo considerable, se tomaron cinco tubos cónicos con 5 mL del colorante rojo de metilo (100 mg l^{-1}) y diferentes concen-

traciones de enzima, y se incubaron a 30 °C hasta su completa decoloración. La unidad de actividad enzimática fue definida como la cantidad de enzima requerida para reducir 1 μg de sustrato $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de enzima.

Pruebas de biodegradación

El diseño experimental consistió en modificar el pH (3,4, 5,1 y 7,0), la temperatura (30 °C y 40 °C) del extracto enzimático para obtener un total de seis unidades experimentales, cada una con los respectivos blancos. En los tubos de reacción se adicionaron 50 mL del colorante a una concentración de 100 mg l^{-1} y 1,2 mg del extracto liofilizado y se pusieron en oscuridad durante 48 horas. La biodegradación del colorante fue monitoreada utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (Genesys 10) a una longitud de onda de 540 nm.

Pruebas de fitotoxicidad

Se utilizaron semillas de *Zea mays* (maíz). Cada producto enzimático de degradación se depositó en una caja de Petri con cinco semillas de cada especie, con riego diario de 5 mL de agua durante siete días, al final de los cuales se midió el porcentaje de germinación y la longitud de los tallos y raíces.

Resultados y discusión

El crecimiento de *G. geotrichum* en el medio líquido alcanzó una concentración de $1,44 \times 10^8$ células/mL. A partir de 100 mL de medio se obtuvieron 330 mg de extracto enzimático liofilizado.

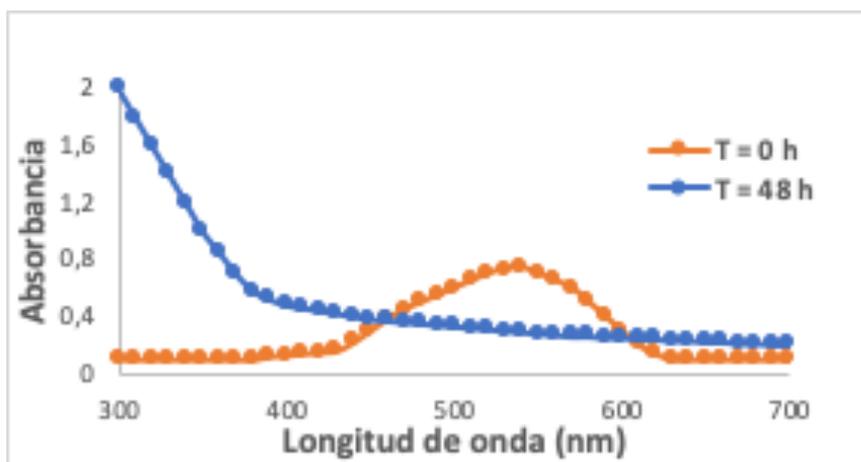
El extracto enzimático extraído de la levadura *G. geotrichum* degradó efectivamente el colorante rojo de metilo (100 mg L^{-1}), como se evidencia en el espectro de absorción (Figura 34). Se observó la disminución de la absorbancia (línea azul) luego de la reacción de decoloración enzimática en el rango de 500 a 600 nm, que corresponde a la zona de máxima absorbancia del colorante. El aumento de la absorbancia en otras longitudes de onda se atribuye a la formación de productos de degradación.

La actividad presente en el complejo enzimático es típico de enzimas con actividad óxido reductasa, lo que facilita la decoloración del rojo de metilo, posiblemente por ruptura de su centro cromóforo $-\text{N}=\text{N}-$, donde la transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro ocasiona el rompimiento del doble enlace, lo que trae consigo la formación de nuevos compuestos.

La actividad enzimática del extracto liofilizado fue determinada a 30 °C y un pH de 3,4. Se obtuvo como resultado 1,5 μg de rojo de metilo reducido min^{-1} mg^{-1} de extracto.

Figura 34

Espectro UV de rojo de metilo hora cero y rojo de metilo completamente decolorizado luego de 48 horas a pH 3,42 y 30 °C.



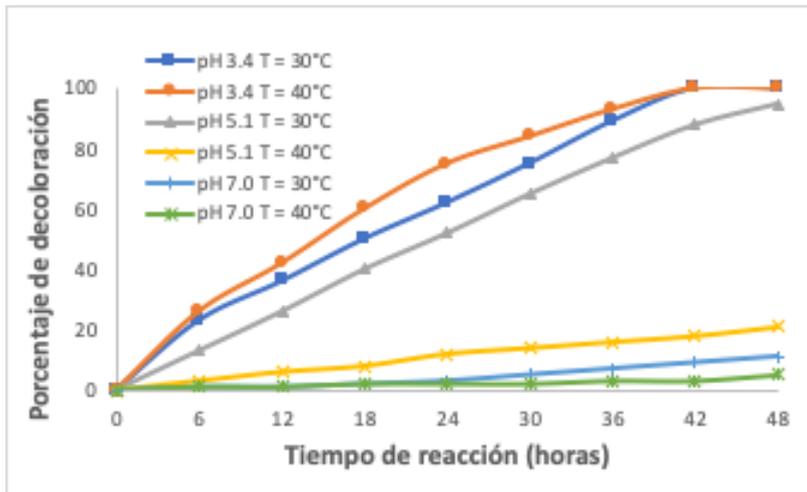
Efecto de la temperatura y el pH en la decoloración

Se observó que la actividad del sustrato enzimático es dependiente del pH y de la temperatura en el rango evaluado (Figura 35). Cuando se evaluó el sustrato a pH 3,84 se observó muy poca variación entre las dos temperaturas evaluadas. Las dos presentaron la respuesta esperada al final de las 48 horas. A pH 5,1 se observó que la respuesta disminuye a 30 °C y no alcanza a decolorar el sustrato en su totalidad en el tiempo esperado. Cuando la temperatura aumenta a 40 °C, la actividad disminuye al 21 %. Una actividad menor se observó en pH 7,0 con disminución a valores por debajo del 20 % para las dos temperaturas.

El valor óptimo de trabajo del sustrato enzimático se estableció en pH 3,4 y temperaturas entre 30 °C y 40 °C, resultado en concordancia con Jadhav, *et al.* [8], quienes reportan que el pH apropiado para la decoloración enzimática del rojo de metilo es de 3,0, valor cercano al trabajado en esta investigación.

Figura 35

Decoloración del rojo de metilo a 30 °C y 40 °C en el intervalo de 24 horas a pH 3,84, 5,1 y 7,0. La reacción enzimática estuvo influenciada por el pH. Se encontró degradación diferencial de los dos colorantes utilizados. De los valores evaluados, el óptimo fue de pH 3,42



Fitotoxicidad

El colorante rojo de metilo no mostró efectos tóxicos que impidieran la germinación de las semillas de *Zea mays* (maíz) en las concentraciones del estudio (100 mg l⁻¹). Sin embargo, sus productos de degradación sí presentaron fitotoxicidad. Se observó que la inhibición de la germinación aumentó a medida que aumentaron el pH y la temperatura (Tabla 15). Esto evidencia que la reacción enzimática sobre la decoloración del rojo de metilo es dependiente de la protonación, principalmente del grupo carboxilo.

Es relevante que a pH 7,0, la decoloración del rojo de metilo solo alcanzó el 11 %, pero presentó el mayor porcentaje de inhibición sobre la germinación de las semillas de maíz. Este comportamiento muestra cómo se pueden afectar de manera sustancial los efluentes que contienen residuos de este colorante y con pH cercanos a la neutralidad se brindan las condiciones necesarias para que microorganismos que produzcan enzimas óxido reductasas similares a los que produce la levadura en este estudio, puedan generar gran cantidad de metabolitos de decoloración con capacidad de inhibir, entre otros, la germinación de semillas.

Tabla 15 Fitotoxicidad del rojo de metilo (100 mg l ⁻¹) y sus metabolitos producidos luego de la decoloración a diferentes temperaturas y pH.			
	<i>Zea mays</i> (maíz)		
pH	3,4	5,1	7,0
	Inhibición de la germinación (%)		
Agua	0	0	0
Rojo de metilo	0	0	0
Productos de degradación a 30 °C	10	10	50
Productos de degradación a 40 °C	10	50	80

Conclusiones

El extracto enzimático que se extrajo de la levadura *G. geotrichum* L-80 presenta capacidad de degradar el colorante rojo de metilo, lo cual sugiere que este podría ser utilizado en el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria textil.

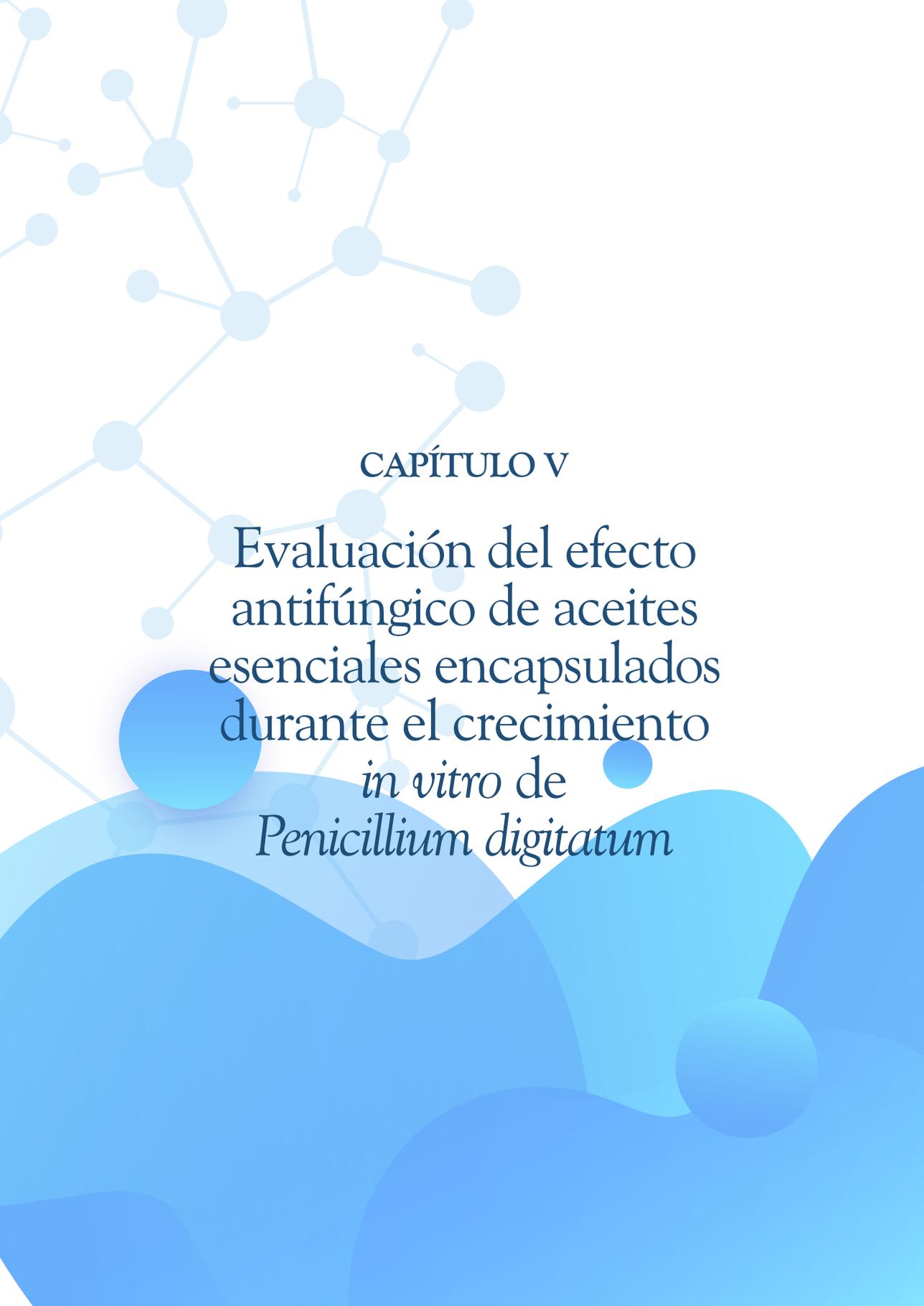
Las temperaturas altas influyen negativamente en este proceso, ya que inhiben la actividad enzimática del extracto y sus productos de degradación son fitotóxicos.

El extracto enzimático extraído de la cepa *G. geotrichum* L-80 posee mayor actividad a pH ácidos.

Las industrias textiles representan una gran amenaza ambiental a causa de la gran cantidad de agua usada, lo que deja como resultado grandes cantidades de efluentes que contienen componentes como los colorantes, los cuales necesitan la aplicación de varias técnicas para su tratamiento por su compleja composición. Sin embargo, no cabe en duda que estas técnicas dejan como resultado efectos secundarios.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de San Buenaventura Cali y a la Dirección de Investigaciones por su apoyo económico al proyecto y al semillero de investigación.



CAPÍTULO V

Evaluación del efecto
antifúngico de aceites
esenciales encapsulados
durante el crecimiento
in vitro de
Penicillium digitatum

CAPÍTULO V

Evaluación del efecto antifúngico de aceites esenciales encapsulados durante el crecimiento *in vitro* de *Penicillium digitatum*

José Raúl Alejandro Bernal Barón,¹ Carlos David Grande Tovar,² Fabián Felipe Fernández Daza,³ Johannes Delgado Ospina^{1,4} y Raúl Alberto Cuervo Mulet.¹

Resumen

En este trabajo se estudió el efecto antifúngico *in vitro* de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación y encapsulados en β -ciclodextrinas y maltodextrinas de tomillo, canela, romero, salvia amarga y eucalipto sobre el hongo fitopatógeno *Penicillium digitatum* causante de la podredumbre verde en los cítricos. Los complejos de β -ciclodextrinas y maltodextrinas fueron preparados mediante liofilización y los parámetros de crecimiento fueron calculados por el ajuste de curvas del crecimiento con la ecuación de Baranyi usando el programa DMfit. Las familias químicas halladas más abundantes de los aceites analizados fueron los monoterpenos y sesquiterpenos, tanto oxigenados como no oxigenados de

1 Grupo de Investigación Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Buenaventura Cali, Carrera 122 # 6-65, 76001, Cali, Colombia.

2 Grupo de Investigación de Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico, Carrera 30 # 8-49, 081008, Puerto Colombia, Colombia.

3 Grupo Salud, Ambiente y Productividad (GISAP), Facultad de Educación Virtual y a Distancia, Institución Universitaria Antonio José Camacho, Avenida 6N # 28N-102, 25663, Cali, Colombia.

4 Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, University of Teramo, Via R. Balzarini 1, 64100, Teramo, Italy.

los aceites esenciales de tomillo, canela y romero. Todos los aceites estudiados encapsulados mostraron actividad antifúngica. Sin embargo, los aceites encapsulados con mayor actividad fueron los de canela y tomillo al lograr inhibir el 100% del crecimiento con concentraciones entre 5000 y 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente. No hubo una diferencia significativa entre las matrices encapsulantes ($P > 0.05$). Además, se evidenció un efecto fungistático del aceite esencial de canela encapsulado en β -ciclodextrinas y maltodextrinas a concentraciones de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un efecto fungicida a más de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El aceite esencial de tomillo mostró un efecto fungicida a 5000, 10000 y 15000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con MD y BCD.

En este estudio se demostró que los aceites de canela, tomillo, romero, salvia amarga y eucalipto poseen moléculas con capacidad de inhibir el crecimiento de *P. digitatum* y estas permanecen activas al ser encapsuladas en MD y BCD. Experimentos con biomoléculas encapsuladas proveen una mejor dispersión en agua y hace que sean menos volátiles convirtiéndolas en una opción prometedora en el desarrollo de bioformulaciones antimicrobianas a escala industrial.

Palabras claves: aceites esenciales, β -ciclodextrinas y maltodextrinas, *Penicillium digitatum*.

Introducción

Las causas más comunes de pérdidas de cítricos en todo el mundo son ocasionadas por pudriciones generadas por *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, denominadas putrefacción azul y verde, respectivamente [1]. La incidencia de estas podredumbres es general y elevada (normalmente más del 80 % del total de pérdidas por podridos) [2].

En Colombia, se calcula una producción entre ochocientos mil y un millón de cítricos, de los cuales se pierden entre el 12 % y el 25 %, lo que demanda una estrategia ambiental sostenible y económica para reducir estas pérdidas.

En la actualidad, las técnicas para el control de enfermedades en cítricos más usadas se basan en fungicidas sintéticos. Sin embargo, Lado y colaboradores [3], demostraron que la aplicación continuada de estos fungicidas en *P. digitatum* generó un aumento en la frecuencia de cepas resistentes, lo que obligaba a aumentar la dosis del fungicida utilizado [4], y lo convertía en una amenaza por la resistencia que produce la contaminación ambiental debido a la afectación del microbiota fijador de nitrógeno y por acumulación de grandes dosis en los sistemas biológicos.

Por lo anterior, se requiere el uso de alternativas más amigables con el medioambiente para el control de hongos. Dentro de estas, las más empleadas se encuentran los aceites esenciales (AE) provenientes de plantas y sus partes. Los AE están compuestos por una mezcla de terpenos, terpenoides, aldehídos y alcoholes, de los cuales un porcentaje alto es volátil [5].

Diferentes investigaciones han mostrado la eficacia de los aceites esenciales de eucalipto, lavanda, canela, menta y clavo, contra microorganismos resistentes a los antibióticos de ambientes hospitalarios dentro de los que se contemplan bacterias como *S. aureus* y algunas levaduras del género *Candida*.

Grande y colaboradores [6], reportaron el efecto subletal del AE *Austroepatorium inulifolium* contra cepas de hongos *Penicillium brevicompactum*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus spp* y *Penicillium nalgiovense*. Estos aceites se presentan como una alternativa a los plaguicidas químicos sintéticos convencionales por su menor riesgo para la salud y su biodegradabilidad [7]. Diferentes concentraciones de aceites esenciales (AE) han mostrado efectos fungistáticos y fungicidas sobre diferentes géneros de fitopatógenos. El efecto fungicida corresponde a cualquier agente capaz de matar hongos; es decir, no sólo agentes químicos sino también físicos (UV y calor, entre otros) [8]. El término fungistático corresponde a la inhibición del crecimiento del patógeno o la inhibición en la germinación de esporas. Por otra parte, la alta volatilidad de los AE causada por el elevado número de electrones que poseen sus componentes, hace que su aplicación directa en cultivos sea prácticamente inviable, por lo cual se usan métodos de encapsulación para que la liberación de los componentes del aceite sea más controlada [7].

Con el proceso de encapsulación se pretende aumentar los tiempos de almacenamiento y volver sus componentes menos volátiles y más estables frente a condiciones adversas, tales como las temperaturas extremas, la radiación ultravioleta y las vibraciones causadas por ruidos elevados [9], lo cual prolonga su efecto antimicrobiano al mantener las moléculas de interés de los aceites esenciales durante más tiempo. Sagrove y colaboradores [10], encapsularon transcinamaldehído e inhibieron algunas especies de hongos, bacterias y levaduras con un efecto prolongado duradero.

Entre los materiales, los más utilizados para la encapsulación en aplicaciones alimentarias son las maltodextrinas (MD) y las β -ciclodextrinas (BCD) [10]. Estas son extensivamente utilizadas en la industria de alimentos porque son inodoras, incoloras, solubles, de baja viscosidad, poseer características de emulsificación y son versátiles para la mayoría de los métodos de encapsulación; además, son biodegradables en el medioambiente al estar constituidas de polímeros de glucosa. La mayoría de los encapsulados se preparan por pulverización, mientras que

otros se obtienen mediante liofilización, extrusión en estado fundido e inyección en fusión.

En este trabajo se evaluó la capacidad inhibitoria contra *P. digitatum in vitro* mediante la aplicación independiente de encapsulados de los AE de salvia amarga (AES), tomillo (AET), romero (AER), canela (AEC) y eucalipto (AEE).

Materiales y métodos

Aislamiento e identificación del hongo fitopatógeno

El hongo fitopatógeno se aisló de frutos de diez naranjas (*Citrus sinensis*) procedentes de centros y expendios de frutas de la ciudad Santiago de Cali. Se tomaron porciones del fruto enfermo y mediante raspado se removió la mayor cantidad de esporas. Se sembraron en cajas de Petri que contenían papa-dextrosa-agar (PDA) como medio de cultivo [12]. Las cajas de Petri se incubaron por siete días a 25 °C hasta el desarrollo de colonias viables. El hongo aislado se identificó a nivel de género y especie de acuerdo con las claves de Houbraken *et al.*, 2014 [13].

Identificación de P. digitatum

Se utilizó el método de microcultivo que permite observar las estructuras fúngicas *in situ*. Se ubicó un portaobjetos en una caja para agar y sobre este una capa de agar PDA de 1 cm² en la superficie de la lámina. Posteriormente, se sembró en el centro del fragmento del cultivo y luego se ubicó encima una lámina limpia para después incubar. Luego, se visualizaron las colonias al microscopio y de acuerdo con sus estructuras se clasificó el hongo hallado [13].

Obtención de inóculos de P. digitatum

Las cepas se sembraron en el medio PDA, incubando a 27 °C por seis días con un fotoperiodo 12:12 y humedad relativa de 50±1 %. Una vez esporuladas, las conidias se depositaron en cajas de Petri, se adicionaron 50 mL de Tween 80 al 0,05 %, se agitó por 60 segundos y posteriormente se vertió en un vaso de precipitación de 250 mL. La concentración se ajustó a 5x10⁵ conidias/mL usando la cámara de Neubauer [14].

Medio de crecimiento (agar, papa y glucosa)

Se utilizaron 200 g de papa en 800 mL de agua destilada, los cuales fueron llevados a ebullición. Posteriormente, se adicionaron 20 g de dextrosa y 15 g de agar mediante una gasa delgada. Los medios fueron autoclavados durante 20 minutos. Seguidamente, se sirvieron en cajas para agar en una cabina de flujo laminar [15].

Preparación del material vegetal

En esta investigación, los aceites esenciales fueron extraídos a partir de *Austroepatorium inulifolium* (Salvia amarga), cuyo material vegetal fue colectado en el municipio de Dapa (3°32'57.9"N y 76°34'29.3"), mientras que *Thymus vulgaris* (tomillo), *Rosmarinus officinalis* (romero) y *Eucalyptus cinerea* (eucalipto), fueron colectados en el corregimiento La Buitrera (3°26'56.8"N y 76°08'59.9"W) y *Cinnamomum verum* (canela), fue adquirido en mercado local (Valle del Cauca, Colombia).

Extracción de aceites esenciales

El material vegetal fue secado a 30 °C durante 48 horas. Seguidamente se adicionaron 500 g a un balón de destilación conectado a una trampa de Cleverger, se agregaron 500 mL de agua y se calentó a 100 °C durante seis horas. Los aceites esenciales obtenidos fueron recuperados mediante la adición de Na₂SO₄ (Sigma Aldrich, Estados Unidos), y almacenados en oscuridad a -4 °C hasta su uso [6].

Bioensayo con agentes antimicrobianos

El análisis se hizo mediante la técnica de dilución en agar, en medio PDA que contenía concentraciones de 5000, 10000 y 15000 µg/mL de cada aceite encapsulado, una colonia control negativo consistente en medio PDA con BCD y otro control con MD para la determinación de la capacidad mínima inhibitoria (CMI). En cada una de las cajas se colocó en la superficie una porción de la cepa del hongo de 0,45 cm de diámetro, proveniente de cepas de cuatro días de desarrollo. La inhibición se determinó como la relación entre el diámetro de crecimiento de colonias tratadas y el diámetro de la colonia control. En todos los casos, el diámetro de las colonias se estimó mediante el uso de un calibrador y ajustando con la ecuación de Baranyi 1994 usando el software DMFit (versión y año), se obtuvieron los parámetros de crecimiento para cada condición de crecimiento (Baranyi y Roberts, 1994). El índice antifúngico fue medido con la siguiente ecuación:

Análisis de aceites esenciales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis cromatográfico se hizo en un cromatógrafo de gases AT6890 Series Plus (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE. UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (Agilent Technologies, MSD 5975) operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*). La columna empleada en el análisis DB-5MS (J Y Q, Folsim, CA, EE. UU.) [5 %-fenil-poli (dimetilsiloxano), 60mx0.25mmx0.25 µm]. La inyección se hizo en modo split (30:1), Volumen de inyección de 2 µL.

Preparación de los complejos de inclusión con β -ciclodextrinas y maltodextrinas en emulsiones

Para la preparación de las emulsiones se usaron volúmenes totales de 25 mL que contenían 2,5 % de aceite esencial, 5 % de maltodextrinas o beta β -ciclodextrinas y 2,5 % de goma arábica. La emulsificación de las mezclas se llevó a cabo con la ayuda un equipo Ultra Turrax T 25 digital ULTRA-TURRAX® - IKA y con 18000 rpm durante un minuto a 24 °C [16].

Liofilización

Las emulsiones obtenidas fueron congeladas durante 24 horas a -30 °C. Seguidamente, se llevaron a un *beaker* de 250 mL, para luego ser liofilizado a -50 °C y presión 0,12 milibar durante 24 horas. Este procedimiento se hizo en un equipo FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dry. Los sistemas deshidratados obtenidos fueron almacenados en un desecador 24 °C/44 hasta su uso [17].

Análisis estadístico

Los datos del efecto inhibitorio de los aceites esenciales encapsulados sobre el crecimiento micelial se sometieron a un análisis de varianza (Anova). La comparación de los tratamientos se hizo con la prueba de Tukey $\leq 0,05$. El análisis se hizo con el *software* Minitab (versión y año). Los datos son expresados en valores medios \pm desviación estándar.

Resultados y discusión

Determinación de los compuestos volátiles de los aceites esenciales

Aceite esencial de canela

La eficiencia de obtención de aceite esencial de canela mediante hidrodestilación fue de $1,2 \pm 0,5$ mL/100 g de muestra. De los compuestos hallados, 33 fueron identificados, así: uno es un alcohol (3 %), cuatro son aldehídos (12,12 %), once son monoterpenos no oxigenados (33,33 %), once son monoterpenos oxigenados (33,33 %), cinco son sesquiterpenos no oxigenados (15,15 %) y uno sesquiterpenos oxigenados (3 %).

El componente más abundante corresponde a transcinamaldehído (58,9 %), molécula con una alta capacidad antimicrobiana. Otros autores han declarado que su actividad antimicrobiana proviene de un efecto sinérgico con otros compuestos presentes en el mismo aceite esencial [4]. Como se ha evidenciado, los compuestos principales de la fracción volátil de *Cinnamomum verum* fueron aldehídos, sesquiterpenos y monoterpenos. Estos compuestos están ampliamente

distribuidos en plantas y presentes en casi todos los aceites esenciales. Las investigaciones fitoquímicas han mostrado un amplio espectro de actividad biológica a través de la cual parecen desempeñar un papel en los mecanismos de defensa de las plantas [9]. Kaul y colaboradores [18], han señalado que la composición de los aceites de canela difiere en función de la parte del material vegetal y de las condiciones ambientales de las que provenga.

Aceite esencial de tomillo

La eficiencia de obtención de aceite esencial de tomillo a partir de hojas secas fue de $0,9 \pm 0,3$ mL/100g de muestra. Después del análisis GC-MS, se encontraron 38 compuestos de los cuales dos fueron alcoholes (5,26 %), uno aldehídos (2,63 %), trece monoterpenos no oxigenados (34,2 %), trece monoterpenos oxigenados (34,2 %), seis sesquiterpenos no oxigenados (15,7 %) y tres sesquiterpenos oxigenados (7,9 %), como se describe en la Tabla 16. De estos compuestos, el timol presentó la mayor concentración relativa 45,2 %, *p*-cimeno 11,8 %, γ -terpineno 11,6 % y *trans*- β -carifileno 8,7 %. Muchos autores han evidenciado que el timol es un agente antifúngico y el principal componente asociado a la bioactividad de este AE [10]. También se ha confirmado que el compuesto 1,8 cineol es una molécula altamente sinérgica con el timol que ayuda a tener mejor capacidad antimicrobiana, aunque aún no es claro la razón por la cual esta molécula se encuentra en concentraciones más altas (43,23 %) en hojas de tomillo halladas en otras partes del mundo. El uso de timol en producción alimentaria es limitado a causa de su baja solubilidad. Sin embargo, nuevas técnicas de encapsulación han permitido mejorar su inclusión de algunos aceites esenciales en la industria alimentaria [10].

Aceite esencial de romero

La eficiencia de extracción de aceite esencial de romero fue de $2,4 \pm 0,9$ mL/100g de muestra. Después del análisis GC-MS, se encontraron 39 compuestos (Tabla 16), de los cuales doce corresponden a monoterpenos no oxigenados (30,7 %), 25 a monoterpenos oxigenados (64,10 %) y dos a sesquiterpenos no oxigenados (5,12 %). Los compuestos más abundantes fueron el 1,8 cineol con 20,8 %, α -pineno con 11,5 % y borneol con 6,4 %.

Aceite esencial de salvia amarga y eucalipto

La eficacia de extracción de aceite esencial salvia amarga fue de $1,9 \pm 0,6$ mL/100g de hojas secas. Grande y colaboradores [6], hicieron una caracterización del aceite de salvia amarga con material vegetal proveniente del lugar con las mismas coordenadas que este estudio. Después del análisis GC-MS encontraron dos alcanos (2,81 %), dos alquenos (2,81 %), un alcohol (1,40 %), cinco aldehídos (7,04 %), una cetona (1,41 %), 30 monoterpenos (24,25 %),

28 sesquiterpenos (39,43 %) y dos diterpenos (2,8 %). Su mayor componente encontrado fue trans- β -cariofileno (14,84 %). Numerosos estudios reportan que la composición del aceite esencial de eucalipto tiene una baja variabilidad entre especies del mismo género. Su molécula más notoria del AEE es eucaliptol, con rangos entre 60 % y 80 % [19].

Tabla 16

Identificación presuntiva y cantidad relativa (%) de los componentes presentes en AEC (aceite esencial de *Cinnamomum verum*), AER (aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*) y AET (aceite esencial de *Thymus vulgaris*).

Grupo funcional	Componentes	Concentraciones relativas (%)		
		AEC	AER	AET
Alcohol	1-Nonen-3-ol			0,1
	1-Octen-3-ol			1,0
	Cariolan-8-ol	0,4		
Aldehídos	cis-cinamaldehído	0,5		
	Hidroxicinamaldehído	1,0		
	o-Metoxicinamaldehído	0,8		
	Trans-cinamaldehído	58,9		
	3-octanona			0,2
Monoterpenos no oxigenados	Canfeno	0,1	1,6	0,2
	Tuja-2,4(10)-dieno		0,3	
	p-Cimeno	0,1		
	p-Cimeno	1,1	1,1	11,8
	Terpinoleno		1,5	0,1
	α -pineno	0,1	11,5	0,3
	α -terpineno	0,5	0,7	1,7
	α -tujeno			0,5
	β -felandreno	1,3	0,2	0,1
	β -pineno	0,1	1,7	
	δ -3-Careno			0,1
	Limoneno	0,3	3,3	0,3
	Carvacrol metil éter			1,9
	Germancreno D			0,4
	β -mirceno		1,0	0,9
	γ -terpineno	0,1	1,6	11,6
	γ -terpinoleno	0,2		
α -felandreno	0,4	0,3		

Monoterpenos oxigenados	Acetato de geranilo		0,5	
	Acetato de trans-cinamilo	10,9		
	Acetato de verbenilo		0,2	
	α -canfolenal		0,2	
	Alcanfor	0,1	3,5	0,8
	Borneol	0,2	6,4	0,9
	Benzoato de bencilo	4,6		
	Carvacrol			2,9
	Cis-hidrato de sabineno		0,4	1,3
	Cis-pinocafona		0,9	
	Cis-verbenol		0,6	
	Citronelol		0,3	
	Crisantenona		1,6	
	Eugenol	9,1		
	Nopol		1,0	
	Geranial		0,2	
	Pinocarvona		0,6	
	Terpinen	0,7		
	Terpinen-4-ol		1,4	0,4
	Terpineol		0,5	
	Timil metil éter			0,2
	Timol			45,2
	Verbnona		14,0	
	α -terpineol	0,7	3,2	0,1
	Epóxido de α -felandreno	0,1		
	Linalol	2,2	3,8	2,7
Geraniol	4,4		0,1	
Lavandulol			0,1	
Metileugenol		0,5		
Neral		0,2		
Transhidrato de sabineno		0,6	0,4	
Monoterpenos oxigenados	Transpinocanfona		0,1	
	Acetato de bornilo		2,8	
	1,8 cineol	0,2	20,8	0,5
	Mirtenol		0,6	
Sesquiterpenos oxigenados	Óxido cariofileno-b	0,1		
	Óxido de cariofileno			0,8
	Trans- β -cariofileno			8,7
	Epi- α -muurorol			0,1
	No identificado	0,2		

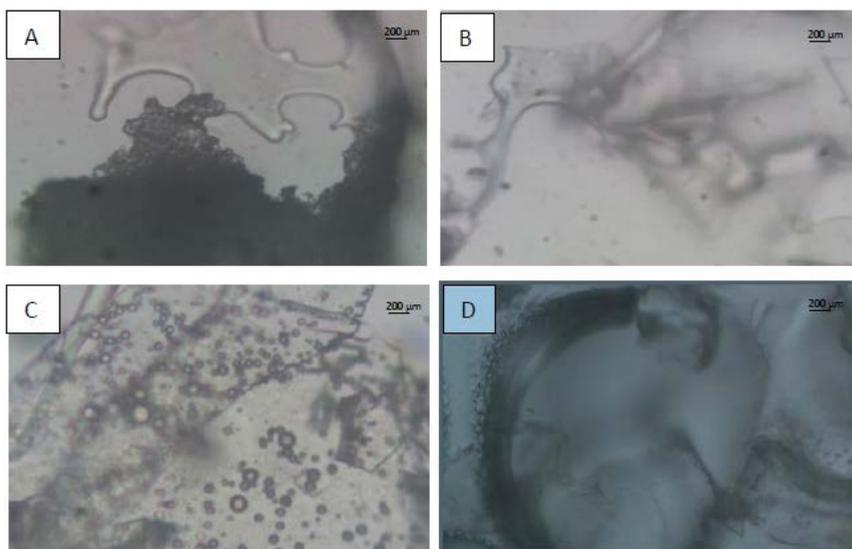
Encapsulación de aceites esenciales

Todos los aceites fueron encapsulados en dos matrices: maltodextrinas y β -ciclodextrinas. La inclusión parcial de los aceites en las estructuras de

β -ciclodextrinas crea un complejo amfifílico entre el aceite y las estructuras. [20]. Esferas de 50 μm -200 μm se observaron encajadas en las matrices de encapsulantes de maltodextrinas (Figura 36) y esferas entre 10 y 90 se observaron en la matriz de β -ciclodextrinas como evidencia de encapsulación. Los cristales formados de los complejos encapsulados muestran total solubilidad en agua a 20 $^{\circ}\text{C}$, sin otorgar cambios visuales, pero conservando el aroma característico de cada aceite esencial. El tamaño pequeño de las moléculas antimicrobianas de los aceites esenciales permite la inclusión en las matrices contrarrestando su alta volatilidad y manteniendo su contenido relativo durante cambios drásticos físicos garantizando la prolongación de los efectos antimicrobianos a lo largo del tiempo. Galmarini y colaboradores [21], describieron las maltodextrinas como efectivas en la encapsulación de compuestos volátiles de la cáscara de naranja y como las más usadas en procesos de deshidratación del tipo *spray-dried*.

Figura 36

Complejos de maltodextrinas con aceites esencial de eucalipto. (A) maltodextrinas sin aceites esenciales. (B) complejos de β -ciclodextrinas con aceite esencial de eucalipto. (C) β -ciclodextrinas sin aceite esencial. (D) visualizado a 100X.



Fuente: el autor.

Dinámicas de crecimiento microbiano

Los diferentes aceites esenciales encapsulados mostraron actividades antimicrobianas diferentes, como se indica en la Tabla 17. *P. digitatum* en medio PDA

con BCD y MD sin AE, creció a lo largo de ocho días y alcanzó su máximo crecimiento, como se ve en la Figura 37. Los aceites esenciales de canela y tomillo se destacan, al lograr inhibir por completo el crecimiento de *P. digitatum*, como se aprecia en las figuras 38 y 39.

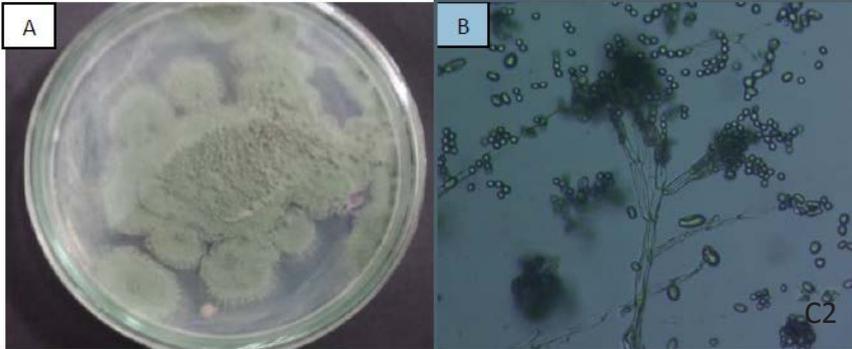
Tabla 17
Parámetros cinéticos de crecimiento de *P. digitatum*.

D: Diámetro máximo de la colonia (cm); μ_{\max} : velocidad máxima de crecimiento; λ (h): tiempo de adaptación (lag). Los valores son medias \pm error estándar. Las medias que contienen diferentes letras son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Parámetros Baranyi y Roberts							
Aceite esencial	Maltodextrinas			β -ciclodextrinas			
	Concentración (ppm)	D (cm)	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)	D (cm)	μ_{\max} (h ⁻¹)	λ (h)
	5000	3,84 \pm 0,3A	0,028 \pm 0,004A	30,9 \pm 0,9A	3,34 \pm 0,3A	0,02 \pm 0,009A	12,9 \pm 0,5A
Canela	10000	0-A	0- A	0- A	0- A	0- A	0- A
	15000	0-A	0- A	0- A	0- A	0- A	0- A
	5000	2,60 \pm 0,35B	0,025 \pm 0,004B	31,2 \pm 1,6B	2,55 \pm 0,22B	0,030,002B	30,8 \pm 1,1B
Eucalipto	10000	1,40 \pm 0,21B	0,029 \pm 0,008B	12,1 \pm 0,8B	1,23 \pm 0,31B	0,02 \pm 0,001B	12,9 \pm 0,3B
	15000	1,44 \pm 0,57B	0,02 \pm 0,009B	56,8 \pm 0,2B	1,40 \pm 0,33B	0,01 \pm 0,001B	56,7 \pm 0,4B
	5000	5,28 \pm 0,60C	0,085 \pm 0,005C	22,7 \pm 1,7C	5,32 \pm 0,7C	0,08 \pm 0,001C	22,8 \pm 1,1C
Romero	10000	3,00 \pm 0,44C	0,07 \pm 0,004C	36,9 \pm 0,8C	3,238 \pm 0,31C	0,06 \pm 0,002C	36,4 \pm 0,3C
	15000	3,514 \pm 0,25C	0,06 \pm 0,006C	57,7 \pm 0,6C	2,14 \pm 0,33C	0,05 \pm 0,005C	56,7 \pm 0,4C
	5000	6,85 \pm 0,31D	0,088 \pm 0,007D	13,5 \pm 1,9D	6,79 \pm 0,4D	0,09 \pm 0,001D	13,8 \pm 1,1D
Salvia	10000	5,69 \pm 0,39D	0,055 \pm 0,001D	20,0 \pm 0,7D	5,43 \pm 0,31D	0,07 \pm 0,002D	19,9 \pm 0,3D
	15000	4,55 \pm 0,40D	0,034 \pm 0,002D	26,7 \pm 0,6D	4,14 \pm 0,33D	0,04 \pm 0,005D	30,7 \pm 0,1D
	5000	0-A	0- A	0- A	0- A	0- A	0- A
Tomillo	10000	0-A	0- A	0- A	0- A	0- A	0- A
	15000	0-A	0- A	0- A	0- A	0- A	0- A

Figura 37

Penicillium digitatum (control) visualizado a 1x (A), y a 100x (B) en medio PDA con siete días de cultivado entre 20 °C y 25 °C.



Fuente: el autor.

Figura 38

Porcentajes de inhibición micelial de aceites encapsulados en maltodextrinas y β -ciclodextrina.

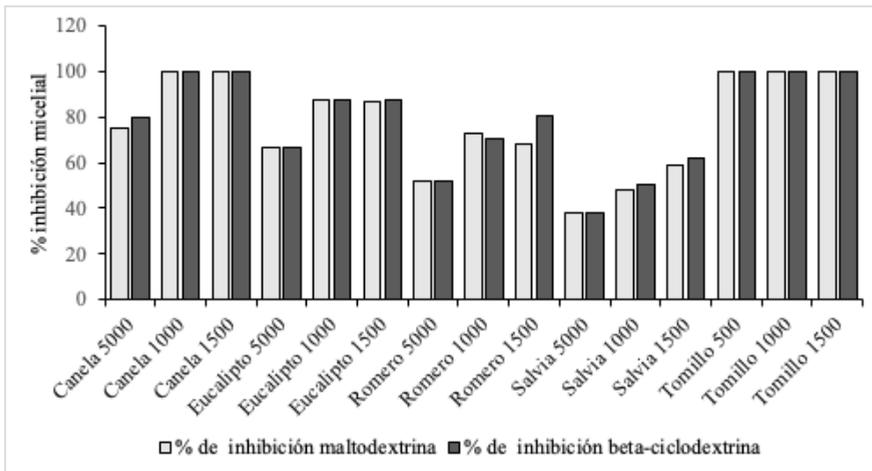
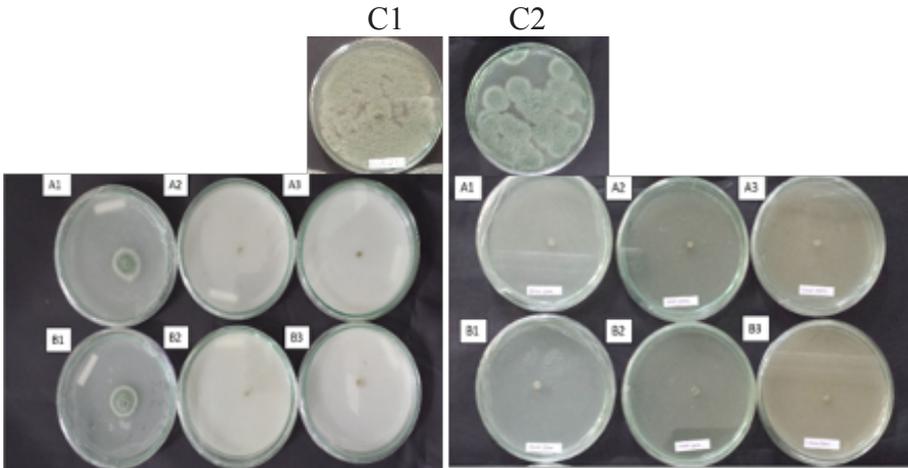


Figura 39

Aceites con mejor actividad inhibitoria fúngica sobre *P. digitatum*. AEC izquierda, AET derecha. La letra A corresponde a los complejos de BCD y la letra B representa los complejos de MD. Los números 1, 2 y 3 representan las concentraciones 5000 $\mu\text{g/mL}$, 10000 $\mu\text{g/mL}$, 15000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. La letra C corresponde a los controles 1: MD y 2: BCD sin AE.



Los AER, AE y AEE, mostraron actividad inhibitoria a altas concentraciones de complejos de BCD y MD como se reportan en la Tabla 17. En el presente estudio, AE encapsulado en MD y BCD inhibió 58,2 % y 62 %, respectivamente. Grande y colaboradores [6], reportaron una inhibición del 70 % de crecimiento micelial usando AES contra *P. brevicompactum* y *F. oxysporum* debido a las moléculas antifúngicas presentes en el aceite esencial de salvia amarga, cuya composición es principalmente de sesquiterpenos oxigenados y no oxigenados (86 %) [22]. Algunos autores expresan que el efecto inhibitorio de los aceites esenciales podría ser atribuido principalmente a la presencia de los compuestos más abundantes y posiblemente a la sinergia o antagonismo con componentes menores existentes en el aceite [6].

El AEE mostró una baja capacidad inhibitoria con respecto al resto de AE. El AEE encapsulado mostró actividad inhibitoria en función de su concentración sin alcanzar el punto de inhibición total. El tiempo *lag* o tiempo de adaptación a 10000 $\mu\text{g/mL}$ para los complejos de maltodextrinas y β -ciclodextrinas, presentó menor duración *lag* que las concentraciones de 5000 y 15000 $\mu\text{g/mL}$, las fases *lag* del *P. digitatum* pueden variar al inicio del crecimiento cuando se enfrentan a efectos adversos, pero este puede decrecer una vez esta fase se haya prolongado. Safaei-Ghomi [23], evidenciaron el efecto de AEE contra bacterias gram positivas; sin embargo, no se han reportado otros estudios del efecto de AEE contra

P. digitatum. En general, el comportamiento de modelamiento de crecimiento *P. digitatum* es similar al modelamiento de crecimiento bacteriano en medios con AE [14].

Una inhibición completa de la germinación fue observada en los complejos con aceite de tomillo con una CMI de 5000 $\mu\text{g/mL}$, como lo muestra la Figura 38. Daferera y colaboradores [25] reportaron una CMI de 250 $\mu\text{g/mL}$ de aceite puro de tomillo contra *P. digitatum*. Safaei y Ghomi [23], usando el método de microdilución junto con las moléculas purificadas antifúngicas del aceite esencial de tomillo (timol, carvacrol, eugenol), demostraron su actividad antimicrobiana contra *Cladosporium spp* (CMI: 100 $\mu\text{g/mL}$), *Aspergillus spp.* (CMI: 100 $\mu\text{g/mL}$), *Cladosporium spp.* (CMI: 350 $\mu\text{g/mL}$), *Aspergillus spp* y *Cladosporium spp* (CMI: 125 $\mu\text{g/mL}$).

La CMI del aceite de canela encapsulado fue de 5000 $\mu\text{g/mL}$. Kocić y colaboradores (2013) encontraron que el AEC es efectivo a ciertas concentraciones para algunos hongos filamentosos de la siguiente manera: 6400 $\mu\text{g/mL}$ para *Rhizopus nigricans* y 1600 $\mu\text{g/mL}$ para *Aspergillus flavus* y *Penicillium expansum*. Para frutos infectados directamente se necesitaron 20000 $\mu\text{g/mL}$ de aceite. Hill y colaboradores (2013), evidenciaron que trans-cinamaldehído encapsulado en β -ciclodextrinas es efectivo ($p < 0,05$) contra *Escherichia coli* e inefectivo contra *Salmonella paratyphi* y *Staphylococcus aureus*. Además, el transcinamaldehído es un inhibidor activo que ejerce efectos inhibidores frente a las ATPasas, específicamente Na^+/K^+ -ATPasa y Ca^{2+} -ATPasa, al disminuir el ATP intracelular [26]. Estas afectaciones llegan a la biosíntesis de proteínas como Crz1 y otras proteínas asociadas. La proteína Crz1 es un factor de transcripción que regula la expresión de los genes que codifican la síntesis de proteínas presentes en la pared celular y otras proteínas importantes para el intercambio iónico, lo que afecta la integridad de las células fúngicas sin efectos colaterales en los seres humanos y los animales [24].

El AER mostró una baja actividad; no hubo un punto de inhibición total. Sin embargo, hubo un decremento en la velocidad específica de crecimiento y del área total de micelio en relación con la concentración usada. Daferera y colaboradores [25], reportaron inhibiciones del 24 % en *P. digitatum* usando concentraciones de 1000 $\mu\text{g/mL}$ de aceite puro de romero. Nikkhah y colaboradores [27], determinaron la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial puro de romero CMI entre 2500 $\mu\text{g/mL}$ y 10000 $\mu\text{g/mL}$, contra *Penicillium expansum*, y concluyeron que se trata de una actividad antimicrobiana débil. Sin embargo, el aceite esencial de romero contiene una alta concentración relativa de 1,8 cineol, componente que otros autores han demostrado tiene un efecto sinérgico

antimicrobiano con moléculas como timol, carvacrol y el transcinamaldehído que se encuentra en otros aceites esenciales. Sobrevivientes a los tratamientos antimicrobianos, muestran variación en sus tiempos de adaptación (*lag*), el cual puede ser interpretado como una medida del estrés que está sufriendo la célula y de los daños en sus estructuras [28]. Así, la célula podrá aumentar o disminuir su producción de proteínas, lo cual se refleja en los tiempos *lag* o de adaptación mediante caminos alternativos metabólicos para garantizar su supervivencia ante un medio diferente [29]. En adición, los componentes volátiles como terpenos, sesquiterpenos, aldehídos y cetonas, actúan cambiando la expresión de las proteínas y la actividad de enzimas específicas o por el incremento de la permeabilidad de la membrana celular, reduciendo así la actividad de las enzimas asociadas y entorpeciendo la absorción de nutrientes [29].

Conner y Beuchat sugieren que la actividad antifúngica es el producto de la interacción de los componentes de los aceites esenciales, con enzimas responsables de la producción de energía y la síntesis de compuestos estructurales de la célula, mediante el bloqueo de los sitios activos de las ATPasas con los grupos funcionales hidroxilos de los anillos aromáticos de los componentes de los aceites esenciales.

Los fungicidas sintéticos tienen mecanismos similares. El mancozeb, uno de los fungicidas más usados mundialmente, en sí mismo no es fungicida. Solo cuando se expone al agua, se descompone para liberar etileno sulfuro de bisothiocyanato (EBIS), que a su vez mediante la acción de la luz UV, se convierte en etileno bisothiocyanato (EBI), EBIS y EBI. Se cree que interfieren con los procesos bioquímicos en el citoplasma de las células de hongos y las mitocondrias, lo que resulta en la inhibición de la germinación de esporas.

Efecto fungistático y fungicida

Se observó un efecto fungistático con relación al control (Tabla 18) en repiques de hongo provenientes de medio con 10000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se evidenció que las estructuras de *P. digitatum* no fueron totalmente dañadas. Sin embargo, repiques de *P. digitatum* a 15000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en medio PDA sin antimicrobianos, muestra que no hubo crecimiento de tipo alguno. Repiques provenientes de hongo tratado con AE encapsulado de tomillo en medio PDA sin antimicrobiano, muestra que las estructuras sufrieron daños irreparables que no permitieron germinar los conidios de *P. digitatum*, produciéndose así un efecto fungicida. Algunos de los componentes de los aceites esenciales son también efectivos como fungistáticos y fungicidas, particularmente los derivados de tipo fenólico como el timol, el carvacrol y el eugenol [30].

Tabla 18

Efecto fungicida y fungistático de los complejos de los aceites esenciales con mayor actividad inhibitoria

Aceite esencial	Concentración (ppm)	Halo de crecimiento Maltodextrinas (cm)	Halo de crecimiento β -ciclodextrinas (cm)	Efecto
	5000	6,84 \pm 0,8	7.99 \pm 0,6	Fungistático
Canela	10000	3.33 \pm 0,5	6.42 \pm 0,4	Fungistático
	15000	* ₋	* ₋	Fungicida
	5000	* ₋	* ₋	Fungicida
Tomillo	10000	* ₋	* ₋	Fungicida
	15000	* ₋	* ₋	Fungicida

*Hongos provenientes de medio con aceites esenciales encapsulados en BCD y MD repicados en medio PDA, cultivados durante siete días a 24 °C.

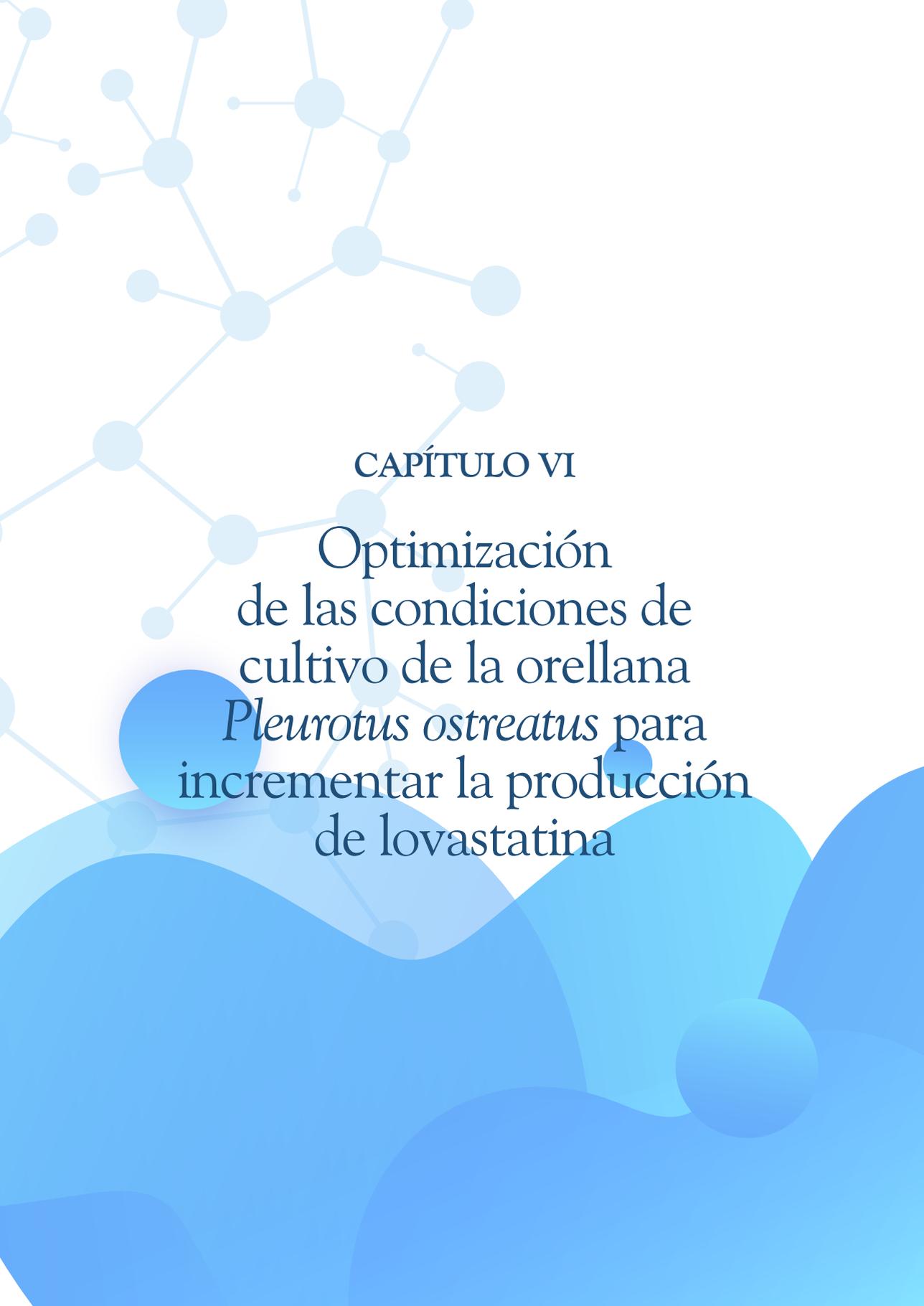
Fuente: el autor

Conclusiones

En el presente estudio se demostró que los aceites encapsulados de canela, tomillo, romero, salvia amarga y eucalipto en matrices de maltodextrinas y β -ciclodextrinas, son activos contra el crecimiento de *P. digitatum*. La molécula más abundante hallada en el AEC fue el transcinamaldehído (58,9 %), en el AET fue el timol (45,2 %) y en AER fue 1,8 cineol (20,8 %). Las clases más comunes fueron los monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados y no oxigenados.

El aceite esencial con mayor bioactividad fue el AET encapsulado en BCD y MD con una concentración de 5000 μ g/mL, seguido por el AEC encapsulado en BCD y MD con concentraciones de 5000 a 10000 μ g/mL. No hubo una diferencia significativa entre la diferencia de halos de crecimiento fúngico usando los distintos aceites esenciales en las matrices BCD y MD ($P > 0.05$), además el efecto de los AET y AEC son significativamente diferentes ($P < 0.05$) según la prueba de Tukey. El AEC de canela encapsulado en MD y BC mostró un efecto fungistático a la concentración de 5000 μ g/mL y un efecto fungicida a más de 5000 μ g/mL. Por otro lado, el AET mostró un efecto fungicida con concentraciones de 5000, 10000 y 15000 μ g/mL.

Los resultados de esta investigación demuestran que las moléculas de los AE proveen una mejor dispersión en agua volviéndolas una opción prometedora en el desarrollo de bioformulaciones antimicrobianas a escala industrial.



CAPÍTULO VI

Optimización
de las condiciones de
cultivo de la orellana
Pleurotus ostreatus para
incrementar la producción
de lovastatina

CAPÍTULO VI

Optimización de las condiciones de cultivo de la orellana *Pleurotus ostreatus* para incrementar la producción de lovastatina

Lyna Ximena Bejarano Bonilla,¹ Lorena Agudelo Patiño,² Cesar Orlando Chavarro Cediel,² Carlos David Grande Tovar,³ Raúl Alberto Cuervo Mulet,^{1,4} Edwin Flórez López,² Clemencia Chaves López⁵ y Johannes Delgado Ospina.^{1,5}

Resumen

La lovastatina es un metabolito secundario que actúa como inhibidor competitivo de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima involucrada en la biosíntesis de colesterol. Factores como la humedad, pH, aireación, C:N, luz y la cepa, son determinantes en su obtención biotecnológica. Por medio de fermentación en estado sólido de *P. ostreatus*, se evaluaron diferentes proporciones de C:N y el efecto de la luz roja, en la producción de lovastatina

1 Grupo de Investigación Biotecnología, Facultad de Ingeniería, Universidad de San Buenaventura Cali, Carrera 122 # 6-65, 76001, Cali, Colombia.

2 Grupo de Investigación en Química y Biotecnología (QUIBIO), Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, 760035, Cali, Colombia.

3 Grupo de Investigación de Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico, Carrera 30 # 8-49, 081008, Puerto Colombia, Colombia.

4 Grupo Microbiología, Industria y Ambiente (GIMIA), Universidad Santiago de Cali, Calle 5 # 62-00, 760035, Cali, Colombia.

5 Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, University of Teramo, Via R. Balzarini 1, 64100, Teramo, Italy.

en sus cuerpos fructíferos. La determinación del metabolito de interés se realizó con HPLC-UV. Se encontró lovastatina en todos los tratamientos, después de la segunda cosecha (35 días), en concentraciones diferentes, sin diferencia significativa entre los tratamientos bajo el efecto de luz roja. Por el contrario, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con luz natural, siendo el tratamiento 1 el de mayor promedio en la producción de lovastatina. Se evidenció el efecto de la luz roja en la mayor fructificación de los tratamientos.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, lovastatina, luz roja, aprovechamiento de residuos, fermentación en estado sólido.

Introducción

Anualmente, más de 17 millones de personas mueren por causa de enfermedades cardiovasculares (OMS, 2017). El aumento de los factores de riesgo, como la mala alimentación y la hipercolesterolemia, relacionadas directamente con las enfermedades cardiovasculares, son motivo de atención dado que su tratamiento médico demanda varios miles de millones al año. Actualmente, se llevan a cabo campañas de prevención con los pacientes que presentan riesgo elevado de padecer enfermedades cardiovasculares y los pacientes que padecen hipercolesterolemia son tratados con estatinas sintetizadas químicamente como fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina, rosuvastatina y pitavastatina (Istvan, 2003. Ertürk *et al.*, 2003). Estudios de la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, 2014), indican que este tratamiento puede causar diabetes (Ravi *et al.*, 2013), hepatotoxicidad, problemas de memoria y daño muscular, por lo cual ha crecido el interés por consumir alimentos que contribuyan al tratamiento o prevención de esta y otras enfermedades en general, mediante la búsqueda de productos naturales que permitan suplir los medicamentos sintetizados químicamente.

Un grupo de alimentos destacados no solo por su valor gastronómico sino también por su aporte nutricional y beneficios para la salud, es el de las setas u hongos comestibles. Las setas han mostrado tener efectos biológicos prometedores en la prevención de un rango de enfermedades que predominan en los países occidentales, como hipertensión, hipercolesterolemia, diabetes y cáncer (Lindequist *et al.*, 2005).

En particular, *Pleurotus ostreatus*, comúnmente conocido como orellana u hongo ostra, tiene alto valor nutricional debido a la presencia de aminoácidos esenciales (alanina, arginina, glutamina y ácido glutámico), carbohidratos, alto contenido

de agua (80 %-90 %), proteína, vitaminas (B, C, D, K, tiamina, riovoflavina, ácido fólico y niacina), minerales (Ca, P, Fe, K, Mn, Cu, Zn, Mg y Se), ácidos grasos insaturados (ácido oleico, ácido linoleico y ácido palmitoleico) y bajo contenido calórico y sódico (Schneider *et al.*, 2011; Farghaly y Mostafa, 2015; Parashare *et al.*, 2013; Nunes *et al.*, 2012; Pedneault *et al.*, 2007; Mostafa y Farghaly, 2014).

Estudios con *Pleurotus ostreatus* y sus propiedades benéficas, reportan actividad antioxidante, efecto inmunomodulatorio, actividad antitumoral (Kong *et al.*, 2014), antiviral, antiinflamatoria, antibiótica (Nehra *et al.*, 2012) y disminución de colesterol (Gregori, 2007; Choudhury *et al.* 2013; Schneider *et al.*, 2011; Ismail *et al.*, 2015). Mostafa y Farghaly (2014), reportan la presencia de compuestos bioactivos en cepas de *P. ostreatus* como β -glucanos, terpenoides, ácidos grasos, polifenoles, flavonoides y policétidos. Dentro de los policétidos no aromáticos se encuentran las estatinas, metabolitos muy importantes dado que actúan como inhibidores competitivos de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa, enzima involucrada en la biosíntesis de colesterol (Gunde-Cinerman *et al.* 1993; Ertürk *et al.*, 2003), sin producir efectos secundarios nocivos para la salud (Ertürk *et al.*, 2003), por lo cual podría suplir un medicamento utilizado para el mismo fin (Schneider *et al.*, 2011).

Ha sido reportado que algunas especies fúngicas son capaces de producir lovastatina, simvastatina, pravastatina y la compactina (Gunde-Cinerman *et al.*, 1993; Hutchinson *et al.*, 2000). El hongo ostra ha sido descrito como uno de los macromicetos con mayor producción de lovastatina en los cuerpos fructíferos. Gunde-Cinerman y Cimerman (1995) encontraron en diferentes partes del esporocarpo hasta 6000 mg kg⁻¹ d.w, mientras que Chen *et al.*, (2012) reportan valores de 606.5 mg kg⁻¹ d.w. de lovastatina. Es bien conocido que la producción fúngica de estatinas varía según la especie, la humedad del sustrato, pH, temperatura, relación carbono/nitrógeno (C: N), luz y aireación (Hutchinson *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2012).

Actualmente hay un gran interés por el aprovechamiento de residuos o sub-productos agroindustriales. Las aguas residuales contienen una gran cantidad de compuestos con valor agregado que pueden ser aprovechados como sustratos para obtener biomoléculas (Petruccioli *et al.*, 2011). En Colombia, producción de azúcar genera 6 414 878 ton/año de bagazo de caña, parte del cual es utilizado en la producción de papel, tableros aglomerados, energía y producción de abonos según la tecnología disponible en la región (Bohórquez *et al.*, 2014) y es un excelente sustrato para la producción de hongos.

En este contexto, esta investigación tuvo como propósito incrementar la producción de lovastatina en el hongo comestible *Pleurotus ostreatus*, mediante la modificación de la relación C:N en el medio de cultivo y la exposición a luz roja durante la fase de fructificación, en condiciones de fermentación en estado sólido.

Materiales y métodos

Microorganismo y propagación del micelio

Los cuerpos fructíferos de orellana fueron adquiridos en el cultivo de la empresa Nuestro Campo S.A.S, ubicada en la Buitrera-Cali (3°22'59.8"N 76°34'56.7"W), a 1250 m.s.n.m. Se seleccionaron orellanas de color blanco, carpóforo de 8-14 cm y borde liso.

En las instalaciones del laboratorio de investigaciones de la Universidad de San Buenaventura Cali, se hizo la propagación de micelio a partir de los cuerpos fructíferos, utilizando el carpóforo cortado en cuadros de 0,5 cm² e inoculándolos en medio PDA (agar-papa-dextrosa). Se incubaron a 25 ± 2 °C durante diez días. El PDA colonizado se cortó en cuadros de 1,0 cm², para continuar la propagación del micelio en semillas de *Sorghum bicolor* (millo) previamente hidratadas durante 24 horas y esterilizadas (121 °C y 15 lb de presión), dispuestas en bolsas de 1,0 kg. Se incubó a 25 ± 2 °C durante quince días.

Preparación del sustrato

Se utilizó el residuo agroindustrial bagazo de caña de azúcar obtenido de un cultivo orgánico, salvado de trigo, Ca(OH)₂ y agua. Los componentes se mezclaron de acuerdo con los tratamientos, se empacaron en bolsas de polipropileno calibre 1,5 de 12cm x 16cm, cada una con un peso final de 2,4 ± 0,1 kg, y se pasaron a tratamiento térmico a vapor por cuatro horas a 95 ± 5 °C. Posteriormente, cuando su temperatura disminuyó a 27 ± 5 °C, en un área libre de contaminantes previamente desinfectada (sala de siembra), se inocularon con la semilla de millo colonizada por *P. ostreatus* (5 % del peso del sustrato). A continuación, se abrieron cuatro orificios con un bisturí en una de las caras de la bolsa. Se llevaron a la sala de incubación hasta que el hongo colonizara el sustrato totalmente (12 días). A continuación, se trasladaron las bolsas a las salas de fructificación. En la sala 1 con luz natural y en la sala 2 con luz roja, a temperatura de 26 ± 4 °C durante el día y de 20 ± 3 °C en la noche. La cosecha de los cuerpos fructíferos se hizo cuando estos alcanzaron diámetros entre 8 y 12 cm. Tres semanas después de la

siembra se hizo la primera cosecha; la quinta semana fue la segunda y la tercera cosecha en la semana siete.

Determinación de los componentes de los sustratos y de los cuerpos fructíferos

Se estableció la humedad por el método de secado infrarrojo en una balanza de humedad (OHAUS MB25), a una temperatura de 105°C. Se hizo la determinación de cenizas por el método de incineración, según la NTC 4648 (Icontec 2006) y se sometieron las muestras a un proceso de secado a 105 °C, hasta alcanzar un peso constante. Posteriormente, las muestras fueron llevadas a la mufla (FUMACE 62700) a 650 °C, durante tres horas. El contenido de grasas fue determinado por el método Soxhlet. El método de Kjeldahl fue empleado para la determinación del contenido total de nitrógeno (N). Para el análisis de fibra cruda, se siguió el método 985.29 de la AOAC (2003), con las siguientes modificaciones: en un balón para digestión se adicionó 1,0 g de la muestra anteriormente desengrasada y 20,0 mL de H₂SO₄ al 1,25 %. Se acopló el sistema de reflujo y se llevó a ebullición durante 30 minutos. Se transfirió la muestra a un crisol Gooch con filtro de tela y se lavó el residuo con agua caliente. Se llevó el residuo lavado a un balón de digestión, se adicionaron 2,0 mL de NaOH al 24 % y se continuó la ebullición durante 30 minutos. Se filtró la solución caliente a través de un crisol Gooch. Se transfirió el residuo previamente lavado a un crisol, se sometió a calentamiento en estufa a 105 °C durante tres horas, se enfrió en desecador y se pesó. Posteriormente, se incineró el residuo en mufla a 600 °C hasta obtener ceniza de color blanco. Las pruebas se hicieron por triplicado. El rendimiento del cultivo se evaluó por el método de eficiencia biológica (EB).

$$EB = \frac{\text{Peso de los hongos cosechados}}{\text{Peso húmedo del sustrato}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Determinación de lovastatina

Muestras de 5,0 g de cada uno de los tratamientos y de una muestra comercial se mezclaron con 5,0 mL de una mezcla de metanol y agua (1:1 v/v), usando un homogenizador (Ultra-Turrax® IKA) a 25 °C y 13000 rpm durante un minuto. A continuación, se pusieron en un agitador orbital (KS3000 IKA) a 30 °C, 200 rpm, por 180 minutos y posteriormente se centrifugó (Universal 320R, Hettich Zentrifugen) a 9000 rpm. durante cinco minutos. El sobrenadante fue centrifugado nuevamente en microcentrífuga (Eppendorf), por 10 minutos a 10000 rpm. Finalmente, se filtró a través de filtros de PVDF (0,45 μm).

La concentración de lovastatina fue analizada en un equipo HPLC (Elite Lachrom, Hitachi) acoplado con un detector UV L-2400. En breve, 20 μ l de muestra fueron inyectados en una columna Chromolit RP-18 (100 \times 4.6mm; 5 μ m. Merck, Germany) usando acetonitrilo-ácido fosfórico 0,1% (55:45 v/v) como fase móvil, operado con un flujo de 1,0 mL/min, 25 °C, and 238 nm de longitud de onda. La lovastatina fue identificada por comparación con los tiempos de retención del compuesto estándar (lovastatin, Sigma-Aldrich) y fue cuantificada usando curvas de calibración establecidas para los estándares.

Diseño experimental

Los tratamientos consistieron en tres factores con cinco repeticiones. El primer factor, con cuatro niveles, consistió en la proporción de sustratos de bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo para obtener diferentes concentraciones de nitrógeno en el sustrato, así la relación de bagazo de caña de azúcar: salvado de trigo fue: T1 (80:20), T2 (90:10), T3 (85:15) y T4 (95:5). El segundo factor, con dos niveles, consistió en la aplicación de luz roja y luz natural y el tercer factor con tres niveles, fue la época de cosecha.

Análisis estadístico

Los datos experimentales se analizaron usando la prueba de Anova, con el programa estadístico SPSS versión 20. (SPSS Inc., Chicago, IL, EE. UU.). El nivel de significancia se estableció en $p < 0,05$.

Resultados y discusión

Sustratos

Las setas carecen de estructuras fisiológicas para producir su propio alimento, debido a que son organismos heterótrofos. Además, muchos de ellos crecen sobre materiales vegetales muertos o degradados (saprófitos), por lo cual es necesario acondicionar el sustrato de crecimiento para que puedan desarrollarse sin inconvenientes (Flegg, P. *et al.* 1987). Los materiales que constituyen el sustrato pueden variar según las zonas de producción de granos, cereales o residuos lignocelulósicos asequibles. Pueden utilizarse diferentes tipos de materias primas, tales como arroz, cebada, sorgo, maíz, trigo, avena, desechos agrícolas de la industria del café, plátano, fique, caña de azúcar, palma africana, etc. También es común la utilización de urea, gallinaza o sales nitrogenadas para acelerar el

proceso de colonización y proveer el sustrato de nitrógeno (Rodríguez-Valencia, N. y Jaramillo-López, C. 2005).

Los requerimientos nutricionales de *Pleurotus sp.*, dependen en gran medida de la proporción de oxígeno, carbono, nitrógeno, fósforo y potasio, así como de azufre y magnesio en menor proporción (Miles, P. y Chang, S. 1999). Para esta investigación se utilizó bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo como únicas fuentes de nutrientes (sustrato) y se hizo la caracterización fisicoquímica primaria para poder evaluar las proporciones de grasa, nitrógeno y fibra que le aportaban a la orellana en su crecimiento, con el fin de darles valor agregado a los residuos que normalmente son abandonados en campo o usados en compostaje y en rellenos sanitarios, pues se desconoce su verdadero valor agregado (Tabla 19).

El nitrógeno es esencial para la síntesis de proteínas, purinas, pirimidinas y algunas vitaminas, además de ser un componente de la quitina, polisacárido encontrado en las paredes celulares de la mayoría de los hongos (Chang, S., & Miles, P., 2004). Las principales fuentes de nitrógeno se obtienen de la degradación de los aminoácidos, peptona, caseína, urea, o por medio de sulfatos y nitratos de amonio, sodio, potasio y calcio, pero no todos son adecuados para todas las especies (Guzmán, G. *et al.* 2008).

Debido a la necesidad de nitrógeno en las orellanas, se hizo el análisis de proteína en los sustratos. Para el caso del bagazo, se obtuvo un resultado del $1,29 \pm 0,15$ % y para el salvado de trigo de $16,43 \pm 0,57$ %. Al analizar los resultados, se puede deducir que el salvado se va a descomponer más rápido y proporcionará una mayor cantidad de humus y nitratos, pues al obtener más nitrógeno logrará satisfacer los requerimientos de los organismos que intervienen en su descomposición. Por el contrario, el bagazo de caña lo hará más lentamente debido a la menor cantidad de nitrógeno (Pérez, M. *et al.* 2011).

También hay que tener en cuenta que cuando el aporte de nitrógeno es muy alto, se emite amoníaco debido al exceso de nitrógeno que impide la actividad biológica, lo que provocaría problemas de olores en la fermentación. En el caso opuesto, el nitrógeno puede ser un nutriente limitante, ya que la tasa de descomposición disminuye y el proceso de fermentación para tener un producto estabilizado, decaería (Sánchez., D. 2013).

Para lograr elevados rendimientos en el cultivo de *P. ostreatus*, el contenido de nitrógeno de los sustratos debería ser superior al 0,5 % (Martínez, D. *et al.* 2015). Es decir, los sustratos utilizados en el proyecto (salvado de trigo y bagazo de caña) están por encima de estos valores, por lo tanto, el porcentaje de rendimiento del

hongo se ve favorecido. Bohórquez, Puentes y Menjivar, (2014), obtuvieron un valor superior en el análisis de nitrógeno en bagazo de caña y Vargas y Murillo (1978) reportaron un valor similar (16,48 %) de nitrógeno en salvado de trigo.

Los porcentajes de grasa que aportan el bagazo de caña de azúcar y el salvado de trigo son bajos debido a que ninguno posee niveles elevados de grasa (Lyndon, 1966). El salvado de trigo contiene entre 4,0% y 4,5 %, mientras que el bagazo de caña posee valores inferiores al 2% (Martínez, *et al.* 2013). Para el bagazo de caña de azúcar se obtuvo un valor de $0,26 \pm 0,03$ % y para el salvado de trigo $4,68 \pm 0,04$ %.

A pesar de que el salvado de trigo contiene una pequeña cantidad de grasa, esta puede ser mínimamente saturada (0,2 g o 1 % del valor diario), mientras proporciona ácidos grasos saludables omega-3 y omega-6 (Álvarez, *et al.* 2006). Una media taza de salvado de trigo proporciona 46,8 mg de ácidos grasos omega-3 y 571 mg de ácidos grasos omega-6 (Shimada, 1987).

La fibra es la suma de la lignina y los polisacáridos no almidónicos (celulosa, hemicelulosa, pectinas, gomas y mucilagos) de las plantas (Anguera, 2007). Es la fracción de la pared celular de las plantas resistente a la hidrólisis por las enzimas digestivas del ser humano (Anguera, 2007).

Se designan como fibra todos los sólidos orgánicos insolubles en agua hallados en el tallo de la caña de azúcar, los cuales se caracterizan por su heterogeneidad (Lois, 2009). La composición del bagazo de la caña puede variar, pero en promedio contiene los siguientes componentes en base seca: celulosa 43,1 a 55,0 %; hemicelulosa 17,0 a 25,2 %; lignina total 22,9 a 25,0 %; compuestos minerales 1,0 a 2.8 % y extraíbles 4,3 % (Hoareau, W. *et al.* 2004). Aguilar *et al.* (2014) hicieron mención de la medición de fibra cruda sobre muestras de bagazo de caña, con porcentajes de 78,7 %. En este estudio se obtuvo un valor de $55,79 \pm 0,90$ %, el cual hace referencia a la composición final del bagazo de caña utilizado, el porcentaje de fibra está por encima del 50%. Este valor es un gran contribuyente en el desarrollo nutricional del hongo.

El salvado de trigo, alimento muy alto en nutrientes, es también muy rico en vitamina B5 (2,18 μ g por cada 100 g), vitamina B3 (18,28 mg por cada 100 g), vitamina B2 (0,58 mg por cada 100 g), vitamina B1 (0,52 mg por cada 100 g), magnesio (611 mg por cada 100 g), zinc (7,27 mg por cada 100 g), potasio (1182 mg por cada 100 g), fibra (42,80 g por cada 100 g) y hierro (10,57 mg por cada 100 g) (Aguilar, *et al.* 2014). La fibra está compuesta fundamentalmente de hemicelulosas y celulosa y está relativamente poco lignificada (2,5 a 3 % LAD)

(Anguera, 2007). Los resultados de fibra obtenidos en estos análisis dieron $48,57 \pm 0,025$ %, lo cual, con base en los valores de fibra anteriormente mencionados, dan idea de que el salvado utilizado tenía un porcentaje generoso de fibra.

En los procesos de fermentación en estado sólido el contenido de humedad es un factor crítico y dependerá tanto del microorganismo como de la matriz sólida utilizada (Tortosa, 2013). Una excesiva humedad taponaría los poros y limitaría el intercambio de gases y el aporte de oxígeno, lo que daría lugar al predominio de las condiciones anaerobias en la masa, a fenómenos de putrefacción y a malos olores. Además, un exceso de humedad, combinado con una escasa retención hídrica del sustrato, originará con toda probabilidad fenómenos de lixiviación, repercutiendo así en pérdidas de agua y elementos nutritivos del sustrato (Tortosa, 2013).

Generalmente, el contenido inicial de humedad del sustrato en una fermentación en estado sólido oscila entre el 30 % y el 75 %, el cual en el transcurso del proceso se va reduciendo debido a pérdidas por evaporación o actividad metabólica de los microorganismos (Cardona, 2001). El hongo *P. ostreatus* necesita condiciones para su proceso de crecimiento. Una de ellas es una humedad del sustrato del 70 % al momento de la siembra o cultivo (Cardona, 2001).

En el análisis de humedad hecho al bagazo de caña de azúcar por Martínez, *et al.* (2013), se obtuvo un valor de 7,57 %, por el método de secado en estufa a 105 °C, un poco alejado al obtenido por nuestro grupo, mientras que en el secado por balanza se obtuvo un valor más cercano. Esto se debe gran medida a que la balanza de secado es un equipo con mayor precisión, pues esta aplica calor mediante proyectores de cuarzo hasta que la humedad se evapora por completo (Balanza de humedad | PCE Instruments 2017). En cambio, en la estufa de secado se debe controlar la temperatura, el tiempo y el pesaje final de la muestra y si no se tiene cuidado se sufre algo de hidratación. Por estas razones, es probable que se haya obtenido un valor mayor por el método de estufa que por el de balanza de secado.

El análisis de cenizas representa el producto de la combustión de algún material compuesto por sustancias inorgánicas no combustibles, como sales minerales (Hadar y Cohen, 1886). Parte queda como residuo en forma de depósito en el lugar donde se ha quemado y parte puede ser expulsada al aire como parte del humo (Hadar y Cohen, 1886). El bagazo de caña de azúcar reporta porcentajes de cenizas entre el 0,5 % y el 1,5 % según factores como la fertilidad de los suelos donde creció la caña y el tratamiento químico involucrado en su obtención, entre otros (Sales-Campos. *et al.*, 2010). En varios estudios se ha demostrado que las

cenizas del bagazo de caña presentan un elevado contenido de sílice (SiO_2) y alúmina (Al_2O_3), el aporte mayoritario en su formación (Sales-Campos, *et al.*, 2010). El salvado de trigo presenta más variaciones en su composición química, aunque se estima que los valores están alrededor del 5 %, pues la obtención del salvado depende directamente del productor del trigo, ya que muchas veces se representa al salvado de trigo como un producto derivado del procesamiento del trigo (Rodríguez y Jaramillo, 2005). Los valores de cenizas obtenidos al evaluar los sustratos indican que el bagazo de caña ($2,53 \pm 0,61$ %) tuvo valores cercanos a los reportados por Sales-Campos, *et al.*, probablemente a causa de la fertilidad de los suelos donde creció la caña o por el tratamiento que se le dio a la caña en el cultivo y la posterior obtención del bagazo. Para el salvado de trigo se obtuvieron valores de $7,28 \pm 0,33$ % (Tabla 19).

Tabla 19.
Composición (% p/p) del sustrato y de los tratamientos

Parámetros	Bagazo de caña de azúcar	Salvado de trigo	T1	T2	T3	T4
Proteína	$1,29 \pm 0,15$	$16,43 \pm 0,57$	$4,32 \pm 0,22$	$2,76 \pm 0,16$	$3,58 \pm 0,18$	$2,05 \pm 0,20$
Lípidos	$0,26 \pm 0,03$	$4,68 \pm 0,04$	$1,14 \pm 0,03$	$0,70 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,03$
Fibra	$55,79 \pm 0,90$	$48,57 \pm 0,02$	$54,34 \pm 1,0$	$55,07 \pm 1,2$	$54,71 \pm 0,9$	$55,44 \pm 1,1$
Humedad	$8,23 \pm 0,13$	$15,39 \pm 0,26$	$62,0 \pm 1,8$	$61,0 \pm 2,0$	$62,0 \pm 2,0$	$60,0 \pm 2,0$
Cenizas	$2,53 \pm 0,61$	$7,28 \pm 0,33$	$3,48 \pm 0,41$	$3,00 \pm 0,34$	$3,24 \pm 0,40$	$2,77 \pm 0,37$

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de tres repeticiones.

Orellanas (*Pleurotus ostreatus*)

La concentración de proteína cruda en las orellanas puede variar según del tipo de sustrato de crecimiento, en especial por su contenido de nitrógeno, el cual influye directamente en la cantidad y calidad proteica de los hongos (Naraian, R. *et al.*, 2009). Por esta razón, las especies cultivadas pueden presentar un nivel superior de esta variable, frente a las mismas especies de origen silvestre (Akyuz, M. y Kirbağ, S. 2010). Los valores de proteína oscilaron entre 11,85 y 14,80 %, coincidiendo con lo reportado por Garzón y Cuervo (2008), quienes determinaron que el contenido de proteína cruda en *P. ostreatus* puede oscilar entre 10,5 % y 30,4%; Sales-Campos, *et al.* (2011), encontraron un valor de proteína de 14,67 %, en los cuerpos fructíferos de la misma especie cultivada sobre residuos de caña de azúcar; Badu, *et al.* (2011), hallaron valores de proteína de 17,07 %, 16,33% y 18,20 %, cuando el hongo fue cultivado en residuos de diferentes maderas.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de proteína de la orellana. Se observó que T4R presentó el mayor valor de proteína ($14,80 \pm 0,06\%$), esto en el tratamiento que contenía el menor aporte de proteína en el sustrato. Es posible que la deficiencia de nitrógeno disponible en el medio promueva la acumulación dentro del hongo como reserva para su metabolismo. Además, se encontró que los tratamientos con luz roja presentaron los valores más altos de proteína en la orellana (Tabla 20).

Tabla 20
Composición (% p/p) del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*

Tratamiento	Eficiencia Biológica	Proteína	Lípidos	Fibra	Cenizas	Humedad
T1N	43,3	$12,61 \pm 0,03b$	$12,64 \pm 0,04b$	$18,67 \pm 0,27c$	$0,025 \pm 0,007a$	$92,33 \pm 0,11a$
T1R	45,0	$12,79 \pm 0,02b$	$15,71 \pm 1,05d$	$17,97 \pm 1,13c$	$0,070 \pm 0,014a$	$92,56 \pm 0,04a$
T2N	44,9	$12,63 \pm 0,01b$	$12,37 \pm 0,64b$	$16,40 \pm 1,70ab$	$0,005 \pm 0,007a$	$92,39 \pm 0,10a$
T2R	58,8	$13,97 \pm 0,02d$	$9,94 \pm 0,85a$	$16,66 \pm 1,92ab$	$0,040 \pm 0,014a$	$89,65 \pm 3,33a$
T3N	40,0	$11,85 \pm 0,03a$	$11,73 \pm 0,57b$	$15,60 \pm 0,61a$	$0,035 \pm 0,035a$	$91,91 \pm 0,67a$
T3R	59,2	$12,94 \pm 0,03c$	$12,58 \pm 0,05b$	$16,56 \pm 0,56ab$	$0,045 \pm 0,035a$	$92,84 \pm 0,13a$
T4N	32,1	$12,54 \pm 0,06b$	$12,61 \pm 0,04b$	$16,90 \pm 0,60b$	$0,015 \pm 0,007a$	$93,07 \pm 0,60a$
T4R	36,0	$14,80 \pm 0,06e$	$14,61 \pm 0,53c$	$17,66 \pm 1,99cb$	$0,012 \pm 0,009a$	$92,94 \pm 0,15a$

Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de tres repeticiones. Diferentes letras en la misma columna indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

El hongo *P. ostreatus* tiene un alto valor nutricional, pues contiene minerales, vitaminas y proteínas. Además, tiene un bajo contenido de grasa y sodio que sumado al alto contenido de potasio ayuda a combatir los problemas cardiovasculares, la hipertensión y la obesidad (Hernández, R., & López, C. 2006). Dentro de los análisis llevados a cabo al hongo, se hizo la determinación de grasa por el método de Soxhlet y se obtuvieron resultados interesantes (Tabla 20). El contenido de grasas de las distintas especies de *Pleurotus* oscila entre 1,8 % y 9,4 %, con un promedio de 2,85 %, en peso seco y los principales ácidos grasos presentes en el hongo son el oleico (79,4 %), el palmítico (14,3 % a 25,5 %) y el linoleico (6,3 % a 59,4 %) (Bautista, M. 1997).

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el contenido de lípidos de la orellana. Se observó que el tratamiento T1R presentó el mayor valor ($15,71 \pm 1,05$ %), siendo los tratamientos con luz roja los que presentaron una mayor acumulación de lípidos en la orellana. El contenido de grasa en base seca de las

muestras estudiadas es mayor a lo reportado por otros autores. Se reporta un valor de grasa total de 5,97 g/100 g y 6,32 g/100 g para *P. ostreatus* cultivado en plátano y paja de arroz, respectivamente (Bonatti, M. *et al.* 2004), y 1,18 g/100 g y 1,68 g/100 g para setas cultivadas en papel blanco y papel impreso, respectivamente (Fernandes, A. *et al.* 2015). En otro estudio, se menciona que la grasa neta en los hongos puede ser desde menos del 1% hasta el 15 % (Cardona, 2001). El salvado de trigo puede ser la posible causa del aumento del contenido de grasa en las orellanas, pues este aporta un 4,42 % más de lípidos en el sustrato en comparación del bagazo de caña, que tan solo aporta un 0,26 % (ver Tabla 19).

La orellana tiene un contenido elevado de carbohidratos (alrededor de un 57 %) que no son del tipo de los almidones, al igual que de fibra cruda (14 %), de la cual el 47 % es fibra dietética (FD) (Molina, *et al.*, 2003). Los valores de fibra cruda no tienen relación con el verdadero valor de FD de los alimentos humanos, ya que son generalmente de tres a cinco veces mayores que los valores de fibra cruda, pero no puede hacerse un factor de corrección porque la relación entre fibra cruda y FD varía según los componentes químicos (Molina, *et al.*, 2003).

Muchos autores reportan en sus estudios los resultados de análisis de fibra con base en la fibra cruda, ya que, aunque es un procedimiento más agresivo para la muestra, es de los más estables. Baena (2005) halló el 16,57 % de fibra dietaria en *P. ostreatus* cultivado sobre bagazo de agave, 17% en la seta cultivada sobre paja de trigo y alrededor del 19 % en los hongos desarrollados en bagazo suplementado con sulfato de amonio. Por otro lado, Badu, *et al.* (2011), hallaron valores de fibra cruda de 4,14 %; 6,38 % y 6,63%, cuando *P. ostreatus* fue cultivado en residuos de diferentes maderas. Nevárez (2012), determinó en 12,1% la fibra cruda en *P. ostreatus* cultivado sobre 100% de bagazo de *Agave durangensis*.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores de fibra cruda de las orellanas, que oscilaron entre $15,60 \pm 0,61$ % y $18,67 \pm 0,27$ %, siendo el tratamiento T1N el más alto. Dichos valores pueden ser considerados elevados con respecto a los autores antes mencionados. La diversidad de nutrientes que poseía en el bagazo de caña y el salvado de trigo es unas de las razones por las cuales estos valores sean más altos que los cultivos de Badu *et al.* (2011), que cultivó en residuos de madera y que Nervárez (2012) que solo usó un tipo de sustrato (bagazo de *Agave durangensis*).

Los hongos frescos generalmente contienen entre el 85 % y el 95 % de humedad, valores que pueden ser variables pues depende del tiempo de almacenamiento de la muestra, ya que los hongos pueden perder humedad aún a temperaturas de 3 °C (Bautista, M. 1997). Por otro lado, Baño y Rajarathnam (1988), citados

por Bautista (1997), informaron que las especies de *Pleurotus* contienen aproximadamente un 90 % de agua y que cualquier desviación de este valor puede deberse a las condiciones del cultivo, tales como contenido de agua del sustrato, temperatura ambiente y humedad relativa.

El contenido de humedad promedio de las orellanas fue de $92,21 \pm 1,10$ %. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos. Estos valores concuerdan con lo reportado por Crisan y Sands (1978), citados por Bautista (1997), pues los resultados obtenidos se encuentran dentro del intervalo de humedad (85 % a 95 %) para distintos especímenes de hongos frescos. De igual manera, al comparar los resultados con otros autores, por ejemplo, en muestras de orellanas adquiridas comercialmente, la humedad es del $90,8 \pm 0,2$ % (Ciappini, Gatti y López, 2004) y 92,64 % (Jaramillo, *et al.*, 2011), y en muestras de *P. ostreatus* cultivadas en diferente sustrato, la humedad fue 88,1 % y 85,6 %, cultivadas en paja de plátano y paja de arroz, respectivamente (Bonatti, *et al.*, 2004). De esta forma, se constata que los resultados de humedad encontrados y los valores reportados en la literatura se ubican dentro de los rangos esperados para este tipo de hongo, si se tiene en cuenta que la humedad se ve afectada por los factores ambientales como temperatura y humedad relativa durante el crecimiento y almacenamiento, así como por la cantidad de agua metabólica que puede ser producida o utilizada durante el almacenamiento (Bautista, 1997).

En la determinación de cenizas, no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, se obtuvieron valores bajos respecto a lo reportado por otros autores. Badu, *et al.*, (2011), hallaron valores de cenizas de 5,80 %; 5,25 % y 4,40%, cuando *P. ostreatus* fue cultivado en residuos de diferentes maderas. Sales-Campos, *et al.*, (2011), encontraron un porcentaje de 6,10% de cenizas en *P. ostreatus* cultivado sobre residuos de caña de azúcar. Las condiciones del sembrado de la orellana, al igual que la naturaleza limpia de donde provienen los sustratos, prueban que las impurezas o formaciones inorgánicas que interfieran en la composición del cuerpo fructífero son realmente mínimas.

Cuantificación de lovastatina

Los hongos ostra son ricos en proteínas (hasta un treinta por ciento en peso seco), abundante en vitaminas del grupo B, no tienen colesterol y tienen niveles significativos de lovastatina, molécula que reduce el colesterol hasta un 2,8 % en peso seco (Miyake, T. *et al.* 2009). Debido a su contenido de lovastatina, los

hongos ostra han sido estudiados por sus beneficios para ayudar a modular los niveles de colesterol en la sangre.

Las estatinas, como la lovastatina, son un grupo de fármacos usados para disminuir el colesterol y los triglicéridos en sus distintas formas, en pacientes con hipercolesterolemia y que presentan, por tanto, un mayor riesgo de desarrollar aterosclerosis y sufrir episodios de patología cardiovascular. En este caso, la lovastatina es un inhibidor específico de la HMG-CoA reductasa, enzima que cataliza la conversión de HMG-CoA a mevalonato, un paso precoz y limitante en la biosíntesis de colesterol (Endo, 1992). Los genes y las enzimas implicadas en la biosíntesis de la lovastatina han sido identificados y caracterizados en *A. terreus* y *P. ostreatus* y se hace evidente que tanto las fuentes de carbono como las de nitrógeno regulan la biosíntesis de la lovastatina al reprimir la síntesis de glucosa y la señalización del crecimiento (Miyake, *et al.*, 2009).

Se sabe que la producción de lovastatina por especies de *Monascus* y *P. ostreatus* depende de las condiciones de cultivo, pues se han intentado diversas mejoras de bioprocesos para conseguir una producción más alta, incluidos procesos de incubación, fermentación en estado sólido, selecciones de cepas optimizadas y sustratos complejos proporcionados. Sin embargo, poco se ha indicado sobre la regulación de la biosíntesis de lovastatina en estas especies (Stamets, 2006).

De los ocho tratamientos cultivados, cuatro fueron sometidos al efecto de la luz roja, con el fin de observar sus consecuencias en el proceso de obtención de las orellanas. El rojo es el color que se percibe ante la fotorrecepción de una luz cuya longitud de onda dominante mide entre 618 nm y 780 nm. La mayoría se encuentra en el espectro visible que abarca desde 390 nm hasta 750 nm (Berrocal, s.f). Si se tiene en cuenta que los hongos tienen paredes celulares como las plantas, pero compuestas por quitina en lugar de celulosa y que se alimentan igualmente por absorción, los fenómenos de luz, en este caso de luz roja, los afecta casi de la misma manera (Kasperbauer y Karlen, 1994). La luz roja es importante en la regulación de la formación del sombrero y la carnosidad del hongo, además, ayuda a aumentar el diámetro del tallo y estimula la ramificación (Kasperbauer y Karlen, 1994).

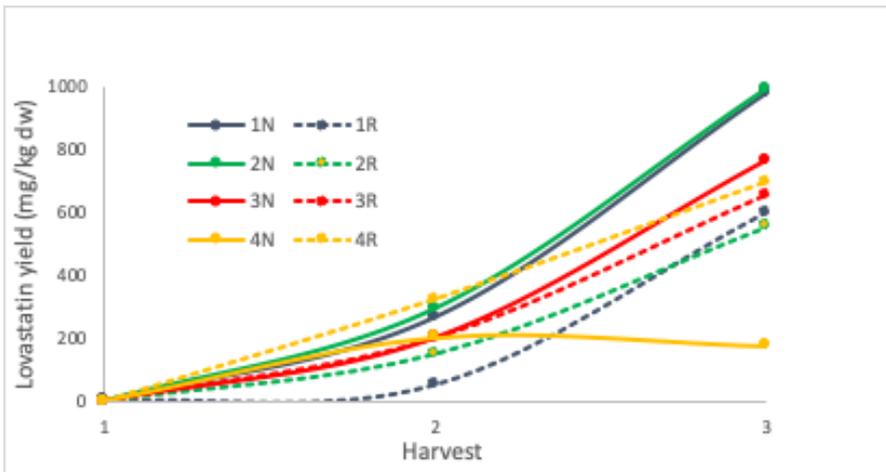
Según Miyake *et al.* (2005), los hongos *Monascus* son capaces de detectar y diferenciar el tipo de luz que se les aplique y de esta manera influenciar en el desarrollo celular. Además, crea diferentes patrones de desarrollo del micelio y formación de esporas. Igualmente, reportan que la luz roja influye en la producción de metabolitos secundarios. Partiendo de esta teoría y de que tanto *Monascus* como *P. ostreatus* tienen estructuras morfológicas similares, se podría asumir que

en las orellanas ocurrió este fenómeno, en el que la luz roja fomentó el desarrollo del micelio, las esporas y metabolitos secundarios, lo cual se vio representado en un aumento del 5,6 % en la producción del hongo.

La concentración de lovastatina en la primera fructificación fue escasa, aumentando significativamente ($p < 0,05$) en la segunda y tercera fructificaciones (Figura 38). Aunque en la tercera fructificación se lograron detectar altos niveles de lovastatina, las diferencias entre los tratamientos y la incidencia de luz roja sobre el hongo y la no incidencia no son significativas ($p > 0,05$), por lo cual no es posible afirmar que la luz roja tenga incidencia sobre la producción del metabolito. El incremento de este puede asociarse más fácilmente con el hecho de que al ser la última etapa de la fructificación del hongo, este se estrese al sentir que sus nutrientes están terminando, porque el carbono y el nitrógeno presentes en los sustratos se han ido consumiendo y al generar la seta o cuerpo fructífero, este tenga más concentración de lovastatina en su composición (Chen, *et al.*, 2012).

Figura 38

Concentración de lovastatina en *Pleurotus ostreatus* en diferentes condiciones de sustrato y fuente de luz.



Esta estatina depende mucho de la edad del cultivo, ya que a medida que pasa el tiempo van apareciendo más metabolitos secundarios, como lo es la lovastatina, necesaria para que el hongo siga viviendo (García de Marina y del Castillo, 1988), mientras que en la primera fructificación no se evidencia, porque el hongo encuentra las condiciones de alimentación propicias en el sustrato. Es importante tener en cuenta que la acumulación de lovastatina en el micelio del hongo basidiomicetes como *Pleurotus ostreatus*, está relacionada con el final de

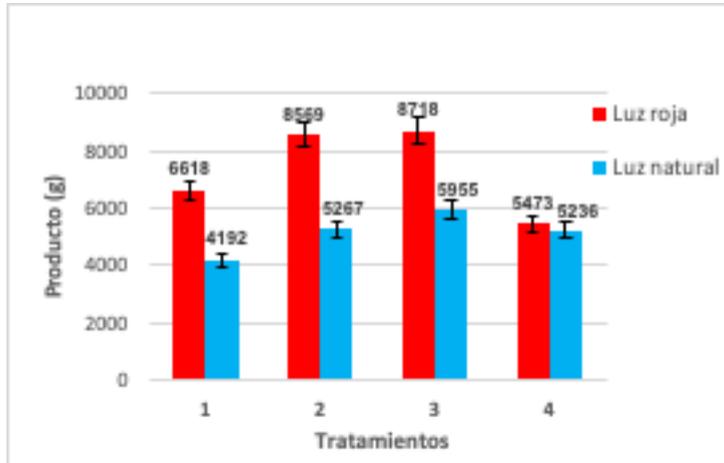
la fase exponencial del crecimiento –menor en la fase estacionaria– mientras que en hongos filamentosos como *Aspergillus terreus* se ha asociado a la fase estacionaria cuando las condiciones nutricionales no son favorables para el hongo (Manzoni y Rollini, 2002).

Las concentraciones entre el pie del cuerpo fructífero y las lamelas son diferentes (Ramírez, 2009). Gunde-Cinerman y Cinerman (1995), reportan que un cuerpo fructífero que cumplió con un crecimiento total a la hora de ser cosechado, como es el caso de las orellanas de este estudio, tendrá variaciones de concentración de lovastatina muy grandes entre sus lamelas y su tallo: de 3000 $\mu\text{g/}$ a 1000 $\mu\text{g/}$ mL en el sombrero y de 0 a 1000 $\mu\text{g/}$ mL en su tallo. Si se comparan los valores que se obtuvieron en la tercera fructificación –los más altos reportados– serían igualmente muy bajos (26,13 \pm 25,49 $\mu\text{g/}$ mL para el tratamiento con luz roja y 26,56 \pm 24,38 $\mu\text{g/}$ mL para el tratamiento con luz natural). Se debe tener presente que en el estudio anteriormente mencionado se utilizaron sales de amonio para fortalecer el sustrato –bagazo de soya– y en este se utilizaron bagazo de caña de azúcar y salvado de trigo como únicos sustratos, sin ningún otro tipo de nutriente intermediario.

Las estatinas solo pueden ser suministradas por vía oral y preferiblemente en ayunas para ayudar a que su proceso de absorción sea óptimo, ya que de la cantidad total ingerida solo se absorbe entre 1/3 a 2/3 de la cantidad total (Gregori, *et al.*, 2007). La dosis recomendada de lovastatina en tabletas es de 20 mg y la dosis máxima de 80 mg para casos de hipocolesterolemia muy graves, ya que después de esta cantidad se puede presentar una fuerte intoxicación con grandes efectos secundarios (Gregori, *et al.*, 2007). Los valores de lovastatina encontrados en estos hongos no representan cantidades preocupantes para que el consumo en humanos se vea comprometido.

Los mejores rendimientos en cantidad de biomasa obtenida y mayor tamaño en el sombrero del cuerpo fructífero se presentaron en T2 y T3 (Figura 39). Se encontró una mayor producción de *P. ostreatus* en los tratamientos bajo la luz roja, con un total de 1,145 kg y en los cultivos sin luz roja se obtuvo 1,084 kg; es decir, se presentó un incremento de cuerpo fructífero de 5,6 % de orellana cuando se expuso a la luz roja.

Figura 39
Rendimiento de la producción total de *Pleurotus ostreatus* en diferentes condiciones de sustrato y fuente de luz



Conclusiones

La producción de *P. ostreatus* puede aumentarse con la exposición del cultivo a una fuente de luz roja como se evidenció en esta investigación, lo que es importante ya que el aumento en producción es uno de los principales objetivos de los cultivadores. En cuanto a la calidad de la Orellana se observó que un mayor contenido de proteína se puede lograr cuando el sustrato presenta deficiencias de nitrógeno, pero es importante realizar un análisis riguroso de la materia prima utilizada en los sustratos para garantizar los valores requeridos de nutrientes. El contenido de lovastatina ofrece una ventaja para los productores, ya que este se presenta en la segunda y tercera cosecha de la Orellana, que se caracterizan por tener un menor tamaño, por lo que el valor agregado de ellas aumenta al poseer un contenido de lovastatina mayor.

Referencias

Capítulo I. Los hongos como controladores biológicos

- [1] Norma técnica colombiana 4422-2. Colombia, 2009.
- [2] R. Cuervo, F. Fernandez, F. Argote, and E. Osorio, Hongos levaduriformes aislados de frutas y de suelo de la región del Valle del Cauca, Colombia. Cali-Colombia: Editorial Bonaventuriana, 2015.
- [3] F. F. Fernandez-Daza et al., “Spores of *Beauveria bassiana* and *Trichoderma lignorum* as a bioinsecticide for the control of *Atta cephalotes*,” *Biol. Res.*, vol. 52, no. 1, p. 51, 2019
- [4] G. P. Opit, J. R. Nechols, and D. C. Margolies, “Biological control of twospotted spider mites, *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae), using *Phytoseiulus persimilis* Athias-Henriot (Acari: Phytoseidae) on ivy geranium: assessment of predator release ratios”. *Biol. Control*, Vol. 29, No. 3, pp. 445–452, Mar. 2004.
- [5] D. O. Simelane, D. C. Steinkraus, and T. J. Kring, “Predation rate and development of *Coccinella septempunctata* L. influenced by *Neozygites fresenii*-infected cotton aphid prey”. *Biol. Control*, Vol. 44, No. 1, pp. 128–135, Jan. 2008.
- [6] J. E. Losey and M. Vaughan, “The Economic Value of Ecological Services Provided by Insects”. *Bioscience*, Vol. 56, No. 4, pp. 311–323, 2006.
- [7] S. Myrick, G. W. Norton, K. N. Selvaraj, K. Natarajan, and R. Muniappan, “Economic impact of classical biological control of papaya mealybug in India”. *Crop Prot.*, Vol. 56, pp. 82–86, Feb. 2014.
- [8] E. Nava-Pérez, C. Garcia-Gutierrez, J. Camacho-Báez, and E. Vásquez-Montoya, “Ra Ximhai”. *Agriculture*, Vol. 8, No. 3, pp. 199–219, 2010.
- [9] D. Gerling, Ò. Alomar, and J. Arnó, “Biological control of *Bemisia tabaci* using predators and parasitoids”. *Crop Prot.*, Vol. 20, No. 9, pp. 779–799, 2001.

- [10] D. Perdikis, a. Fantinou, and D. Lykouressis, "Enhancing pest control in annual crops by conservation of predatory Heteroptera". *Biol. Control*, Vol. 59, NNo. 1, pp. 13–21, Oct. 2011.
- [11] R. Zanetti, J. Zanuncio, J. Santos, W. da Silva, G. Ribeiro, and P. Lemes, "An Overview of Integrated Management of Leaf-Cutting Ants (Hymenoptera: Formicidae) in Brazilian Forest Plantations". *Forests*, Vol. 5, No. 3, pp. 439–454, Mar. 2014.
- [12] G. Colin and R. Cruttwell, "Biological Control in the Developing World: Safety and Legal Issues". *Proc. X Int. Symp. Biol. Control Weeds*, Vol. 511, No. July 1999, pp. 505–511, 2000.
- [13] J. Grandgirard, M. S. Hoddle, J. N. Petit, G. K. Roderick, and N. Davies, "Classical biological control of the glassy-winged sharpshooter, *Homalodisca vitripennis*, by the egg parasitoid *Gonatocerus ashmeadi* in the Society, Marquesas and Austral archipelagos of French Polynesia". *Biol. Control*, Vol. 48, No. 2, pp. 155–163, Feb. 2009.
- [14] P. J. Ode and D. S. Crompton, "Compatibility of aphid resistance in soybean and biological control by the parasitoid *Aphidius colemani* (Hymenoptera: Braconidae)". *Biol. Control*, Vol. 64, No. 3, pp. 255–262, Mar. 2013.
- [15] Á. Celis, C. Mendoza, M. Pachón, J. Cardona, W. Delgado, and E. Cuca, "Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión Plant extracts used as biocontrol with emphasis on Piperaceae family . A review". *Agron. Colomb.*, Vol. 26, No. 1, pp. 97–105, 2008.
- [16] E. Nava-Pérez, C. Gracia-Gutierrez, F. R. Camacho-Baéz, and E. Lorena Vázquez-Montoya, "Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas". *Ra Ximhai*, Vol. 8, No. 3, pp. 17–29, 2012.
- [17] L. da Cruz Cabral, V. Fernández Pinto, and A. Patriarca, "Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods.". *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 166, No. 1, pp. 1–14, Aug. 2013.
- [18] M. J. Furlong, K. H. Ju, P. W. Su, J. K. Chol, R. Chang Il, and M. P. Zalucki, "Integration of endemic natural enemies and *Bacillus thuringiensis* to manage insect pests of *Brassica* crops in North Korea". *Agric. Ecosyst. Environ.*, Vol. 125, No. 1–4, pp. 223–238, May 2008.
- [19] N. Singh, S. Kumar, V. K. Bajpai, R. C. Dubey, D. K. Maheshwari, and S. C. Kang, "Biological control of *Macrophomina phaseolina* by chemotactic fluorescent *Pseudomonas aeruginosa* PNI and its plant growth promotory activity in chir-pine". *Crop Prot.*, Vol. 29, No. 10, pp. 1142–1147, Oct. 2010.
- [20] A. M. Huger, "The Oryctes virus: Its detection, identification, and implementation in biological control of the coconut palm rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera: Scarabaeidae)". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 89, No. 1, pp. 78–84, May 2005.

- [21] M. Erlandson, *Encyclopedia of Virology*. Elsevier, 2008.
- [22] P. A. Motta-delgado and B. Murcia-ordoñez, “Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas”. *Ambient. Água*, Vol. 6, No. 2, pp. 77–90, 2011.
- [23] R. Behle and T. Birthisel, “Chapter 14 - Formulations of Entomopathogens as Bioinsecticides”. in *Mass Production of Beneficial Organisms Invertebrates and Entomopathogens*, J. A. Morales-Ramos, M. G. Rojas, and D. I. B. T.-M. P. of B. O. Shapiro-Ilan, Eds. San Diego: Academic Press, 2014, pp. 483–517.
- [24] A. Kumar, D. Sasmal, and N. Sharma, “Immunomodulatory role of piperine in deltamethrin induced thymic apoptosis and altered immune functions.”. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, Vol. 39, No. 2, pp. 504–514, Jan. 2015.
- [25] J. Tian, H. Diao, L. Liang, C. Hao, S. Arthurs, and R. Ma, “Pathogenicity of *Isaria fumosorosea* to *Bemisia tabaci*, with some observations on the fungal infection process and host immune response”. *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 130, pp. 147–153, 2015.
- [26] J. M. Meyer, M. a Hoy, and D. G. Boucias, “Isolation and characterization of an *Isaria fumosorosea* isolate infecting the Asian citrus psyllid in Florida.”. *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 99, No. 1, pp. 96–102, Sep. 2008.
- [27] J.-Z. Niu, H. Hull-Sanders, Y.-X. Zhang, J.-Z. Lin, W. Dou, and J.-J. Wang, “Biological control of arthropod pests in citrus orchards in China”. *Biol. Control*, Vol. 68, pp. 15–22, Jan. 2014.
- [28] É. K. K. Fernandes, V. R. E. P. Bittencourt, and D. W. Roberts, “Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks.”. *Exp. Parasitol.*, Vol. 130, No. 3, pp. 300–5, Mar. 2012.
- [29] F. E. Vega, N. V. Meyling, J. J. Luangsa-ard, and M. Blackwell, “Chapter 6 - Fungal Entomopathogens”. in *Insect Pathology (Second Edition)*, F. E. Vega and H. K. B. T.-I. P. (Second E. Kaya, Eds. San Diego: Academic Press, 2012, pp. 171–220.
- [30] P. Chaverri *et al.*, “A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*-, *Moelleriella*-, and *Samuelsia* gen. nov. (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae), and their aschersonia-like anamorphs in the Neotropics”. *Stud. Mycol.*, Vol. 60, pp. 1–66, 2008.
- [31] S. S. Andreadis, K. R. Cloonan, G. S. Bellicanta, K. Paley, J. Pecchia, and N. E. Jenkins, “Efficacy of *Beauveria bassiana* formulations against the fungus gnat *Lycoriella ingenua*”. *Biol. Control*, Vol. 103, pp. 165–171, 2016.
- [32] N. V. Munteanu, P. V. Mitkovets, G. V. Mitina, A. Movila, Y. S. Tokarev, and A. Leclerque, “Prevalence of *Beauveria pseudobassiana* among entomopathogenic fungi isolated from the hard tick, *Ixodes ricinus*”. *Ticks Tick. Borne. Dis.*, Vol. 5, No. 6, pp. 641–648, 2014.

- [33] M. S. Ullah and U. T. Lim, "Laboratory evaluation of the effect of *Beauveria bassiana* on the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae)". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 148, pp. 102–109, 2017.
- [34] S. A. Pelizza *et al.*, "Virulence and enzymatic activity of three new isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) from the South American locust *Schistocerca cancellata* (Orthoptera: Acrididae)". *J. King Saud Univ. - Sci.*, pp. 6–9, 2017.
- [35] C. M. Senthil Kumar, T. K. Jacob, S. Devasahayam, S. D'Silva, and P. G. Nandeesh, "Characterization and virulence of *Beauveria bassiana* associated with auger beetle (*Sinoxylon anale*) infesting allspice (*Pimenta dioica*)". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 139, pp. 67–73, 2016.
- [36] M. Dhawan and N. Joshi, "Enzymatic comparison and mortality of *Beauveria bassiana* against cabbage caterpillar *Pieris brassicae* LINN". *Brazilian J. Microbiol.*, Vol. 48, No. 3, pp. 522–529, 2017.
- [37] S. Wu, Z. He, E. Wang, X. Xu, and Z. Lei, "Application of *Beauveria bassiana* and *Neoseiulus barkeri* for improved control of *Frankliniella occidentalis* in greenhouse cucumber". *Crop Prot.*, Vol. 96, pp. 83–87, 2017.
- [38] T. A. Ugine, S. P. Wraight, and J. P. Sanderson, "Microbial biological control potential of three strains of *Beauveria bassiana* s.l. against greenhouse shore fly *Scatella tenuicosta*: Assessment of virulence, mass production capacity, and effects on shore fly reproduction". *Biol. Control*, Vol. 65, No. 3, pp. 348–356, 2013.
- [39] A. R. Sánchez-Rodríguez, S. Raya-Díaz, Á. M. Zamarreño, J. M. García-Mina, M. C. del Campillo, and E. Quesada-Moraga, "An endophytic *Beauveria bassiana* strain increases spike production in bread and durum wheat plants and effectively controls cotton leafworm (*Spodoptera littoralis*) larvae". *Biol. Control*, Vol. 116, pp. 90–102, 2018.
- [40] S. Kaur, A. Thakur, and M. Rajput, "A laboratory assessment of the potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin as a biocontrol agent of *Corcyra cephalonica* Stainton (Lepidoptera: Pyralidae)". *J. Stored Prod. Res.*, Vol. 59, pp. 185–189, 2014.
- [41] D. Immediato *et al.*, "Laboratory evaluation of a native strain of *Beauveria bassiana* for controlling *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) (Acari: Dermanyssidae)". *Vet. Parasitol.*, Vol. 212, No. 3–4, pp. 478–482, 2015.
- [42] A. Imoulan *et al.*, "*Beauveria medogensis* sp. nov., a new fungus of the entomopathogenic genus from China". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 139, pp. 74–81, 2016.
- [43] J. Rodrigues, V. C. Campos, R. A. Humber, and C. Luz, "Efficacy of *Culicinomyces* spp. against *Aedes aegypti* eggs, larvae and adults". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 157, pp. 104–111, 2018.

- [44] L. P. Castillo, A. Osorio, N. Vargas, T. Sanjuan, and S. Restrepo, "Genetic diversity of the entomopathogenic fungus *Cordyceps tenuipes* in forests and butterfly gardens in Quindío, Colombia". *Fungal Biol.*, Vol. 122, No. 9, pp. 891–899, 2018.
- [45] M. E. Rueda-Páramo, C. Montalva, W. Arruda, K. K. Fernandes, C. Luz, and R. A. Humber, "First report of *Coelomomyces santabrancae* sp. nov. (Blastocladiomycetes: Blastocladales) infecting mosquito larvae (Diptera: Culicidae) in central Brazil". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 149, pp. 114–118, 2017.
- [46] L. T. Villacarlos, B. S. Mejia, and S. Keller, "(Entomophthorales : Zygomycetes) infecting *Tetraleurodes acaciae* (Quaintance) (Insecta , Hemiptera : Aleyrodidae), a recently introduced whitefly on *Gliricidia sepium* (Jaq.) Walp. (Fabaceae) in the Philippines". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 83, No. 2003, pp. 16–22, 2011.
- [47] R. G. Manfrino, A. C. Gutiérrez, D. C. Steinkraus, C. E. Salto, and C. C. López Lastra, "Prevalence of entomophthoralean fungi (Entomophthoromycota) of aphids (Hemiptera: Aphididae) on solanaceous crops in Argentina". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 121, pp. 21–23, 2014.
- [48] D. C. Steinkraus, A. E. Hajek, and J. K. Liebherr, "Zombie soldier beetles: Epizootics in the goldenrod soldier beetle, *Chauliognathus pensylvanicus* (Coleoptera: Cantharidae) caused by *Eryniopsis lampyridarum* (Entomophthoromycotina: Entomophthoraceae)". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 148, pp. 51–59, 2017.
- [49] S. P. Wraight, S. Galaini-Wraight, L. A. Castrillo, M. H. Griggs, L. M. Keith, and T. K. Matsumoto, "Collection, isolation, in vitro culture, and laboratory transmission of *Hirsutella eleutheratorum* (Hypocreales: Ophiocordycipitaceae) from coffee berry borer on Hawai'i Island". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 157, pp. 53–66, 2018.
- [50] E. Galindo-Velasco *et al.*, "Efficacy of entomopathogenic fungi (Ascomycetes: Hypocreales) against adult *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) under stable conditions in the Mexican dry tropics". *Vet. Parasitol.*, Vol. 209, No. 3–4, pp. 173–178, 2015.
- [51] G. M. Mascarín, N. N. Kobori, E. D. Quintela, and I. Delalibera, "The virulence of entomopathogenic fungi against *Bemisia tabaci* biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) and their conidial production using solid substrate fermentation". *Biol. Control*, Vol. 66, No. 3, pp. 209–218, 2013.
- [52] M. G. Maldonado-Blanco, E. Y. Leal-López, O. A. Ochoa-Salazar, M. Elías-Santos, L. J. Galán-Wong, and H. Quiroz-Martínez, "Effects of culture medium and formulation on the larvicidal activity of the mosquito pathogen *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) against *Aedes aegypti*". *Acta Trop.*, Vol. 117, No. 2, pp. 114–118, 2011.
- [53] T. Y. Shin, S. M. Bae, D. J. Kim, H. G. Yun, and S. D. Woo, "Evaluation of virulence, tolerance to environmental factors and antimicrobial activities of entomopatho-

- genic fungi against two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*". *Mycoscience*, Vol. 58, No. 3, pp. 204–212, 2017.
- [54] C. Montalva *et al.*, "First report of *Leptolegnia chapmanii* (Peronosporomycetes: Saprolegniales) affecting mosquitoes in central Brazil". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 136, pp. 109–116, 2016.
- [55] C. C. Staats, L. Kmetzsch, I. Lubeck, A. Junges, M. H. Vainstein, and A. Schrank, "Metarhizium anisopliae chitinase CHIT30 is involved in heat-shock stress and contributes to virulence against *Dysdercus peruvianus*". *Fungal Biol.*, Vol. 117, No. 2, pp. 137–144, 2013.
- [56] C. Cruz-Vazquez, J. Carvajal Márquez, R. Lezama-Gutiérrez, I. Vitela-Mendoza, and M. Ramos-Parra, "Efficacy of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in the control of infestation by stable flies *Stomoxys calcitrans* (L.), under natural infestation conditions". *Vet. Parasitol.*, Vol. 212, No. 3–4, pp. 350–355, 2015.
- [57] S. Eckard, M. A. Ansari, S. Bacher, T. M. Butt, J. Enkerli, and G. Grabenweger, "Virulence of in vivo and in vitro produced conidia of *Metarhizium brunneum* strains for control of wireworms". *Crop Prot.*, Vol. 64, pp. 137–142, 2014.
- [58] M. T. Islam, D. Omar, and M. Shabanimofoad, "Molecular identification and virulence of six isolates of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) to *Bemisia tabaci* Q biotype". *J. Asia. Pac. Entomol.*, Vol. 17, No. 3, pp. 237–241, 2014.
- [59] K. Westrum, V. S. Duarte, R. A. Humber, I. Delalibera, and I. Klingen, "Confirmation of *Neozygites floridana* azygospore formation in two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) in strains from tropical and temperate regions". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 122, pp. 1–5, 2014.
- [60] S. K. r Ghosh and S. Pal, "Entomopathogenic potential of *Trichoderma longibrachiatum* and its comparative evaluation with malathion against the insect pest *Leucinodes orbonalis*". *Environ. Monit. Assess.*, Vol. 188, No. 1, p. 37, 2016.
- [61] A. E. Hajek *et al.*, "Phylogenetic placement of two species known only from resting spores: *Zoophthora independentia* sp. nov. and *Z. porteri* comb nov. (Entomophthorales: Entomophthoraceae)". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 140, pp. 68–74, 2016.
- [62] R. I. Torres Acosta, R. A. Humber, and S. R. Sánchez-Peña, "*Zoophthora radicans* (Entomophthorales), a fungal pathogen of *Bagrada hilaris* and *Bactericera cockerelli* (Hemiptera: Pentatomidae and Triozidae): Prevalence, pathogenicity, and interplay of environmental influence, morphology, and sequence data on fungal identification". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 139, pp. 82–91, 2016.
- [63] S. A. El-Debaiky, "Antagonistic studies and hyphal interactions of the new antagonist *Aspergillus piperis* against some phytopathogenic fungi in vitro in comparison with *Trichoderma harzianum*". *Microb. Pathog.*, vol. 113, No. October, pp. 135–143, 2017.

- [64] A. H. Ab Majid *et al.*, “Morphological and molecular characterization of fungus isolated from tropical bed bugs in Northern Peninsular Malaysia, *Cimex hemipterus* (Hemiptera: Cimicidae)”. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, Vol. 5, No. 9, pp. 707–713, 2015.
- [65] A. S. Al-Hazmi and M. TariqJaveed, “Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogyne javanica* on tomato”. *Saudi J. Biol. Sci.*, Vol. 23, No. 2, pp. 288–292, 2016.
- [66] D. G. Hirpara, H. P. Gajera, J. G. Hirapara, and B. A. Golakiya, “Inhibition coefficient and molecular diversity of multi stress tolerant *Trichoderma* as potential biocontrol agent against *Sclerotium rolfsii* Sacc.”. *Infect. Genet. Evol.*, Vol. 55, pp. 75–92, 2017.
- [67] I. S. Sawant, P. N. Wadkar, S. B. Ghule, Y. R. Rajguru, V. P. Salunkhe, and S. D. Sawant, “Enhanced biological control of powdery mildew in vineyards by integrating a strain of *Trichoderma afroharzianum* with sulphur”. *Biol. Control*, Vol. 114, pp. 133–143, 2017.
- [68] P. Kong and C. Hong, “Biocontrol of boxwood blight by *Trichoderma koningiopsis* Mb2”. *Crop Prot.*, Vol. 98, pp. 124–127, 2017.
- [69] F. Zhang *et al.*, “Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean”. *Plant Physiol. Biochem.*, Vol. 100, pp. 64–74, 2016.
- [70] J. B. Mbarga *et al.*, “A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*”. *Biol. Control*, Vol. 77, pp. 15–22, 2014.
- [71] A. G. Xue *et al.*, “Effect of seed treatment with novel strains of *Trichoderma* spp. on establishment and yield of spring wheat”. *Crop Prot.*, Vol. 96, pp. 97–102, 2017.
- [72] S. de los Santos-Villalobos *et al.*, “Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.)”. *Biol. Control*, Vol. 64, No. 1, pp. 37–44, 2013.
- [73] T. Eslaminejad Parizi, M. Ansaria, and T. Elaminejad, “Evaluation of the potential of *Trichoderma viride* in the control of fungal pathogens of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) in vitro”. *Microb. Pathog.*, Vol. 52, No. 4, pp. 201–205, 2012.
- [74] T. L. Widmer, “Screening *Trichoderma* species for biological control activity against *Phytophthora ramorum* in soil”. *Biol. Control*, Vol. 79, pp. 43–48, Dec. 2014.
- [75] N. S. John *et al.*, “Characterization of *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii*, the collar rot pathogen of *Amorphophallus* - A polyphasic approach”. *Biol. Control*, Vol. 90, pp. 164–172, 2015.

- [76] R. Sharma, A. Magotra, R. S. Manhas, and A. Chaubey, "Antagonistic potential of a psychrotrophic fungus: *Trichoderma velutinum* ACR-P1". *Biol. Control*, Vol. 115, pp. 12–17, 2017.
- [77] J. A. Marfetán, A. I. Romero, and P. J. Folgarait, "Pathogenic interaction between *Escovopsis weberi* and *Leucoagaricus* sp.: Mechanisms involved and virulence levels". *Fungal Ecol.*, Vol. 17, pp. 52–61, 2015.
- [78] C. Góngora, P. Marín, and P. Benavides, "Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café". *Av. tencicos Cenifacfe*, No. 16, pp. 3–8, 2009.
- [79] P. A. Motta-delgado and B. Murcia-ordoñez, "Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas Fungos entomopatógenos como alternativa para o controle biológico de pragas". *Ambient. Água*, Vol. 6, No. 2, pp. 77–90, 2011.
- [80] P. Motta-Delgado and B. Murcia-Ordoñez, "Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas". *Ambient. Água - An Interdiscip. J. Appl. Sci.*, Vol. 6, No. 2, pp. 70–90, 2011.
- [81] A. Téllez-jurado, M. Guadalupe, C. Ramírez, and Y. M. Flores, "Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos.". *Revisra Mex. Micol.*, Vol. 30, pp. 73–80, 2009.
- [82] M. D. E. Acción, D. E. T. Frente, D. Infante, B. Martínez, and N. González, "Artículo reseña fitopatógenos *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi". *Rev. Protección Veg.*, Vol. 24, No. 1, pp. 14–21, 2009.
- [83] J. M. Steyaert, H. J. Ridgway, Y. Elad, and A. Stewart, "Genetic basis of mycoparasitism : A mechanism of biological control by species of *Trichoderma*". *New Zeal. J. Crop Hortic. Sci.*, Vol. 31, No. 4, pp. 281–291, 2003.
- [84] A. Abbas, D. Jiang, and Y. Fu, "Plant Pathology & Microbiology *Trichoderma* spp . as Antagonist of *Rhizoctonia solani*". *J. Plant Pathol. Microbiol.*, Vol. 8, No. 3, 2017.
- [85] C. Zhu, J. Shi, C. Jiang, and Y. Liu, "Inhibition of the growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus ochraceus* in vitro and in vivo through antagonistic yeasts". *Food Control*, Vol. 50, pp. 125–132, 2015.
- [86] Y. Liu, W. Wang, Y. Zhou, S. Yao, L. Deng, and K. Zeng, "Isolation, identification and in vitro screening of Chongqing orangery yeasts for the biocontrol of *Penicillium digitatum* on citrus fruit". *Biol. Control*, Vol. 110, pp. 18–24, 2017.
- [87] L. Parafati, G. Cirvilleri, C. Restuccia, and M. Wisniewski, "Potential Role of Exoglucanase Genes (WaEXG1 and WaEXG2) in the Biocontrol Activity of *Wickerhamomyces anomalus*". *Microb. Ecol.*, Vol. 73, No. 4, pp. 876–884, 2017.

- [88] K. a. G. Wyckhuys *et al.*, “Current status and potential of conservation biological control for agriculture in the developing world”. *Biol. Control*, Vol. 65, No. 1, pp. 152–167, Apr. 2013.
- [89] W. Colin G and R. E. C. Mcfadyen, “Biological Control in the Developing World : Safety and Legal Issues”. *Proc. X Int. Symp. Biol. Control Weeds*, pp. 505–511, 2000.
- [90] N. Estrada, Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Medellín-Colombia: Universidad de Antioquia, 2008.
- [91] J. Alarcon, E. Arevalo, A. luisa Diaz, J. Galindo, and A. Rosero, Manejo Integrado de plagas enfermedades en el cultivo del caucho. Bogota-Colombia: ICA, 2012.
- [92] S. Uribe, “UNPeriodico Hormiga arriera es el terror del 50% de las plantas del Chocó”. *agencia de noticiasUN*, Bogota-Colombia, May-2013.
- [93] J. Montoya-lerma, C. Giraldo-echeverri, I. Armbrrecht, A. Farji-Brener, and Z. Calle, “International Journal of Pest Management Leaf-cutting ants revisited : Towards rational management and control”. *Int. J. Pest Manag.*, Vol. 58, No. 3, pp. 37–41, 2012.
- [94] J. Vergara, A. Grazon, and G. Banguero, Biología, manejo y control de la Hormiga Arriera. Santiago de Cali: Gobernacion del Valle del Cauca, 2005.
- [95] S. Uribe Pérez, “UNPeriodico Hormiga arriera es el terror del 50% de las plantas del Chocó”. *agencia de noticiasUN*. 2013.
- [96] El Tiempo, “Cultivos en riesgo por hormiga arriera”. *El Tiempo*, Bogota-Colombia, 20-Feb-1999.
- [97] C. Alexander, “La hormiga arriera, una amenaza para agricultores”. Buga, Nov-2002.
- [98] Ma. Montoya-Correa, J. Montoya-lerma, I. Armbrrecht, and Ma. C. Gallego Rosero, “¿Cómo responde la hormiga cortadora de hojas *atta cephalotes* (*Hymenoptera: myrmicinae*) a la remoción mecánica de sus nidos? Mavir”. *Boletín del Mus. Entomol. la Univ. del Val.*, Vol. 8, No. 2, pp. 1–8, 2007.
- [99] G. A. Dominah, R. A. McMinimy, S. Kallon, and G. F. Kwakye, “Acute exposure to chlorpyrifos caused NADPH oxidase mediated oxidative stress and neurotoxicity in a striatal cell model of Huntington’s disease”. *Neurotoxicology*, Vol. 60, pp. 54–69, 2017.
- [100] D. Villar *et al.*, “In vitro resistance to topical acaricides of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* from four regions of Colombia.”. *Rev. CES Med. Vet. y Zootec.*, Vol. 11, No. 3, pp. 58–70, 2016.
- [101] J. S. de Britto *et al.*, “Use of alternatives to PFOS, its salts and PFOSF for the control of leaf-cutting ants *Atta* and *Acromyrmex*”. *Int. J. Reserch Environ. Stud.*, Vol. 3, pp. 11–92, 2016.

- [102] E. Corsini, R. W. Luebke, D. R. Germolec, and J. C. DeWitt, "Perfluorinated compounds: Emerging POPs with potential immunotoxicity". *Toxicol. Lett.*, Vol. 230, No. 2, pp. 263–270, 2014.
- [103] T. B. Knudsen, M. T. Martin, R. J. Kavlock, R. S. Judson, D. J. Dix, and A. V. Singh, "Profiling the activity of environmental chemicals in prenatal developmental toxicity studies using the U.S. EPA's ToxRefDB". *Reprod. Toxicol.*, Vol. 28, pp. 209–219, 2009.
- [104] R. G. Schnellmann, "The cellular effects of a unique pesticide sulfluramid (N-ethylperfluorooctane sulphonamide) on rabbit renal proximal tubules". *Toxicol. Vitr.*, Vol. 4, No. 1, pp. 71–74, 1990.
- [105] V. A. Rauh *et al.*, "Brain anomalies in children exposed prenatally to a common organophosphate pesticide". *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 109, No. 20, pp. 7871–7876, 2012.
- [106] A. a Brennan, A. D. Harwood, J. You, P. F. Landrum, and M. J. Lydy, "Degradation of fipronil in anaerobic sediments and the effect on porewater concentrations.". *Chemosphere*, Vol. 77, No. 1, pp. 22–8, Sep. 2009.
- [107] K. Mandal and B. Singh, "Persistence of fipronil and its metabolites in sandy loam and clay loam soils under laboratory conditions.". *Chemosphere*, Vol. 91, No. 11, pp. 1596–603, Jun. 2013.
- [108] R. M. Kartheek and M. David, "Assessment of fipronil toxicity on wistar rats: A hepatotoxic perspective". *Toxicol. Reports*, Vol. 5, No. July 2017, pp. 448–456, 2018.
- [109] C. Vidau *et al.*, "Fipronil is a powerful uncoupler of oxidative phosphorylation that triggers apoptosis in human neuronal cell line SHSY5Y.". *Neurotoxicology*, Vol. 32, No. 6, pp. 935–43, Dec. 2011.
- [110] B. ZHANG, F. KONG, H. WANG, X. GAO, X. ZENG, and X. SHI, "Insecticide induction of O-demethylase activity and expression of cytochrome P450 genes in the red imported fire ant (*Solenopsis invicta* Buren)". *J. Integr. Agric.*, Vol. 15, No. 1, pp. 135–144, 2016.
- [111] B. ZHANG, F. KONG, H. WANG, X. GAO, X. ZENG, and X. SHI, "Insecticide induction of O-demethylase activity and expression of cytochrome P450 genes in the red imported fire ant (*Solenopsis invicta* Buren)". *J. Integr. Agric.*, Vol. 15, No. 1, pp. 135–144, 2016. La 110 = 111
- [112] M. Ejaz, M. B. S. Afzal, G. Shabbir, J. E. Serrão, S. A. Shad, and W. Muhammad, "Laboratory selection of chlorpyrifos resistance in an Invasive Pest, *Phenacoccus solenopsis* (Homoptera: Pseudococcidae): Cross-resistance, stability and fitness cost". *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol. 137, pp. 8–14, 2017.
- [113] V. Magendira Mani, S. Asha, and A. M. M. Sadiq, "Pyrethroid deltamethrin-induced developmental neurodegenerative cerebral injury and ameliorating effect

- of dietary glycoside naringin in male wistar rats". *Biomed. Aging Pathol.*, Vol. 4, No. 1, pp. 1–8, Jan. 2014.
- [114] F.-J. Liu *et al.*, "Ca(2+) movement and apoptosis induced by deltamethrin in Madin-Darby canine kidney canine renal tubular cells.". *Kaohsiung J. Med. Sci.*, Vol. 31, No. 1, pp. 1–8, Jan. 2015.
- [115] C. Sams and K. Jones, "Biological monitoring for exposure to deltamethrin: a human oral dosing study and background levels in the UK general population.". *Toxicol. Lett.*, Vol. 213, No. 1, pp. 35–8, Aug. 2012.
- [116] E.-M. Somia and F. Madiha, "Pathological effects of dichlorvos and fenitrothion in mice.". *Pathol. Res. Pract.*, Vol. 208, No. 5, pp. 286–91, May 2012.
- [117] E. Castro-Janer, L. Rifran, P. González, J. Piaggio, a Gil, and T. T. S. Schumaker, "Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays.". *Vet. Parasitol.*, Vol. 169, No. 1–2, pp. 172–7, Apr. 2010.
- [118] R. Bonafos, V. Vignes, E. Serrano, and P. Auger, "Resistance monitoring to deltamethrin and chlorpyrifos-ethyl in 13 populations of *Typhlodromus pyri* Scheuten (Acari: Phytoseiidae) from vineyards in the southwest of France". *Crop Prot.*, Vol. 27, No. 3–5, pp. 855–858, Mar. 2008.
- [119] W. Geremedhin, M. Amare, and S. Admassie, "Electrochemically pretreated glassy carbon electrode for electrochemical detection of fenitrothion in tap water and human urine". *Electrochim. Acta*, Vol. 87, pp. 749–755, Jan. 2013.
- [120] A. Ç. K. Benli and A. Özkul, "Acute toxicity and histopathological effects of sublethal fenitrothion on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*". *Pestic. Biochem. Physiol.*, Vol. 97, No. 1, pp. 32–35, May 2010.
- [121] T. Matsushita, Y. Matsui, R. Saeki, and T. Inoue, "Mutagenicity of anaerobic fenitrothion metabolites after aerobic biodegradation.". *Chemosphere*, Vol. 61, No. 8, pp. 1134–41, Dec. 2005.
- [122] N. Michel *et al.*, "Fipronil and two of its transformation products in water and European eel from the river Elbe". *Sci. Total Environ.*, Vol. 568, pp. 171–179, 2016.
- [123] J. Weber, R. Kurková, J. Klánová, P. Klán, and C. J. Halsall, "Photolytic degradation of methyl-parathion and fenitrothion in ice and water: implications for cold environments.". *Environ. Pollut.*, Vol. 157, No. 12, pp. 3308–13, Dec. 2009.
- [124] J. Weber, C. J. Halsall, J. J. Wargent, and N. D. Paul, "The aqueous photodegradation of fenitrothion under various agricultural plastics: implications for pesticide longevity in agricultural 'micro-environments'.". *Chemosphere*, Vol. 76, No. 1, pp. 147–50, Jun. 2009.
- [125] U. Ahirwar, G. Dubey, N. Singh, S. R. Mohanty, and B. Kollah, "Interactive effect of climate factors, biochar and insecticide chlorpyrifos on methane consumption

- and microbial abundance in a tropical Vertisol". *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Vol. 157, No. March, pp. 409–416, 2018.
- [126] J. G. Thundiyil, J. Stober b, and J. Besbelli c, Nida Pronczuk, "WHO Acute pesticide poisoning a proposed classification tool". *World Heal. Organ.*, Vol. 86, No. 3, pp. 161–240, 2008.
- [127] M. Bollazzi, L. C. Forti, S. Moreira, and F. Roces, "Efficiency and soil contamination during underground application of insecticides: control of leaf-cutting ants with thermal foggers". *J. Pest Sci.* (2004)., Vol. 87, No. 1, pp. 181–189, Oct. 2013.
- [128] W. C. C. Morais *et al.*, "Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants". *Ind. Crops Prod.*, pp. 2008–2011, Nov. 2014.
- [129] K. Castaño-Quintana, J. Montoya-Lerma, and C. Giraldo-Echeverri, "Toxicity of foliage extracts of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) on *Atta cephalotes* (Hymenoptera: Myrmicinae) workers". *Ind. Crops Prod.*, Vol. 44, pp. 391–395, Jan. 2013.
- [130] E. I. Valderrama-Eslava, J. Montoya-Lerma, and C. Giraldo, "Enforced herbivory on *Canavalia ensiformis* and *Tithonia diversifolia* and its effects on leaf-cutting ants, *Atta cephalotes*". *J. Appl. Entomol.*, Vol. 133, No. 9–10, pp. 689–694, Dec. 2009.
- [131] M. de F. S. dos S. Oliveira, "Controle de formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae) com produtos naturais". 2014.
- [132] J. Cordoba *et al.*, "Homiga arriera manejo y control Cartilla No. 2". Universidad Tecnológica del Chocó- Ministerio de Agricultura (PRONATTA), Quibdó, p. NA, 2002.
- [133] S. de los Santos-Villalobos *et al.*, "Potential use of *Trichoderma asperellum* (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) T8a as a biological control agent against anthracnose in mango (*Mangifera indica* L.)". *Biol. Control*, Vol. 64, No. 1, pp. 37–44, Jan. 2013.
- [134] S. Siddiquee, U. K. Yusuf, K. Hossain, and S. Jahan, "In vitro studies on the potential *Trichoderma harzianum* for antagonistic properties against *Ganoderma boninense*". Vol. 7, No. October, 2009.
- [135] M. Verma, S. K. Brar, R. D. Tyagi, R. Y. Surampalli, and J. R. Valéro, "Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control". *Biochem. Eng. J.*, Vol. 37, No. 1, pp. 1–20, Oct. 2007.
- [136] F. C. Pagnocca, V. E. Masiulionis, and A. Rodrigues, "Specialized Fungal Parasites and Opportunistic Fungi in Gardens of *Attine* Ants". *Psyche A J. Entomol.*, Vol. 2012, pp. 1–9, 2012.
- [137] S. N. Shafawati and S. Siddiquee, "Composting of oil palm fibres and *Trichoderma* spp. as the biological control agent: A review". *Int. Biodeterior. Biodegradation*, Vol. 85, pp. 243–253, Nov. 2013.

- [138] A. Yuly, M. Ginna, A. Raúl, D. Vanegas, J. Antonio, and C. Liliana, "Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*)". *Rev. Científica Guillermo Ockham*, Vol. 6, No. 1, pp. 91–98, 2008.
- [139] E. L. Arismendy and S. O. Peralta, "Metarhizium anisopliae y Trichoderma viride controlan colonias de *Atta cephalotes* en campo mejor que un insecticida químico *Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* control colonies of *Atta cephalotes* in field better than a chemical insecticide". No. 574, pp. 71–78.
- [140] A. Ortiz and S. Orduz, "In vitro evaluation of *Trichoderma* and *Gliocladium antagonism* against the symbiotic fungus of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes*". pp. 53–60, 2001.
- [141] F. Fernandez, V. Castro-Huertas, and F. Serna, Hormigas cortadoras de hojas de Colombia: *Acromyrmex* y *Atta* (Hymenoptera: Formicidae), Primera ed., No. 5. Bogota-Colombia: Universidad Nacional de Colombia, 2015.
- [142] H. Qu *et al.*, "Environmental behavior of the chiral insecticide fipronil: Enantioselective toxicity, distribution and transformation in aquatic ecosystem". *Water Res.*, Vol. 105, pp. 138–146, 2016.
- [143] H. Qu *et al.*, "The toxicity, bioaccumulation, elimination, conversion of the enantiomers of fipronil in *Anodonta woodiana*". *J. Hazard. Mater.*, Vol. 312, pp. 169–174, 2016.
- [144] G. N. Diaz Napal *et al.*, "Screening of native plants from central Argentina against the leaf-cutting ant *Acromyrmex lundii* (Guérin) and its symbiotic fungus". *Ind. Crops Prod.*, Vol. 76, pp. 275–280, 2015.
- [145] W. C. C. Morais *et al.*, "Extracts of *Ageratum conyzoides*, *Coriandrum sativum* and *Mentha piperita* inhibit the growth of the symbiotic fungus of leaf-cutting ants". *Ind. Crops Prod.*, Vol. 65, pp. 463–466, 2015.
- [146] J. A. Stenberg, M. Heil, I. Åhman, and C. Björkman, "Optimizing Crops for Biocontrol of Pests and Disease". *Trends Plant Sci.*, Vol. 20, No. 11, pp. 698–712, 2015.
- [147] L. A. Lacey, "Chapter 1 - Entomopathogens Used as Microbial Control Agents BT - Microbial Control of Insect and Mite Pests". in *Microbial Control of Insect and Mite Pests From Theory to Practice*, Academic Press, 2017, pp. 3–12.
- [148] M. Greenfield, M. I. Gómez-Jiménez, V. Ortiz, F. E. Vega, M. Kramer, and S. Parsa, "*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* endophytically colonize cassava roots following soil drench inoculation". *Biol. Control*, Vol. 95, pp. 40–48, Apr. 2016.
- [149] J. Jirakkakul *et al.*, "Culture degeneration in conidia of *Beauveria bassiana* and virulence determinants by proteomics". *Fungal Biol.*, No. 2018, 2017.

- [150] F. Miranda-Hernández, A. Angel-Cuapio, and O. Loera-Corral, "33 - Production of Fungal Spores for Biological Control A2 - Pandey, Ashok". S. Negi and C. R. B. T.-C. D. in B. and B. Socol, Eds. Elsevier, 2017, pp. 757–779.
- [151] M. Faria, R. B. Lopes, D. A. Souza, and S. P. Wraight, "Conidial vigor vs. viability as predictors of virulence of entomopathogenic fungi". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 125, pp. 68–72, Feb. 2015.
- [152] Y. Lemus *et al.*, "Determinación de la factibilidad del hongo *Metarhizium anisopliae* para ser usado como control biológico de la hormiga arriera (*Atta cephalotes*)". *Rev. científica Guillermo Ockham*, Vol. 6, No. 1, pp. 91–98, 2008.
- [153] M. Sun *et al.*, "Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) in China". *Parasitol. Int.*, Vol. 62, No. 5, pp. 412–5, 2013.
- [154] E. Lopez and S. Orduz, "*Metarhizium anisopliae* and *Trichoderma viride* for control of nests of the fungus-growing ant, *Atta cephalotes*". *Biol. Control*, Vol. 27, No. 2, pp. 194–200, Jun. 2003.
- [155] A. M. C. Castilho, M. E. Fraga, E. D. L. Aguiar-menezes, and C. A. da R. Rosa, "Seleção de isolados de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* patogênicos a soldados de *Atta bisphaerica* e *Atta sexdens rubropilosa* em condições de laboratório". *Ciência Rural*, vol. 40, pp. 1243–1249, 2010.
- [156] A. V. Santos, B. L. De Oliveira, and R. I. Samuels, "Selection of entomopathogenic fungi for use in combination with sub-lethal doses of imidacloprid: Perspectives for the control of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel (Hymenoptera: Formicidae)". *Mycopathologia*, Vol. 163, No. 4, pp. 233–240, 2007.
- [157] C. A. Valero-Jiménez, H. Wieggers, B. J. Zwaan, C. J. M. Koenraadt, and J. A. L. van Kan, "Genes involved in virulence of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*". *J. Invertebr. Pathol.*, Vol. 133, pp. 41–49, 2016.
- [158] S. Zeilinger, S. Gruber, R. Bansal, and P. K. Mukherjee, "Secondary metabolism in *Trichoderma* - Chemistry meets genomics". *Fungal Biol. Rev.*, Vol. 30, No. 2, pp. 74–90, 2016.
- [159] J. Li *et al.*, "Evaluation of a New Entomopathogenic Strain of *Beauveria bassiana* and a New Field Delivery Method against *Solenopsis invicta*". *PLoS One*, Vol. 11, No. 6, pp. 4–11, 2016.
- [160] K. Mighell and S. A. Van Bael, "Selective elimination of microfungi in leaf-cutting ant gardens". *Fungal Ecol.*, Vol. 24, pp. 15–20, 2016.

Capítulo II. Hongos Como Productores de Enzimas Pectinolíticas

- [1] Choi, G. W., Um, H. J., Kim, Y., Kang, H. W., Kim, M., Chung, B. W., & Kim, Y. H. (2010). Isolation and characterization of two soil derived yeasts for bioethanol pro-

- duction on *Cassava starch*. *Biomass and Bioenergy*, 34(8), 1223-1231. doi:10.1016/j.biombioe.2010.03.019
- [2] Man-yun, Z., Ying, T., Ye, Z. H. U., Jun, W., Yong-ming, L. U. O., Christie, P., & Zhen-gao, L. I. (2014). Isolation and Characterization of Chlorothalonil-Degrading Bacterial Strain H4 and Its Potential for Remediation of Contaminated Soil 1. *Pedosphere: An International Journal*, 24(6), 799-807. doi:10.1016/S1002-0160(14)60067-9
- [3] Yurkov, a. M., Kemler, M., & Begerow, D. (2012). Assessment of yeast diversity in soils under different management regimes. *Fungal Ecology*, 5(1), 24-35. doi:10.1016/j.funeco.2011.07.004
- [4] Chang, C., Lee, C., Lin, K., & Liu, S. (2015). Diversity of yeasts associated with the sea surface microlayer and underlying water along the northern coast of Taiwan. *Research in Microbiology*, (September), 1-11. doi:10.1016/j.resmic.2015.08.005
- [5] Karimi, M., & Hassanshahian, M. (2015). Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand , Kerman. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 18-24. doi:10.1016/j.bjm.2015.11.032
- [6] Medeiros, A. O., Kohler, L. M., Hamdan, J. S., Missagia, B. S., Barbosa, F. A. R., & Rosa, C. A. (2008). Diversity and antifungal susceptibility of yeasts from tropical freshwater environments in Southeastern Brazil, 42, 3921-3929. doi:10.1016/j.watres.2008.05.026
- [7] Silva, E. G. da, Borges, F. M., Medina, C., Piccoli, R. H., & Schwan, R. F. (2005). Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, 5(9), 859-865. doi:10.1016/j.femsyr.2005.02.006
- [8] Chanprasartsuk, O., Prakitchaiwattana, C., Sanguandeeikul, R., & Fleet, G. H. (2010). Autochthonous yeasts associated with mature pineapple fruits, freshly crushed juice and their ferments; and the chemical changes during natural fermentation. *Bioresource Technology*, 101(19), 7500-7509. doi:10.1016/j.bior-tech.2010.04.047
- [9] Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva, C. M., & Rosa, C. A. (2002b). Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 294-300.
- [10] Quintero, J., Montoya, M. I., Sánchez, O. J., Giraldo, O. H., & Cardona, C. A. (2008). Fuel ethanol production from sugarcane and corn : Comparative analysis for a Colombian case. *Energy*, 33, 385-399. doi:10.1016/j.energy.2007.10.001
- [11] Jayani, R. S., Saxena, S., & Gupta, R. (2005). Microbial pectinolytic enzymes: A review. *Process Biochemistry*, 40(9), 2931-2944. doi:10.1016/j.procbio.2005.03.026
- [12] Merín, M. G., Mendoza, L. M., Farías, M. E., & Morata de Ambrosini, V. I. (2011). Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active

- pectinolytic activity. *International Journal of Food Microbiology*, 147(2), 144-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.004
- [13] Chatzifragkou, A., Makri, A., Belka, A., Bellou, S., Mavrou, M., Mastoridou, M., Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological conversions of biodiesel derived waste glycerol by yeast and fungal species. *Energy*, 36(2), 1097-1108. doi:10.1016/j.energy.2010.11.040
- [14] Yoshikawa, J., Habe, H., Morita, T., Fukuoka, T., Imura, T., Iwabuchi, H., ... Kitamoto, D. (2014). Production of mannitol from raw glycerol by *Candida azyma*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117(6), 725-9. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.11.016
- [15] Vanegas, isleny A., Yepes, M. del Socorro, & Duque, C. M. (2004). Search of colombian yeasts stocks producing xilitol. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 2(1), 27-32.
- [16] Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C. D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., & Paparella, A. (2014). Traditional fermented foods and beverages from a microbiological and nutritional perspective: The colombian heritage. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 1031-1048. doi:10.1111/1541-4337.12098
- [17] Kashyap, D., Vohra, P., Chopra, S., & Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technol*, 215-227.
- [18] Whitaker JR. 1984. Pectic substances, pectic enzymes and haze formation in fruit juices. *Enzyme Microb Technol* 6:341-349.
- [19] P. Blanco, C. Sieiro, and T. G. Villa, "Production of pectic enzymes in yeasts," *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 175, No. 1, pp. 1-9, Jun. 1999.
- [20] Jia, J. and A. Wheals. 2000. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*. *Curr. Genet.* 38:264-270.
- [21] J. Barnett, R. Payne, and D. Yarrow, *Yeasts: Characteristics and identification.*, 3rd Editio. Cambridge University Press, 2000.
- [22] B. S. Luh and H. J. Phaff, "Studies on polygalacturonase of certain yeasts," *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 33, No. 2, pp. 212-227, Sep. 1951.
- [23] S. Gognies, A. Gainvors, M. Aigle, and A. Belarbi, "Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (PGL1)," *Yeast*, No. July, 1999.
- [24] P. Blanco and C. Sieiro, "Cloning, molecular characterization, and expression of an endo-polygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b," *FEMS Microbiol. ...*, Vol. 164, pp. 249-255, 1998.

- [25] B. Divol and P. van Rensburg, "PGU1 gene natural deletion is responsible for the absence of endo-polygalacturonase activity in some wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*," *FEMS Yeast Res.*, Vol. 7, No. 8, pp. 1328-39, Dec. 2007.
- [26] P. Alimardani-Theuil, A. Gainvors-Claisse, and F. Duchiron, "Yeasts: An attractive source of pectinases—From gene expression to potential applications: A review," *Process Biochem.*, Vol. 46, No. 8, pp. 1525-1537, Aug. 2011.
- [27] M. Fernández-González, J. F. Ubeda, T. G. Vasudevan, R. R. Cordero Otero, and A. I. Briones, "Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains," *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 237, No. 2, pp. 261-6, Aug. 2004.
- [28] F. Radoi, M. Kishida, and H. Kawasaki, "Characteristics of wines made by *Saccharomyces* mutants which produce a polygalacturonase under wine-making conditions," *Biosci. Biotechnol. ...*, Vol. 69, No. 11, pp. 2224-2226, 2005.
- [29] M. Martos, E. R. Zubreski, O. Garro, and R. Hours, "Production of Pectinolytic Enzymes by the Yeast *Wickerhamomyces anomalus* Isolated from Citrus Fruits Peels," *Biotechnol. Res. Int.*, Vol. 2013, pp. 1-7, 2013.
- [30] P. Blanco, C. Sieiro, A. Díaz, and T. G. Villa, "Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*," *Can. J. Microbiol.*, Vol. 40, No. 11, pp. 974-977, Nov. 1994.
- [31] B. S. Luh and H. J. Phaff, "Properties of yeast polygalacturonase," *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 48, No. 1, pp. 23-37, Jan. 1954.
- [32] P. Blanco, C. Sieiro, and T. G. Villa, "Production of pectic enzymes in yeasts," *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 175, No. 1, pp. 1-9, Jun. 1999.
- [33] E. G. da Silva, M. de F. Borges, C. Medina, R. H. Piccoli, and R. F. Schwan, "Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits," *FEMS Yeast Res.*, Vol. 5, No. 9, pp. 859-865, Jun. 2005.
- [34] I. Alkorta, C. Garbisu, M. J. Llama, and J. L. Serra, "Industrial applications of pectic enzymes: a review," *Process Biochem.*, Vol. 33, No. 1, pp. 21-28, Jan. 1998.
- [35] W. Masoud and L. Jespersen, "Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa," *Int. J. Food Microbiol.*, Vol. 110, No. 3, pp. 291-296, Aug. 2006.
- [36] C. Sieiro, A. da Silva, and B. García-Fraga, *Microbial pectic enzymes in the food and wine industry*. 2012, pp. 202-218.
- [37] P. Blanco, C. Sieiro, A. Díaz, N. M. Reboredo, and T. G. Villa, "Grape juice biodegradation by polygalacturonases from *Saccharomyces cerevisiae*," *Int. Biodeterior. Biodegradation*, Vol. 40, No. 2-4, pp. 115-118, 1997.
- [38] V. Lionetti, F. Cervone, and D. Bellincampi, "Methyl esterification of pectin plays a role during plant-pathogen interactions and affects plant resistance to diseases," *J. Plant Physiol.*, Vol. 169, No. 16, pp. 1623-1630, Nov. 2012.

- [39] B. L. Ridley, M. A. O'Neill, and D. Mohnen, signaling, Vol. 57. 2001, pp. 929-967.
- [40] H. Sharma, H. Patel, and S. Sharma, "Enzymatic extraction and clarification of juice from various fruits-A review," Trends Post Harvest Technol., Vol. 2, No. 1, pp. 1-14, 2014.
- [41] J. An, L. Zhang, M. A. O'Neill, P. Albersheim, and A. G. Darvill, "Isolation and structural characterization of endo-rhamnogalacturonase-generated fragments of the backbone of rhamnogalacturonan I," Carbohydr. Res., Vol. 264, No. 1, pp. 83-96, nov. 1994.
- [42] S. Saxena, "Microbial Enzymes and Their Industrial Applications," in Applied Microbiology SE - 9, Springer India, 2015, pp. 121-154.
- [43] N. Sharma, M. Rathore, and M. Sharma, "Microbial pectinase: sources, characterization and applications," Rev. Environ. Sci. Bio/Technology, Vol. 12, No. 1, pp. 45-60, Apr. 2012.
- [44] N. Martin, S. R. De Souza, R. Silva, and E. Gomes, "Biology and Technology Pectinase Production by Fungal Strains in Solid-State Fermentation Using Agro-Industrial Bioproduct," Brazilian Arch. Biol. Technol., Vol. 47, pp. 813-819, 2004.
- [45] Pretorius Is. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. Yeast 16: 675-729.
- [46] Arioli X. 1996. Une souche de levure pour les vins rouges de la Vallée du Rhône. Le Vigneron 8: 9-11.
- [47] Lemaresquier H, Gainvors A, Lequart C, Charlemagne B, Frezier V, Belarbi A. 1995. Sélection de levures œnologiques à activité clarifiante. Rev Fr d'œnologie 154:23-29.
- [48] Servili M, Begliomini AI, Montedoro G, Petruccioli M, Federici F. 1992. Utilization of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. J. Sci. Food Agric 58:253-260.
- [49] Schwan Rf, Cooper Rm, Wheals Ae. 1997. Endopolygalacturonase secretion by *Kluyveromyces marxianus* and other cocoa pulp-degrading yeasts. Enzyme Microb Technol 21:234-244.
- [50] Masoud W, Jespersen L. 2006. Pectin degrading enzymes in yeasts involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa. Int J Food Microbiol 110:291-296.
- [51] Masoud W, Kaltoft Ch. 2006. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. Int J Food Microbiol 106:229-234.
- [52] Horikoshi K (1990) Enzymes of alkalophiles. In: Fogarty WM, Kelly CT (eds) Microbial enzymes and biotechnology, 2nd edn. Elsevier Applied Science, London, pp 275-294.

- [53] Reid I, Ricard M (2000) Pectinase in paper making: solving retention problems in mechanical pulp, bleached with hydrogen peroxide. *Enzyme Microb Technol* 26:115-123.
- [54] Jayani Rs, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* 40: 2931-2944.
- [55] Tanabe H, Kobayashi Y, Akamatsu I (1986) Pretreatment of pectic wastewater from orange canning by soft-rot *Erwinia carotovora*. *J Ferment Technol* 64: 265-268.
- [56] Carrera, J. E. (2003). Produccion y aplicacion de enzimas industriales. Facultad de Ciencias Agropecuarias, 10-15.
- [57] Singh, S. A., & M Ramakrishna, A. A. (1999). Optimisation of downstream processing parameters for the recovery of pectinase from the fermented bran of *Aspergillus carbonarius*. *Process Biochemistry*, 411-417.
- [58] Castilho, L. R., Medronho, R. A., & Alves, T. L. (2000). Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 45-50.
- [59] García Cevallos, G., & Chafra Guamán, A. (10 de 02 de 2015). Escuela politecnica superior del litoral. Obtenido de Facultad de Ingeniería Mecanica y Ciencias de la produccion: <https://www.dspace.espol.edu.ec/retrieve/88508/D-88056.pdf>
- [60] Asohofrucol. (2014). Plan de inversion hortifruticula para 2014. *Frutas & Hortalizas*, 33, 10-11. Retrieved from <http://www.asohofrucol.com.co/archivos/Revista/Revista 33.pdf>
- [61] Alwakeel, S. S. (2013). Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20(4), 311-317. doi:10.1016/j.sjbs.2013.05.002
- [62] Granada Aguirre, Luis Felipe. (2005). El alcohol carburante: un proyecto con un futuro ambiental, económico y social incierto. *Entramado [en línea]* 2005, 1 (Enero-Junio) : [Fecha de consulta: 15 de enero de 2019] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265421067004>> ISSN 1900-3803
- [63] Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study*, Vol.2 (5th ed.). San Diego: Elsevier.
- [64] Osorio-Cadavid, E., Ramirez, M., López, A., & Mambuscay, L. (2009). Standardising a simple protocol for extracting yeast from genomic DNA. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 125-131.
- [65] Odum, E. (1971). *Fundamentals of Ecology*. (H. B/Holt/Saunders, Ed.) (3rd ed.). Philadelphia: Saunders College.
- [66] Miller, G. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytic Chemistry*, 426-428.

- [67] Rodrigo Q. Oliveira, Carlos A. Rosa, Ana Paula T. Uetanabaro, Antônio Azeredo, Aristóteles Góes Neto & Sandra A. Assis (2009). Polygalacturonase secreted by yeasts from Brazilian semi-arid environments, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60: sup7, 72-80, DOI: 10.1080/09637480802534517
- [68] Martin, N. Souza, S. Silva, R. & Eleni, G. (2004). Pectinase production by fungal strains in solid-state fermentation using agroindustrial bioproduct. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47(5), 813-819. <https://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132004000500018>
- [69] Nisiotou, a. a., & Nychas, G.-J. E. (2008). *Kazachstania hellenica* sp. nov., a novel ascomycetous yeast from a Botrytis-affected grape must fermentation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1263-1267. doi:10.1099/ijs.0.65649-0
- [70] van Breda, V., Jolly, N., & van Wyk, J. (2013). Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2-3), 80-88. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.011
- [71] Wrent, P., Rivas, E. M., Gil de Prado, E., Peinado, J. M., & de Silóniz, M. I. (2014). *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*. (C. A. B. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello, Ed.). Oxford: Academic Press. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00081-1>
- [72] Pulcrano, G., Iula, D. V., Vollaro, A., Tucci, A., Cerullo, M., Esposito, M., Catania, M. R. (2013). Rapid and reliable MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Candida non-albicans* isolates from bloodstream infections. *Journal of Microbiological Methods*, 94(3), 262-266. doi:10.1016/j.mimet.2013.07.001
- [73] Tsiodras, S., Papageorgiou, S., Meletiadis, J., Tofas, P., Pappa, V., Panayiotides, J., ... Petrikos, G. (2014). *Rhodotorula mucilaginosa* associated meningitis: A subacute entity with high mortality. Case report and review. *Medical Mycology Case Reports*, 6, 46-50. doi:10.1016/j.mmcr.2014.08.006
- [74] Molina-Leyva, A., Ruiz-Carrascosa, J. C., Leyva-Garcia, A., & Husein-Elahmed, H. (2013). Cutaneous *Cryptococcus laurentii* infection in an immunocompetent child. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 17(12), e1232-3. doi:10.1016/j.ijid.2013.04.017
- [75] Neves, R. P., de Lima Neto, R. G., Leite, M. C., da Silva, V. K. A., Dos Santos, F. D. A. G., & Macêdo, D. P. C. (2015). *Cryptococcus laurentii* fungaemia in a cervical cancer patient. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases : An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 9(6), 660-663. doi:10.1016/j.bjid.2015.06.014
- [76] Shang, S.-T., Lin, J.-C., Ho, S.-J., Yang, Y.-S., Chang, F.-Y., & Wang, N.-C. (2010). The emerging life-threatening opportunistic fungal pathogen *Kodamaea ohmeri*: optimal treatment and literature review. *Journal of Microbiology, Immunology,*

- and Infection. *Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 43(3), 200-206. doi:10.1016/S1684-1182(10)60032-1
- [77] Mokhtari, M., Etebarian, H. R., Razavi, M., Heydari, A., & Mirhendi, H. (2012). Identification of Yeasts Isolated from Varieties of Apples and Citrus Using PCR-Fragment Size Polymorphism and Sequencing of ITS1-5.8S-ITS2 region. *Food Biotechnology*, 26(3), 252-265. doi:10.1080/08905436.2012.698771
- [78] Maciel, N. O. P., Piló, F. B., Freitas, L. F. D., Gomes, F. C. O., Johann, S., Nardi, R. M. D., Rosa, C. a. (2013). The diversity and antifungal susceptibility of the yeasts isolated from coconut water and reconstituted fruit juices in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 201-205. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.012
- [79] Distasi, M. a., Del Gaudio, T., Pellegrino, G., Pirronti, a., Passera, M., & Farina, C. (2015). Fungemia due to *Kodamaea ohmeri*: First isolating in Italy. Case report and review of literature. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 25(4), 310-316. doi:10.1016/j.mycmed.2015.08.002
- [80] Trindade, R. C., Resende, M. A., Silva, C. M., & Rosa, C. A. (2002b). Yeasts Associated with Fresh and Frozen Pulps. *Systematic and Applied Microbiology*, 25, 294-300.
- [81] L. Corte, R. Cagno, M. Groenewald, L. Roscini, M. Gobbetti, and G. Cardinali, "Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains," *Food Microbiol.*, vol. 48, pp. 206-215, 2015.
- [82] Fu, S.-F., Sun, P.-F., Lu, H.-Y., Wei, J.-Y., Xiao, H.-S., Fang, W.-T., ... Chou, J.-Y. (2016). Plant growth-promoting traits of yeasts isolated from the phyllosphere and rhizosphere of *Drosera spatulata* Lab. *Fungal Biology*, 1-16. doi:10.1016/j.funbio.2015.12.006
- [83] Nutaratat, P., Srisuk, N., Arunrattiyakorn, P., & Limtong, S. (2014). Plant growth-promoting traits of epiphytic and endophytic yeasts isolated from rice and sugar cane leaves in Thailand. *Fungal Biology*, 118(8), 683-694. doi:10.1016/j.funbio.2014.04.010
- [84] Fracchia, S., Godeas, a., Scervino, J. M., Sampedro, I., Ocampo, J. a., & García-Romera, I. (2003). Interaction between the soil yeast *Rhodotorula mucilaginosa* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* and *Gigaspora rosea*. *Soil Biology and Biochemistry*, 35(5), 701-707. doi:10.1016/S0038-0717(03)00086-5
- [85] Renker, C., Blanke, V., Borstler, B., Heinrichs, J., & Buscot, F. (2004). Diversity of and yeasts (Basidiomycota) inhabiting arbuscular mycorrhizal roots or spores. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 597-603. doi:10.1016/j.femsyr.2004.01.001
- [86] Chang, C.-F., Lee, C.-F., Lin, K.-Y., & Liu, S.-M. (2016). Diversity of yeasts associated with the sea surface microlayer and underlying water along the northern coast of Taiwan. *Research in Microbiology*, 167(1), 35-45. doi:10.1016/j.resmic.2015.08.005

- [87] Sperandio, E. M., Martins do Vale, H. M., & Moreira, G. A. M. (2015). Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. *Fungal Biology*, 119(July), 1-10. doi:10.1016/j.funbio.2015.06.011
- [88] Mahunu, G. K., Zhang, H., Yang, Q., Zhang, X., Li, D., & Zhou, Y. (2016). Improving the biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* with phytic acid against postharvest blue mold and natural decay in apples. *Biological Control*, 92, 172-180. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.10.012
- [89] Zhang, D., Spadaro, D., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2011). Potential biocontrol activity of a strain of *Pichia guilliermondii* against grey mold of apples and its possible modes of action. *Biological Control*, 57(3), 193-201. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.02.011
- [90] Zhou, Y., Deng, L., & Zeng, K. (2014). Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia membranaefaciens* by hot water treatment in postharvest diseases of citrus fruit. *Crop Protection*, 63, 89-96. doi:10.1016/j.cropro.2014.05.015
- [91] Zhou, Y., Ming, J., Deng, L., & Zeng, K. (2014). Effect of *Pichia membranaefaciens* in combination with salicylic acid on postharvest blue and green mold decay in citrus fruits. *Biological Control*. doi:10.1016/j.biocontrol.2014.03.007
- [92] Aloui, H., Licciardello, F., Khwaldia, K., Hamdi, M., & Restuccia, C. (2015). Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *International Journal of Food Microbiology*, 200, 22-30. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.015
- [93] Oro, L., Feliziani, E., Ciani, M., Romanazzi, G., & Comitini, F. (2014). Biocontrol of postharvest brown rot of sweet cherries by *Saccharomyces cerevisiae* Disva 599, *Metschnikowia pulcherrima* Disva 267 and *Wickerhamomyces anomalus* Disva 2 strains. *Postharvest Biology and Technology*, 96, 64-68. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.05.011
- [94] Qin, X., Xiao, H., Xue, C., Yu, Z., Yang, R., Cai, Z., & Si, L. (2015). Biocontrol of gray mold in grapes with the yeast *Hanseniaspora uvarum* alone and in combination with salicylic acid or sodium bicarbonate. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 160-167. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.09.010
- [95] Cai, Z., Yang, R., Xiao, H., Qin, X., & Si, L. (2015). Effect of preharvest application of *Hanseniaspora uvarum* on postharvest diseases in strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 100, 52-58. doi:10.1016/j.postharvbio.2014.09.004
- [96] Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J. a., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2011). Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control*, 22(5), 662-667. doi:10.1016/j.foodcont.2010.07.025

- [97] Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 231-238. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025
- [98] Batista, N. N., Ramos, C. L., Ribeiro, D. D., Pinheiro, A. C. M., & Schwan, R. F. (2015). Dynamic behavior of *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia kluyveri* and *Hanseniaspora uvarum* during spontaneous and inoculated cocoa fermentations and their effect on sensory characteristics of chocolate. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 221-227. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.051
- [99] Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O. S., Daniel, H. M., & De Vuyst, L. (2013). *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa. *Food Microbiology*, 35(2), 73-85. doi:10.1016/j.fm.2013.02.015
- [100] Poondla, V., Bandikari, R., Subramanyam, R., & Reddy Obulam, V. S. (2015). Low temperature active pectinases production by *Saccharomyces cerevisiae* isolate and their characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(1), 70-76. doi:10.1016/j.bcab.2014.09.008
- [101] Gonçalves, D. B., Batista, a. F., Rodrigues, M. Q. R. B., Nogueira, K. M. V, & Santos, V. L. (2013). Ethanol production from macaúba (*Acrocomia aculeata*) presscake hemicellulosic hydrolysate by *Candida boidinii* UFMG14. *Bioresource Technology*, 146, 261-266. doi:10.1016/j.biortech.2013.07.075

Capítulo III. Los hongos como determinantes de la calidad alimentaria

- [1] M. Sánchez-hervás, J. V Gil, F. Bisbal, D. Ramón, and P. V Martínez-culebras, "International Journal of Food Microbiology Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans," *Mycobiota mycotoxin Prod. fungi from cocoa beans M.*, vol. 125, pp. 336-340, 2008.
- [2] R. A. Stein and A. E. Bulboac[], "Mycotoxins," in *Foodborne Diseases*, (Third edi., C. E. R. Dodd, T. Aldsworth, R. A. Stein, D. O. Cliver, and H. P. B. T.-F. D. (Third E. Riemann, Eds. Academic Press, 2017, pp. 407-446.
- [3] J. Stroka and C. Gonçalves, "Mycotoxins in Food and Feed: An Overview," L. Melton, F. Shahidi, and P. B. T.-E. of F. C. Varelis, Eds. Oxford: Academic Press, 2019, pp. 401-419.
- [4] M. V Copetti, B. T. Iamanaka, J. L. Pereira, M. H. Fungaro, and M. H. Taniwaki, "Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 148, no. 2, pp. 141-144, 2011.

- [5] N. Ramos *et al.*, "Evaluación de ocratoxina a en *Theobroma cacao* durante el proceso de cosecha. Ochratoxin a evaluation in *Theobroma cacao* L.," *Rev Soc Quím Perú*, vol. 82, no. 4, pp. 431-439, 2017.
- [6] A. M. Khaneghah, Y. Fakhri, S. Raeisi, B. Armoon, and A. S. S. Ana, "Prevalence and concentration of ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol and total aflatoxin in cereal-based products: A systematic review and meta-analysis," *Food Chem. Toxicol.*, pp. 830-848, 2018.
- [7] S. Marín, A. J. Ramos, and V. Sanchis, "Mycotoxins : Occurrence , toxicology , and exposure assessment," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 60, pp. 218-237, 2013.
- [8] B. S. Kharayat and Y. Singh, "Chapter 13 - Mycotoxins in Foods: Mycotoxicoses, Detection, and Management," in *Handbook of Food Bioengineering*, A. M. Holban and A. M. B. T.-M. C. and F. D. Grumezescu, Eds. Academic Press, 2018, pp. 395-421.
- [9] H. A. Serrano-coll, N. Cardona-Castro, and P. Claves, "Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos," *Rev. CES Med.*, vol. 29, no. 1, pp. 143-152, 2015.
- [10] A. Coulibaly, K. Dagnogo, D. Sidibe, N. Silue, A. Dembele, and G. H. Biego, "Daily Intake of Aflatoxins from Cocoa (*Theobroma cacao*). Product in Cote Daily Intake of Aflatoxins from Cocoa (*Theobroma cacao*) Product in Cote D'ivoire," *Int. J. Sci. Res.*, vol. 5, no. 5, pp. 1517-1522, 2016.
- [11] J. Cui, J. Wang, S. Huang, X. Jiang, Y. Li, and W. Wu, "Experimental and Toxicologic Pathology Sterigmatocystin induced apoptosis in human pulmonary cells in vitro," *Exp. Toxicol. Pathol.*, no. 215, pp. 0-1, 2017.
- [12] W. Gao *et al.*, "Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage," *Toxicol. Vitro*, vol. 29, no. 1, pp. 1-7, 2015.
- [13] H. Díaz, A. M. Granero, and M. A. Zon, "Sterigmatocystin: A mycotoxin to be seriously considered César," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 118, 2018.
- [14] E. Cendoya, M. L. Chiotta, V. Zchetti, S. N. Chulze, and M. L. Ramirez, "Fumonisin and fumonisin-producing *Fusarium* occurrence in wheat and wheat by products: A review," *J. Cereal Sci.*, vol. 80, pp. 158-166, 2018.
- [15] C. Terciolo, M. Maresca, P. Pinton, and I. P. Oswald, "Review article: Role of satiety hormones in anorexia induction by *Trichothecene mycotoxins*," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 121, pp. 701-714, 2018.
- [16] Trade Map, "Trade statistics for international business development," 2017. [Online]. Available: <http://www.trademap.org/Index.aspx> . [Accessed: 10-Jul-2017].

- [17] O. Sounigo, R. Umaharan, Y. Christopher, A. Sankar, and S. Ramdahin, "Assessing the genetic diversity in the International Cocoa Genebank, Trinidad (ICG , T) using isozyme electrophoresis and RAPD," *Genet. Resour. Crop Evol.*, pp. 1111-1120, 2005.
- [18] ICCO, "ICCO Quarterly Bulletin of Cocoa Statistics," 2017. [Online]. Available: <https://www.icco.org/about-us/icco-news/372-may-2017-quarterly-bulletin-of-cocoa-statistics.html>. [Accessed: 01-Jul-2017].
- [19] Fedecacao, "Federación Nacional de Cacaoteros," 2017. [Online]. Available: <http://www.fedecacao.com.co/portal/index.php/es/>.
- [20] I. da Veiga Moreira, M. G. da Cruz, W. Ferreira, D. Ribeiro, and R. Freitas, "Microbial succession and the dynamics of metabolites and sugars during the fermentation of three different cocoa (*Theobroma cacao* L.) hybrids," *Food Res. Int. J.*, vol. 54, no. 1, pp. 9-17, 2013.
- [21] L. de Vuyst and S. Weckx, "The cocoa bean fermentation process : from ecosystem analysis to starter culture development," pp. 5-17, 2016.
- [22] D. Kadow, N. Niemenak, S. Rohn, and R. Lieberei, "Fermentation-like incubation of cocoa seeds (*Theobroma cacao* L.) - Reconstruction and guidance of the fermentation process," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 62, no. 1, Part 1, pp. 357-361, 2015.
- [23] G. De Marín, D. Muñoz, E. Márquez, G. Figueroa, and J. Maza, *Identification of Fungi with Potential Micotoxigenic in Fish Meals Used for Preparation*, vol. XXI, no. 3. 2011.
- [24] H. . Barnett and B. B. Hunter, *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*, 4th Editio. St. Paul Minnesota, USA: APS Press, 1998.
- [25] S. I. Cuervo-Maldonado, J. C. Gómez-Rincón, P. Rivas, and F. Orlando Guevara, "Actualización en Aspergilosis con énfasis en Aspergilosis invasora," *Infectio*, vol. 14, pp. 131-144, 2010.
- [26] A. Abdel-Azeem, F. . Salem, M. Abdel-Azeem, N. Nafady, M. T. Mohesien, and E. Soliman, "Biodiversity of the Genus *Aspergillus* in Different Habitats," in *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, V. K. Gupta, Ed. Elsevier, 2016, pp. 3-28.
- [27] M. L. Castrillo, M. I. Fonseca, G. A. Bich, G. Jerke, and M. A. Horianski, "Taxonomy and phylogenetic analysis of *Aspergillus* section *Nigri* isolated from yerba mate in misiones (Argentina)," *J. Basic Appl. Genet.* |, vol. 23, no. 2, pp. 19-27, 1852.
- [28] A. J. Ramos, N. Labernia, S. Mariñn, V. Sanchis, and N. Magan, "Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 133-140, 1998.

- [29] M. V Copetti, J. L. Pereira, B. T. Iamanaka, J. I. Pitt, and M. H. Taniwaki, "Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 143, no. 1, pp. 67-70, 2010.
- [30] M. Gilmour and M. Lindblom, "Buy PDF-Management of ochratoxin A in the cocoa supply chain a summary of work by the Caobisco_ECA_FCC working group on ochratoxin A," *Mycotoxins Detect. Methods, Manag. Ic Heal. Agric.*, pp. 241-243, 2008.
- [31] H. Hamajima, H. Matsunaga, A. Fujikawa, T. Sato, and S. Mitsutake, "Japanese traditional dietary fungus koji *Aspergillus oryzae* functions as a prebiotic for *Blautia coccooides* through glycosylceramide : Japanese dietary fungus koji is a new prebiotic," *Springerplus*, vol. 5, no. 1, p. 1321, 2016.
- [32] S. Amaike and N. P. Keller, "Aspergillus flavus," *Annu. Rev. Phytopathol.*, vol. 49, no. 1, pp. 107-133, Aug. 2011.
- [33] J. Casquero, F. Urcia, and E. Sánchez, "Native antigen of *Aspergillus fumigatus* with useful for," *Rev Peru Med Exp Salud Publica.*, vol. 26, no. 2, pp. 5-9, 2009.
- [34] S. M. Nieminen *et al.*, "Isolation and Identification of *Aspergillus fumigatus* mycotoxins on growth medium and Some Building Materials," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 10, pp. 4871-4875, 2002.
- [35] G. Szakács, G. Morovján, and R. P. Tengerdy, "Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*," *Biotechnol. Lett.*, vol. 20, no. 4, pp. 411-415, 1998.
- [36] M. . D'Halewyn, "Institut national de santé publique Quebec. Quebec Canadá. Mould compendium," 2018.
- [37] R. Geisen, M. Schmidt-Heydt, N. Touhami, and A. Himmelsbach, "New aspects of ochratoxin A and citrinin biosynthesis in *Penicillium*," *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 23, pp. 23-31, 2018.
- [38] C. Evans, A. S. A. M. Son, and L. Benny, "On the taxonomy of *Monilia roleri* , an important pathogen of *Theobroma cacao* in South America," *Can. J. Bot.*, vol. 56, no. 20, pp. 2528-2532, 1978.
- [39] J. A. Correa, S. C. Martínez, and J. Coy, "Estado de la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roleri* en Colombia," *Acta Agron*, vol. 63, no. 4, pp. 388-399, 2014.
- [40] G. E. Harman, C. R. Howell, A. Viterbo, I. Chet, and M. Lorito, "Trichoderma species — opportunistic, avirulent plant symbionts," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 2, p. 43, Jan. 2004.
- [41] M. Torres-De la Cruz *et al.*, "Diversidad de Trichoderma en el agroecosistema cacao del estado de Tabasco, México," *Rev. Mex. Biodivers.*, vol. 86, no. 4, pp. 947-961, 2015.

- [42] A. Naude and W. Nicol, "Malic acid production through the whole-cell hydration of fumaric acid with immobilised *Rhizopus oryzae*," *Biochem. Eng. J.*, vol. 137, pp. 152-161, 2018.
- [43] M. Wang, F. Liu, C. PW, and L. Cai, "Phylogenetic reassessment of *Nigrospora*: ubiquitous endophytes, plant and human pathogens," *Persoonia*, 2017. [Online]. Available: <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=1468261600000061&Rec=50078&Fields=All>.
- [44] P. Kirk, "Nigrospora sphaerica," *IMI Descr. Fungi Bact.*, vol. 1056, pp. 1-2, 1991.
- [45] M. Sánchez-Hervás, J. V Gil, F. Bisbal, D. Ramón, and P. V Martínez-Culebras, "Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans," *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 125, no. 3, pp. 336-340, 2008.

Capítulo IV. Biodegradación de un colorante AZO por una cepa de levadura *Galactomyces geotrichum* L-80.

- [1] Cámara de comercio de Bogotá, Programa de transformación productiva. (2018). Evaluación del plan de negocio y definición de la visión estratégica para el sector textil y confección. Visitado 18/10/2018. Disponible <https://bibliotecadigital.ccb.org.co/handle/11520/14059>
- [2] Van der Zee FP. (2002). *Anaerobic azo dye reduction*. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Ambientales. Wageningen University, The Netherlands, pp. 142.
- [3] Sultana MS, Islam MS, Saha R, Al-Mansur M. (2009). Impact of the effluents of textile dyeing industries on the surface water quality inside DND embankment, Narayanganj. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 44: 65-80.
- [4] Islam M, Chowdhury M, Billah M, Tusher T, Sultana N. (2012). Investigation of effluent quality discharged from the textile industry of Purbani group, Gazipur, Bangladesh and its management. *Bangladesh Journal of Environmental Science*, 23: 123-130.
- [5] Weisburger JH. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research*, 506-507: 9-20.
- [6] Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. (1996). Microbial decolorization of textile-dye containing effluents: a review. *Bioresource Technology*, 58: 217-227.
- [7] Saratale, R. G.; Saratale, G. D.; Chang, J. S; Govindwar, S.P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42: 138-157.
- [8] Jadhav SU, Kalme SD, Govindwar SP. (2008). Biodegradation of methyl red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62: 135-142.

Capítulo V. Evaluación del efecto antifúngico de aceites esenciales encapsulados durante el crecimiento *in vitro* de *Penicillium digitatum*

- [1] Dantigny, P, Guilmart, A., & Bensoussan, M. (2005). Basis of predictive mycology. *International Journal of Food Microbiology*, 100(1–3), 187–196. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.013>
- [2] C. P. P. Carvalho, C. Nunes, and L. Palou, “Control de enfermedades de poscosecha,” in *Cultivo, Poscosecha e Industrialización*, 1st ed., L. Garcés and C. P. Carvalho, Eds. Itagú-Colombia: Erie Lasallista Investigación y Ciencia. Ed. Artes y Letras S.A.S, 2012, pp. 285–305.
- [3] Lado, J., Pérez Faggiani, E., De Nigris, A., Dol, I., & Knochen, M. (2013). Residuos en frutos de naranja del fungicida Imazalil aplicado en postcosecha y su efecto en el control de moho verde. *Agrociencia Uruguay*, 17(2), 83–90.
- [4] Kouassi, K. H. S., Baji, M., & Jijakli, H. (2012). The control of postharvest blue and green molds of citrus in relation with essential oil-wax formulations, adherence and viscosity. *Postharvest Biology and Technology*, 73, 122–128. <http://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.06.008>
- [5] K. Laird and C. Phillips, “Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials?,” *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 54, no. 3, pp. 169–174, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2011.03190.x>
- [6] Grande-Tovar, C. D., Chaves-López, C., Viuda-Martos, M., Serio, A., Delgado-Ospina, J., Pérez-Álvarez, J. A., Paparella, A. (2016). Sublethal concentrations of Colombian *Austroeupeatorium inulifolium* (H.B.K.) essential oil and its effect on fungal growth and the production of enzymes. *Industrial Crops and Products*, 87, 315–323. <http://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.066>
- [7] Varona, S., Kareth, S., & Cocero, M. J. (2016). Encapsulation of essentials oils using biopolymers for their use in ecological agriculture. *Analysis*, 9000, 1–6.
- [8] Lewis, J. S. L., & Graybill, J. R. (2008). Fungicidal versus Fungistatic: what’s in a word ?, 927–936.
- [9] Chang, C. P., & Dobashi, T. (2003). Preparation of alginate complex capsules containing eucalyptus essential oil and its controlled release. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 257–262. <http://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2003.07.002>
- [10] Sadgrove, N., Greatrex, B., & Jones, G. L. (2015). β -Cyclodextrin encapsulation enhances antimicrobial activity of cineole - rich essential oils from Australian species of *Prostanthera* (Lamiaceae).
- [11] Li, J., Chang, J. W., Saenger, M., & Deering, A. (2017). Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. *Food Chemistry*, 232, 191–197. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.147>

- [12] Cevallos, P., & Alejandra, P. (2013). Estabilidad y propiedades fisicoquímicas de complejos de inclusión de β -ciclodextrinas y sus derivados, 254.
- [13] Houbraken, J., de Vries, R. P., & Samson, R. A. (2014). Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 86). Copyright © 2014 Elsevier Inc. All rights reserved. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>
- [14] Carrillo-Inungaray, M., Hidalgo-Morales, M., Rodríguez-Jimenes, G., García-Alvarado, M., Ramírez-Lepe, M., Munguía, A., & Robles-Olvera, V. (2014). Effect of Temperature, pH and water activity on *Penicillium digitatum* Growth. *Journal of Applied Mathematics and Physics*, 2(10), 930–937. <http://doi.org/10.4236/jamp.2014.210105>
- [15] Cuervo Mulet, R. A. (2010). *Manual de protocolos de microbiología general* (1st. ed.). Universidad San Buenaventura Cali.
- [16] Chranioti, C., & Tzia, C. (2014). Arabic Gum Mixtures as Encapsulating Agents of Freeze-Dried Fennel Oleoresin Products. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), 1057–1065. <http://doi.org/10.1007/s11947-013-1074-z>
- [17] Chranioti, C., & Tzia, C. (2016). Encapsulation of fennel essential oil using freeze-drying method: evaluation of process and quality characteristics of the encapsulated products.
- [18] Kaul, P. N., Bhattacharya, A. K., Rao, B. R. R., Syamasundar, K. V, & Ramesh, S. (2003). Volatile constituents of essential oils isolated from different parts of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum* Blume), 55(September 2002), 53–55. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1277>
- [19] Andreatta, M. (2010). Caracterización de aceites esenciales del departamento San Justo (Córdoba). *idtq-unc; plapiqui-uns-conicet*.
- [20] Singh, R., & Bharti, N. (2010). Characterization of cyclodextrin inclusion complexes. *A Review. Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2(3), 171–183. Retrieved from <http://www.onlinepharmacytech.info/docs/vol2issue3/JPST10-02-03-03.pdf>
- [21] Galmarini, M. V., Zamora, M. C., Baby, R., Chirife, J., & Mesina, V. (2008). Aromatic profiles of spray-dried encapsulated orange flavours: Influence of matrix composition on the aroma retention evaluated by sensory analysis and electronic nose techniques. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(9), 1569–1576. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2007.01592.x>
- [22] Chang, H., Cheng, Y., Wu, C., & Chang, S. (2008). Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. Formosana Florin leaf against plant pathogenic fungi, 99, 6266–6270. doi:10.1016/j.biortech.2007.12.005

- [23] J. Safaei-Ghomi and A. A. Ahd, "Antimicrobial and antifungal properties of the essential oil and methanol extracts of *Eucalyptus largiflorens* and *Eucalyptus intertexta*," *Pharmacogn. Mag.*, vol. 6, no. 23, pp. 172–175, 2010.
- [24] S. Shreaz et al., "Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents," *Fitoterapia*, vol. 112, pp. 116–131, 2016
- [25] Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2000). GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2576–2581. <http://doi.org/10.1021/jf990835x>
- [26] Bang, K.H.; D.W. Lee; H.M. Park & Y.H. Rhee. 2000. Inhibition of fungal cell wall synthesizing enzymes by trans-cinnamaldehyde. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64 (5): 1061–1063.
- [27] Nikkhah, M., Hashemi, M., Habibi Najafi, M. B., & Farhoosh, R. (2017). Synergistic effects of some essential oils against fungal spoilage on pear fruit. *International Journal of Food Microbiology*. <http://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.021>
- [28] Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal Agents : Mode of Action , Mechanisms of Resistance , and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance, 12(4), 501–517. <http://doi.org/10.1.1.322-6182>
- [29] Chaves-López, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 487–499. <http://doi.org/10.1111/jam.12847>.
- [30] Vilanova, X., & Casanovas, M. (1953). The Fungistatic and Fungicidal Activity of Vegetable Essential Oils and their Components, Vol. 20, No. 6, 447–454. <http://doi.org/10.1038/jid.1953.55>

Capítulo VI. Optimización de las condiciones de cultivo de la orellana *Pleurotus ostreatus* para incrementar la producción de lovastatina

- [1] Organización Mundial de la Salud (OMS). Enfermedades no transmisibles: Datos y cifras. (2015) mayo 12 2016, disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- [2] Istvan, E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. *Atherosclerosis Supplements*. 2003; 4: 3-8.
- [3] Ertürk, S., Önal A., and Cetin, S.M., Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors in biological samples. *Journal of Chromatography B*. 793 (2) pp. 193-205 (2003).

- [4] Food and Drug Administration (FDA), Consumer Health Information, (2014), abril 3, 2016 en línea. <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM293705.pdf>
- [5] Ravi, B., Renitta, R. E., Prabha, M. L., Issac, R., and Naidu, S., Evaluation of antidiabetic potential of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in alloxan-induced diabetic mice. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 35(1), pp.101-109 (2013).
- [6] Lindequist, U., Niedermeyer, THJ, Julich, WD. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid Based Complement Altern Med*; 2:285–99 (2005).
- [7] Schneider, I., Kressel, G., Meyer, A., Krings, U., Berger, R. G., y Hahn, A., Lipid lowering effects of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in humans. *Journal of Functional Foods*, 3(1), pp.17-24 (2011).
- [8] Farghaly, F.A., y Mostafa, E.M., Nutritional value and antioxidants in fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Journal of Advances in Biology* 7, pp. 1144 - 1152. (2015).
- [9] Parashare, V. M., Pal, S. C., and Bhandari, A. B., Antimicrobial and nutritional studies on *Agaricus bisporus* and *Pleurotus ostreatus*. *Acta Biológica Indica*, 2(1), pp.310-315 (2013).
- [10] Nunes, M. D., da Luz, J. M. R., Paes, S. A., Ribeiro, J. J. O., da Silva, M. D. C. S., and Kasuya, M. C. M., Nitrogen supplementation on the productivity and the chemical composition of oyster mushroom. *Journal of Food Research*, 1(2), pp.113-119 (2012).
- [11] Pedneault, K., Angers, P, Avis, T.J., Gosselin A, Russell J, and Tweddell RJ., Fatty acid profiles of polar and nonpolar lipids of *Pleurotus ostreatus* and *P. cornucopiae* var. "citrino-pileatus" grown at different temperatures. *Mycological Research III*: pp.1228- 1234 (2007).
- [12] Mostafa, E.M. and Farghaly, F.A., Bioactive compounds of fresh and dried *Pleurotus ostreatus* mushroom. *International Journal of Biotechnology for wellness Industries*, 3, pp. 4-14 (2014).
- Kong, F, Li, F.E., He, Z., Jiang, Y., Hao, R., Sun, X., and Tong, H., Anti-tumor and macrophage activation induced by alkali-extracted polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*. *International journal of biological macromolecules*, 69, pp. 561-566 (2014).
- [13] Nehra, K., Meenakshi, Kumar, M. y Yadav, A. Evaluation of antimicrobial potential of fruiting body extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom) *International Journal of Microbial Resource Technology*, 4, pp 391-400 (2012).
- [14] Gregori, A, Švagelj, M, Pohleven, J., Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus spp.* *Food Technol Biotechnol*; 45:238-49 (2007).

- [15] Choudhury, M., Rahman, T., Kakon, A., Hoque, N., Akhtaruzzaman, M., Begum, M., Choudhuri, M., and Hossain, M., Effects of *Pleurotus ostreatus* on Blood Pressure and Glycemic Status of Hypertensive Diabetic Male Volunteers. *Bangladesh Journal of Medical Biochemistry*, 6 (1), pp. 5-10 (2013).
- [16] Ismail, T. A., Soliman, M. M., Nassan, M. A., and Mohamed, D. I., Antihypercholesterolemic Effects of Mushroom, Chrysin, Curcumin and Omega-3 in Experimental Hypercholesterolemic Rats. *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(2), pp. 77-87 (2015).
- [17] Gunde-Cimerman, N., Friedrich, J., Cimerman, A., and Benicki, N., Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG-CoA reductase: production of mevioin by the fungi of the genus *Pleurotus*. *FEMS Microbiol Lett.*;11 pp. 203-206 (1993).
- [18] Hutchinson, C. R., Kennedy, J., Park, C., Kendrew, S., Auclair, K., and Vederas, J., Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78(3-4), pp. 287-295 (2000).
- [19] Gunde-Cimerman, N., and Cimerman, A., *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase-lovastatin. *Experimental Mycology*. 19 (1): pp.1-6 (1995).
- [20] Chen, S.Y., Ho, K.J., Hsieh, Y.J., Wang, L.T. and Mau, J.L., Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. *LWT-Food Science and Technology*, 47(2), pp.274-278 (2012).
- [21] Petruccioli M., Raviv M., Silvestro R.D., Dinelli G., (2011), Agriculture and agroindustrial wastes, by-products and wastewaters: origin, characteristics and potential in biobased-compounds production, in: comprehensive biotechnology. Vol 6: Environmental Biotechnology and Safety, Moo-Young M.. (Ed.), Elsevier Inc., NL, 531–545.
- [22] Bohórquez, A., Y. Puentes y J. Menjivar. 2014. Evaluación de la calidad del compost producido a partir de subproductos agroindustriales de caña de azúcar. *Cienc. Tecnol. Agropecu.* 15(1), 73-81. Doi: 10.21930/rcta.vol15_num1_art:398
- [23] ICONTEC (2006). Alimentos para animales, determinación de ceniza cruda-NTC 4648, Publicaciones ICONTEC, (Colombia).
- [24] AOAC International. 2003. Total dietary fiber in foods, enzymatic- Gravimetric method. In "Official Methods of Analysis of AOAC International". 17th ed. 985.29. William Horwitz ed. Gaithersburg, MD, U. S. A.
- [25] Alarcón J., Águila S., Arancibia-Avila P, Fuentes O., Zamorano-Ponce E., and Hernández M. (2003). Production and purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (basidiomycetes) strains. 62-64p. *Zeitschrift für Naturforschung C: A Journal of Biosciences*. 58c.

- [26] Álvarez P, Alvarado C, Puerto M, Schlumberger A, Jimenez L, De la Fuente M. (2006) Improvement of leukocyte functions in prematurely aging mice after five weeks of diet supplementation with polyphenol-rich cereals. *Nutrition*. [Epub ahead of print]. PMID:16809023.
- [27] AOAC, “Oficial methods of analysis”- Chemical and microbiological properties, 2 ed.
- [28] Anguera A. (2007). Efectos de la fibra soluble cáscaras de *Plantago ovata* sobre factores lipídicos de riesgo cardiovascular. [Tesis Doctoral en Nutrición y Metabolismo Unidad de Lípidos y Arteriosclerosis]. Reus. España. 205 p. Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Departamento de Medicina y Cirugía. Universidad Rovira I Virgili.
- [29] Aguilar, A.L; Lois, J. A; Herrera, H. D; Osorio, A; Sánchez, I. (2014). Obtención de fibra dietética nutricional a partir de bagazo de caña. Cartagena – Colombia. XXVII Congreso Internacional y Colombiano de Ingeniería Química.
- [30] Akyuz, M. y Kirbağ, S. (2010). Nutritive value of wild edible and cultured mushrooms. 34: 97-102. *Turk. J. Biol.*
- [31] Badu, M., Twumasi, S. y Boadi, N. (2011). Effects of lignocellulosic in wood used as substrate on the quality and yield of mushrooms. *Food and nutrition sciences*. 2: 780-784p.
- [32] Baena, A. (2005). Aprovechamiento del bagazo de maguey verde (*Agave salmiana*) de la agroindustria del mezcal en San Luis Potosi para la producción de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). México. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Posgrado en Ciencias Aplicadas.
- [33] Balanza de humedad | PCE Instruments (2017). n/a. Pce-instruments.com. Recuperado el 22 de marzo de 2017, de https://www.pce-instruments.com/espanol/balanza/balanza/balanza-de-humedad-kat_70122_1.htm
- [34] Bautista, M. (1997). Valor nutritivo de tres cepas mexicanas de *Pleurotus ostreatus* (tesis de doctorado). Monterrey, N.L., México. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- [35] Berrocal, M. (Sin fecha). Efectos de los residuos de la industria azucar-alcoholera, bagazo, cachaza y vinaza, en la producción de caña y azúcar en un vertisol de Guanacaste. *Agronomía Costarricense* 12(2):147-153. Recuperado el 16 de agosto de 2016.
- [36] Bohórquez, A., Puentes, Y., Menjivar, J. (2014). Evaluación de la calidad del compost producido a partir de subproductos agroindustriales de caña de azúcar. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), p.73. Recuperado el 12 de enero de 2017, de http://www.interciencia.org/v36_01/045.pdf.

- [37] Bonatti, M., Karnopp, P., Soares, H., & Furlan, S. (2004). Evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus sajorcaju* nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. 425-428p. Food Chemistry, 88(3).
- [38] Cardona, L.F. (2001). Anotaciones acerca de la bromatología y el cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. 99-119. p. Crónica Forestal y del Medio Ambiente, 16.
- [39] Chang, S., & Miles, P. (2004). Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact (1st ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
- [40] Chen, S.Y., Ho, K.J., Hsieh, Y.J., Wang, L.T. and Mau, J.L. (2012). Contents of lovastatin, γ -aminobutyric acid and ergothioneine in mushroom fruiting bodies and mycelia. 274-278p. LWT-Food Science and Technology, 47(2).
- [41] Ciappini, M., Gatti, B. y Lopez, M. (2004). *Pleurotus ostreatus*, una opción en el menú. Estudio sobre las gírgolas en la dieta diaria. 127-132p. Revista de la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano INVENIO.
- [42] Cortés, M., García, A., & Suárez, H. (2007) Fortificación de hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus*) con calcio, selenio y vitamina C. Scielo.unal.edu.co. Recuperado el 20 de abril de 2017, de http://www.scielo.unal.edu.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042007000100003&lng=pt&nrm.
- [43] Diplock, A., et al. (1999). Scientific Concepts of Functional Foods in Europe: Consensus Document. British Journal of Nutrition, 81(No 4): S1-S27.
- [44] El Tiempo. (2005). Orellanas, un negocio gourmet: Recuperado el 10 de Agosto de 2016 <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-1636895>
- [45] Endo, A. (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors» [El descubrimiento y el desarrollo de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa]. *Journal of Lipid Research* (en inglés) (Tokio, Japón: American Society for Biochemistry and Molecular Biology) 33 (11): 1569-1582. PMID 1464741.
- [46] Ertürk, S., Önal, A., & Cetin, S. (2003). Analytical methods for the quantitative determination of 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor in biological samples. 193-205.p. Journal of Chromatography B., 793 (2).
- [47] Fernandes, A., Barros, L., Martins, A., Herbert, P., & Ferreira, I. (2015). Caracterización nutricional de *Pleurotus ostreatus* (Jacq. Ex Fr.) P. Kumm. Producido utilizando trozos de papel como sustrato. 396-400p. Food Chemistry, 169.
- [48] Fernandez Buitrago, L. (2015). La Gran Época. Recuperado el 10 de Agosto de 2016, de la orellana, el hongo que puede convertirse en el alimento del futuro.: <http://www.lagranepoca.com/vida/37338-la-Orellana-el-hongo-que-puede-convertirse-en-el-alimento-del-futuro.html>
- [49] Flegg, P., Spencer, D. y Wood, D. (1987). The biology and technology of the cultivated mushroom. Editorial Wiley & Son; Gran Bretaña.

- [50] García de Marina, A. y del Castillo, B. (1988). Cromatografía Líquida de Alta Resolución. México. Ed. Limusa.
- [51] Garzon, J. y Cuervo, J. (2008). Produccion de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulosicos de diferente procedencia. 126-140p. Ciencias Biomedicas. 6(10).
- [52] Gerasimenya, V., Efremenkova, O., Kamzolkina, O., Bogush, T., Tolstych, I., & Zenkova, V. (2002). Antimicrobial and antitoxical action of edible and medicinal mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm. extracts, *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 4, pp. 48–54).
- [53] Gregori, A., Svageli, M., & Pohleven, J. (2007). Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus spp.* *Technol Biotechnol*, 45, 238-49. Recuperado el 10 de Agosto de 2016.
- [54] Guarín, J., & Ramírez, A. (2004). Estudio de factibilidad técnico-financiero de un cultivo de hongo *Pleurotus ostreatus* en Cundinamarca (tesis de pregrado). Bogotá, D.C., Colombia. Pontificia universidad Javeriana.
- [55] Gunde-Cinerman, N., & Cinerman, A. (1995). *Pleurotus* fruiting bodies contain the inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductasa - lovastatin. 1-6.p. *Experimental Mycology*, 19.
- [56] Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto, C., & Guzmán, L., (2008). El cultivo de los hongos comestibles con especial atención a las especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales (1st ed.). México D F, México: Instituto Politécnico Nacional.
- [57] Hadar, Y. y Cohen, E. (1886). Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. 1352-1354p. *Applied and environmental microbiology*; 51(6).
- [58] Hernández, R., & López, C. (2006). Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca (tesis de pregrado). Bogotá, D.C., Colombia. Pontificia universidad Javeriana.
- [59] Hoareau, W., Trindade, W., Siegmund, B., Castellan, A y Frollini, E. (2004). Sugarcane bagasse and curaua lignins oxidatized by chlorine dioxide and reacted with furfuryl alcohol: characterization and stability. *Polym. Degrad. Stab.* 86(3):567-576.
- [60] Jaramillo, D. I., Yepes, L. V., Hincapié, G. A., Velásquez, A. M., & Vélez, L. M. (2011). Desarrollo de productos a partir de la orellana (*Pleurotus ostreatus*). *Revista Investigaciones Aplicadas*, 5(2). Recuperado el 20 de abril de 2017, de <https://search.proquest.com/docview/1328115457?accountid=48947>.
- [61] Kasperbauer, M. J., and D. L. Karlen. (1994). Plant Spacing and Reflected Far-Red Light Effects on Phytochrome-Regulated Photosynthate Allocation in Corn Seedlings. 1564-1569p. *Crop Sci.* 34.

- [62] Kong, F., Li, F., He, Z., Jiang, Y., Hao, R., Sun, X., & Tong, H. (2014). Anti-tumor and macrophage activation induced by alkali-extracted polysaccharide from *Pleurotus ostreatus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69, pp.561-566
- [63] Lois, J. (2009) Caña de azúcar y coproductos. Córdoba, Veracruz. Memorias de la XXII Convención de la ATAM.
- [64] Lyndon C. (1966). Análisis próximo de algunas materias primas colombianas empleadas en nutrición animal. 47-57p. Revista ICA, 1 (1-6).
- [65] Manzoni M., Rollini M. (2002). Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous *fungi* and application of these cholesterol-lowering drugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58: 555-564.
- [66] Martínez, P., Rodríguez, I., Pérez, G., & Leiva, J. (2013). Caracterización y evaluación del bagazo de caña de azúcar como biosorbente de hidrocarburos. Recuperado el 22 de marzo de 2017, de <http://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/download/276504/364436>.
- [67] Martínez, D. A., Buglione, M. B., Filippi, M. V., Reynoso, L., Rodríguez, G. E., & Agüero, M. S. (2015). Evaluación del crecimiento micelial de *pleurotus ostreatus* y *agroclybe aegerita* sobre orujos de pera/Mycelial growth evaluation of *Pleurotus ostreatus* and *agroclybe aegerita* on pear pomaces. *Anales De Biología*, (37), 1-10.
- [68] Miles, P y Chang, S. (1999). *Biología de las setas*. Ed. World Scientific: Hong Kong.
- [69] Miyake, T., Mori, A., Kii, T., Okuno, T., Usui, Y., Sato, F., Kariyama, M. (2005). Light effects on cell development and secondary metabolism in *monascus*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(3), 103-108.
- [70] Molina Baena B., Monereo Megías S. y Silveira Rodríguez M. (2003). Alimentos funcionales y nutrición óptima, ¿cerca o lejos? Madrid. Revista Española de Salud Pública v. 77 n.3
- [71] Moreno, J., & Moral, R. (2011). *Compostaje* (1st ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
- [72] Mostafa, E., & Farghaly, F. (2014). Bioactive compounds of fresh and dried *Pleurotus Ostreatus* mushroom. 4-14p. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 3..
- [73] Naraian, R., Sahu, R., Kumar, S., Garg, S., Singh, C. y Kanaujia, R. (2009). Influence of different nitrogen rich supplements during cultivation of *Pleurotus florida* on corn cob substrate. *Environmentalist*. 29: 1-7.
- [74] Nevarez, D. (2012). Aprovechamiento de residuos agroforestales para el cultivo de hongos comestibles (*Pleurotus sp.*). Instituto Politecnico Nacional. Centro interdisciplinario de investigacion para el desarrollo integral regional. Victoria de Durango.

- [75] Norma Internacional FIL-IDF 26: (1964.)
- [76] Official Methods of Analysis A.O.A.C. 15th Edition, U.S.A (1990)
- [77] Pérez, M., Sánchez, R., Palma, D., & Salgado, S. (2011). Caracterización química del compostaje de residuos de caña de azúcar en el sureste de México. *Interciencia*, 36(1), 45-52. Recuperado el 11 de enero de 2017, de <https://search.proquest.com/docview/847329575?accountid=48947>
- [78] Ramírez Gómez X. (2009). Alimentos funcionales, etnobotánica y nutrición. *Revista electrónica Ideas Concyteg*, Año 4, Núm. 49.
- [79] Rodríguez-Valencia, N. y Jaramillo-lopez, C. (2005). Cultivo de hongos medicinales en residuos agrícolas de la zona cafetera. 23p. Chinchina. *Boletín Técnico*, no.28. CENICAFE.
- [80] Sales-campos, C., Araujo, L., Minihoni, M. y De Andrade, M. (2011). Physiochemical analysis and centesimal composition of *Pleurotus ostreatus* mushroom grown in residues from the Amazon. 456-461p. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, Campinas. 31(2).
- [81] Sánchez., D. (2013). Estudio de factibilidad para la creación de la planta de abonos orgánicos de Colombia (tesis de grado Administrador del medio ambiente y de los recursos naturales). Universidad Autónoma de Occidente, Santiago de Cali: Facultad de Ciencias Básicas. 117 p. recuperado el 22 de marzo de 2017, de <https://red.uao.edu.co/bitstream/10614/4870/1/TAA01264.pdf>
- [82] Sarangi, I., Ghosh, D., Bhutia, S., Mallick, S., & Maiti, T. (2006). Anti-tumor and immunomodulating effects of *Pleurotus ostreatus* mycelia-derived proteoglycans, *International Immunopharmacol.* 6, pp. 1287–1297)
- [83] Shimada, A. (1987). Alimentos su composición y evaluación. In: *Fundamentos de nutrición animal comparada*. pp. 29-41; 350- 354.
- [84] Tortosa, G. (2013). Factores que influyen en el proceso de compostaje – Compostando Ciencia Lab. *Compostandociencia.com*. Recuperado el 22 de marzo de 2017, de <http://www.compostandociencia.com/2013/04/factores-influyen-compostaje-html/>.
- [85] Vargas, E., & Murillo, M. (1978). Composición química de subproductos de trigo y arroz y de granos de maíz y sorgo utilizados en costa rica. *Costa Rica, Agron. Costarr.* 2(1): 9-15.
- [86] Vargas, P., Hoyos, J., & Mosquera, S. (2012). Uso de hojarasca de roble y bagazo de caña en la producción de *pleurotus ostreatus*. 136–145p. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10 (1).
- [87] Wang, H., Ng, T. (2000). Isolation of a novel ubiquitin-like protein from *Pleurotus ostreatus* mushroom with anti-human immunodeficiency virus, translation-inhi-

- bitory, and ribonuclease activities, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 276, pp.587–593)
- [88] Yang, j., Lin, H., & Mau, J. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms, *Food Chem*, 77, pp. 229–235).

Los hongos son un grupo de organismos eucariotas, que se pueden presentar como hongos filamentosos (mohos) y hongos levaduriformes (levaduras), se caracterizan por segregar enzimas para realizar una digestión externa y absorber los nutrientes de sustancias disueltas. Los hongos han acompañado la vida productiva del hombre desde la antigüedad y cada día su importancia aumenta en campos como la agroindustria, la medicina y la biotecnología, debido a su capacidad de producción de una gran variedad de enzimas y metabolitos secundarios.

En este libro se presenta a los lectores los resultados de algunas de las investigaciones realizadas con este importante grupo de organismos, un enfoque desde la Agroindustria y la Biotecnología llevadas a cabo por los grupos de investigación Biotecnología de la Universidad de San Buenaventura Cali y Microbiología, Industria y Ambiente de la Universidad Santiago de Cali.



UNIVERSIDAD DE
SAN BUENAVENTURA
CALI

ISBN 978-958-5415-60-7



9 789585 415607 >


EDITORIAL
BONAVENTURIANA



[editorialbonaventuriana](https://www.facebook.com/editorialbonaventuriana)



[@EditBonaventuri](https://twitter.com/EditBonaventuri)



[EditorialBonaventuriana](https://www.youtube.com/channel/UC...)



[editorial-bonaventuriana](https://www.linkedin.com/company/editorial-bonaventuriana)

www.editorialbonaventuriana.usb.edu.co

VIGILADA MINEDUCACIÓN