



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Identificación de metabolitos insecticidas en extractos orgánicos de *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei* (Hyphomycetes) y exploración de sus mecanismos de acción

Ana Lilia Ruiz Jiménez

DOCTORADO EN CIENCIAS

Opción Biotecnología

Mérida, Yucatán 2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

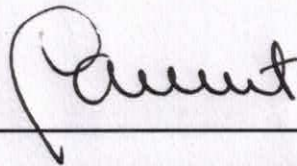
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Ana Lilia Ruiz Jiménez** titulado **Identificación de metabolitos insecticidas en extractos orgánicos de *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei* (Hyphomycetes) y exploración de sus mecanismos de acción** fue realizado en los laboratorios de la **Unidad de Biotecnología** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y del Instituto Tecnológico de Conkal bajo la dirección de los Dres. **María Marcela Gamboa Angulo** y **Esaú Ruíz Sánchez**, dentro de la opción de **Biotecnología**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



Dr. Manuel Martínez Estevez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 15 de Septiembre de 2016

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Firma: _____

Nombre: Ana Lilia Ruiz Jiménez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Adiciones al estudio de hongos microscópicos tropicales con potencial biotecnológico en farmacia y agricultura (Conacyt 2009/CB131256)” en el que participaste bajo la dirección de la Dra. Maria Marcela Gamboa Angulo y Dr. Esaú Ruiz Sánchez.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y al Dr. Esaú Ruiz Sánchez, por confianza, su paciencia, y apoyo durante el desarrollo de la tesis.

Al H. Comité revisor de tesis, integrado por los Dres. Yanet Hernández Romero, Sergio R. Peraza Sánchez, Jairo Cristóbal Alejo, Felipe Vázquez Flota y Raúl Tapia Tusell, por sus observaciones y sugerencias en la redacción del documento.

A la Dra. Azucena González Coloma, por su apoyo para la realización del bioensayo insecticida en su laboratorio de Bioplaguicidas del Instituto de Ciencias Agrarias del Centro Superior de Investigaciones Científicas de Madrid por las instalaciones prestadas durante una estancia de investigación.

Dr. Michael O'Donnell, por su apoyo para la realización de los bioensayos de mecanismo de acción en su laboratorio del Departamento de Biología de la Universidad de McMaster en Canadá por las instalaciones prestadas y a su equipo de trabajo.

Conacyt Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca doctoral otorgada con el número 228272. A las estancias de investigación 2014 2015, y al programa de movilidad

A la I.Q. Irma Leticia Medina Baizabal y M en C. Luis Torres, por su apoyo en el laboratorio.

A Sergio Pérez y Narcedalia Gamboa por el apoyo bibliotecario.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, por compartir conmigo estos últimos años.

A mis hermanas, por acompañame en estos años y por sus enseñanzas.

A Tito de la Cerda por su apoyo incondicional y consejos durante este proceso.

DEDICATORIAS

A Dios por sostenerme durante todo este trayecto.

† A mi padre Lorenzo Ruíz Sánchez, por haberme dado la oportunidad de estar en este mundo y por creer en mí.

A mi madre Manuela Jiménez Santíz y a su esposo Alberto Veras por su apoyo incondicional y por su gran amor.

A mis hermanos Reynaldo, Cristóbal y Manuela por todos los momentos que hemos vivido juntos y por su cariño.

A mis sobrinos Luis, Ana Aíme y Jimena por ser mi motivación cada día.

INDICE

RECONOCIMIENTO	iii
DECLARACIÓN DE PROPIEDAD	v
INDICE.....	i
Índice de Figuras	viii
Índice de Cuadros.....	xii
RESUMEN	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	7
1.1 Metabolitos secundarios	7
1.1.1 <i>Metabolitos fúngicos con actividad insecticida</i>	7
1.2 Aislamientos fúngicos seleccionados por su actividad biológica.....	10
1.3 Modo de acción de insecticidas naturales	10
1.4 Características generales de los insectos plaga en estudio.....	11
1.4.1 <i>Bemisia tabaci</i> Genn. (<i>mosquita blanca</i>).....	11
1.4.2 <i>Myzus persicae</i> Sulzer (<i>pulgón verde</i>)	13
1.4.3 <i>Rhopalosiphum padi</i> L. (<i>pulgón de los cereales</i>)	13
1.5 Objetivos.....	15
1.5.1 <i>Objetivo general</i>	15
1.5.2 <i>Objetivos particulares</i>	15
1.6 Diagrama experimental	15
CAPÍTULO II. <i>Acremonium murorum</i> CICY030: Metabolitos secundarios y su actividad biológica.....	17

2.1 Antecedentes	17
2.1.1 <i>Clasificación taxonómica.....</i>	17
2.1.2 <i>Descripción de Acremonium murorum.....</i>	18
2.1.3 <i>Actividad biológica y micoquímica de Acremonium murorum.....</i>	18
2.2 Objetivos específicos	22
2.3 Materiales y métodos.....	22
2.3.1 <i>Métodos de extracción y purificación cromatográfica</i>	22
2.3.2 <i>Equipos analíticos.....</i>	23
2.3.2.1 <i>Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas (CG-EM)</i>	23
2.3.2.2 <i>Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)</i>	23
2.3.2.3 <i>Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución-Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HPLC-EMAR).....</i>	23
2.3.2.4 <i>Espectros de Resonancia Magnética Nuclear.....</i>	24
2.3.2.5 <i>Espectros de Infrarrojo (IR).....</i>	24
2.3.3 <i>Cultivo de Acremonium murorum en medio sólido AF.....</i>	24
2.3.3.1 <i>Suspensión de esporas y/o micelio.....</i>	24
2.3.3.2 <i>Cultivo en arroz fermentado.....</i>	24
2.3.4 <i>Extracción de los cultivos fúngicos.....</i>	25
2.3.5 <i>Fraccionamiento del extracto metanólico (AR-10b-2) de Acremonium murorum.....</i>	25
2.3.5.1 <i>ARAM-9. Separación de AR-10b-2</i>	25
2.3.5.2 <i>ARAM-14. Separación de ARAM-9K.....</i>	26
2.3.5.3 <i>ARAM-16. Separación de ARAM-9I.....</i>	26
2.3.5.4 <i>ARAM-17. Separación de ARAM-9F.....</i>	27
2.3.6 <i>Cría de insectos</i>	27
2.3.6.1 <i>Bemisia tabaci.....</i>	27
2.3.6.2 <i>Rhopalosiphum padi.....</i>	27
2.3.7 <i>Evaluación de la actividad biológica.....</i>	27
2.3.7.1 <i>Bioensayo de repelencia contra Bemisia tabaci.....</i>	28

2.3.7.2 Bioensayo de repelencia de <i>Rhopalosiphum padi</i>	29
2.4. Resultados.....	30
2.4.1 Extracto metanólico.....	30
2.5 Conclusiones.....	41
CAPÍTULO III. Antifeedant activity on insects and metabolites from <i>Acremonium murorum</i>, a saprophyte fungus isolated from a sinkhole in Yucatán.....	43
3.1 Introduction.....	43
3.2 Experimental section.....	44
3.2.1 General.....	44
3.2.2 Fungal material and culture conditions.....	44
3.2.3 Fungal extraction and purification of compounds.....	45
3.2.4 Bioassay of oviposition inhibition on <i>Bemisia tabaci</i>	45
3.2.5 Bioassay of settling inhibition in <i>Myzus persicae</i> and <i>Rhopalosiphum padi</i>	46
3.3 Results and Discussion.....	46
3.5 Conclusions.....	51
CAPÍTULO IV. <i>Gliomastix masseei</i> CICY029: metabolitos secundarios y sus propiedades insecticidas.....	53
4.1 Antecedentes.....	53
4.1.1 Clasificación taxonómica.....	53
4.1.2 Descripción de <i>Gliomastix masseei</i>	54
4.1.3 Propiedades biológicas y químicas de <i>Gliomastix masseei</i>	54
4.1.4. Propiedades biológicas y químicas del género <i>Gliomastix</i>	55
4.2. Objetivos específicos.....	55
4.3 Materiales y métodos.....	56
4.3.1 Cultivo de <i>Gliomastix masseei</i> en medio sólido.....	56
4.3.1.1 Suspensión de esporas y/o micelio.....	56
4.3.1.2 Cultivo en arroz fermentado.....	56

4.3.2 Preparación de los extractos orgánicos	56
4.3.2.1 <i>Obtención de los extractos orgánicos fúngicos</i>	56
4.3.3 <i>Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo</i>	56
4.3.3.1 <i>Partición líquido-líquido</i>	56
4.3.3.2 <i>ARGM-4. Reacción de metilación de ARGM-1A</i>	56
4.3.3.3 <i>ARGM-3. Fraccionamiento por CC de ARGM-1B</i>	57
4.3.3.3 <i>ARGM-6. Fraccionamiento por CC de ARGM-2B</i>	57
4.3.4 <i>Fraccionamiento del extracto metanólico de G. masseei</i>	58
4.3.4.1 <i>ARGM-8. Separación de AR-9b</i>	58
4.3.4.2 <i>ARGM-11. Separación de ARGM-8F</i>	59
4.3.4.3 <i>ARGM-13. Separación de ARGM-8L</i>	60
4.3.4.4 <i>ARGM-14. Separación de ARGM-8G</i>	60
4.3.4.5 <i>ARGM-18. Separación de ARGM-13J</i>	60
4.3.5 <i>Aislamiento y purificación de los compuestos mediante diversas técnicas</i>	60
4.3.6 <i>Métodos espectroscópicos de identificación química</i>	60
4.3.7 <i>Evaluación de la actividad biológica</i>	60
4.3.7.1 <i>Bioensayo de repelencia contra Bemisia tabaci</i>	60
4.3.7.2 <i>Bioensayo de establecimiento Rophalosiphum padi</i>	60
4.3.7.3 <i>Bioensayo de establecimiento de Myzus persicae</i>	61
4.4 Resultados y discusión	61
3.4.1 <i>Extracto de acetato de etilo</i>	61
4.4.2 <i>Extracto metanólico</i>	68
4.5 Conclusiones	76
CAPÍTULO V. Exploración del posible mecanismo de acción de ácidos grasos en tejidos epiteliales de insectos	77
5.1 Antecedentes	77
5.2 Objetivos específicos	78

5.3 Materiales y métodos.....	78
5.3.1 Cría de insecto (<i>Acheta domesticus</i>)	79
5.3.2 <i>Disección de los túbulos de Malpighi</i>	79
5.3.3 <i>Ensayo de secreción del fluido</i>	80
5.3.4 <i>Medición de la concentración de iones (Na^+ y K^+) y pH en el fluido secretado.....</i>	81
5.3.5 <i>Análisis estadístico</i>	82
5.4 Resultados.....	82
5.4.1 <i>Tasa del fluido secretado</i>	82
5.4.2. <i>Concentración de iones (K^+ y Na^+) y pH en el fluido secretado.....</i>	84
5.5 Discusión.....	88
5.6 Conclusiones	89
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	91
ANEXO	95
REFERENCIAS	121

Índice de Figuras

Figura 1.1 Metabolitos fúngicos con efecto insecticida.....	9
Figura 1.2 Adultos de <i>Bemisia tabaci</i>	12
Figura 1.3 Adultos de <i>Myzus persicae</i>	13
Figura 1.4 Ninfas y adultos de <i>Rhopalosiphum padi</i>	14
Figura 1.5 Diagrama de la estrategia experimental.....	16
Figura 2.1 Crecimiento en PDA: Agar papa dextrosa, A: Anverso de la colonia; B: Inverso de la colonia; C y D: Conidios elipsoidales; E: Conidios doliformes; F: Hifas formando cordones miceliales; G-I: Fiálides (Hurtado-Cantillo, 2015).....	18
Figura 2.2 Metabolitos aislados de <i>Acremonium murorum</i>	19
Figura 2.3 Algunas estructuras químicas de metabolitos reportados para el género <i>Acremonium</i> con actividad biológica.....	21
Figura 2.4 Esquema del fraccionamiento del extracto metanólico de <i>Acremonium murorum</i>	26
Figura 2.5 Esquema del bioensayo contra adultos de <i>Bemisia tabaci</i>	28
Figura 2.6 Esquema del bioensayo de repelencia contra <i>Rhopalosiphum padi</i>	30
Figura 2.7 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) de tres extractos metanólicos obtenidos de <i>Acremonium murorum</i> . B: Porcentaje de repelencia efectiva de los extractos con AIO negativo.....	31
Figura 2.8 Índice de la actividad de oviposición (IAO) de las subfracciones ARAM-9A-9K obtenidas de AR-10b-2. Letras: diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.05$).....	32
Figura 2.9 Porcentaje de repelencia efectiva de las subfracciones de AR-10b-2 contra <i>Bemisia tabaci</i> (barras blancas) y <i>Rhopalosiphum padi</i> (barras grises).....	33
Figura 2.10 Índice de la actividad de oviposición (IAO) de las subfracciones de ARAM-9K, ARAM-9I y ARAM-9F.....	34
Figura 2.11 Porcentaje de repelencia efectiva de las subfracciones de ARAM-9K, 9I y 9F contra <i>Bemisia tabaci</i> (barras blancas) y <i>Rhopalosiphum padi</i> (barras grises).....	35
Figura 2.12 Cromatograma de los componentes de la fracción ARAM-14E, obtenido por HPLC-EM.....	36
Figura 2.13 Estructura del sespéndol.....	37
Figura 2.14 Cromatograma de HPLC-EM de ARAM-16F.....	38
Figura 2.15 Cromatograma de HPLC de ARAM-9F (A), ARAM-17D (B) y ARAM-17E a λ 210.....	40

nm, Columna C18, metanol:agua (40:60).....	
Figure 3.1 ¹³ C RMN spectrum of acremonetriol (1) from <i>Acremonium murorum</i> (CDCl ₃ , 100 MHz).....	47
Figure 3.2 ¹ H RMN spectrum of acremonetriol (1) from <i>Acremonium murorum</i> (CDCl ₃ , 600 MHz).....	48
Figure 3.3 ¹ H- ¹ H COSY Spectrum of acremonetriol (1) from <i>Acremonium murorum</i> (CDCl ₃ , 600 MHz).....	48
Figure 3.4 The structure and key HBMC correlations of acremonetriol.....	49
Figura 4.1 <i>Gliomastix murorum</i> . Crecimiento en AM: Agar maíz A: Anverso de la colonia; B: Inverso de la colonia; C y D: Conidios elipsoidales y fiálides agrupadas. E-G Conidios doliformes y elipsoidales formando cadenas (Hurtado-Cantillo, 2015).....	54
Figura 4.2 Esquema de la partición y purificación del extracto de acetato de etilo <i>Gliomastix masseei</i>	58
Figura 4.3 Esquema de la purificación del extracto metanólico de <i>Gliomastix masseei</i>	59
Figura 4.4 Esquema del bioensayo contra <i>Myzus persicae</i>	61
Figura 4.5 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) de tres extractos obtenidos de <i>Gliomastix masseei</i> . B: Porcentaje de repelencia efectiva de los extractos con AIO negativo..	63
Figura 4.6 Estructuras químicas de los metil esterres de los ácidos grasos detectados.....	65
Figura 4.7 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) de dos extractos metanólicos (AR-9b, 9b-1) obtenidos de <i>Gliomastix masseei</i> . B: Porcentaje de repelencia efectiva de los extractos con AIO negativo.....	69
Figura 4.8 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) contra <i>Bemisia tabaci</i> . B: Porcentaje de repelencia, barras blancas (<i>Bemisia tabaci</i>) y barras grises (<i>Rhopalosiphum padi</i>).....	70
Figura 4.9 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) y B: Porcentaje de repelencia contra <i>Bemisia tabaci</i>	72
Figura 4.10 Cromatograma de HPLC de A: ARGM-11B y B: ARGM-14F, λ 210 nm, Columna C18, metanol:agua (40:60).....	73
Figura 4.11 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) contra <i>B. tabaci</i> . B: Porcentaje de repelencia, barras blancas (<i>Bemisia tabaci</i>) y barras grises (<i>Rhopalosiphum padi</i>).....	75
Figura 4.12 Cromatograma de HPLC-EM de ARGM-18B, λ 210 nm, Columna C18.....	76
Figura 5.1 Efecto de los ácidos grasos y esterres [500 μM] en la secreción del fluido de los tubos de Malpighi. Las barras representan la media del error estándar. * Indica que hay una	83

diferencia significativa.....	
Figura 5.2 Curva de dosis-respuesta del efecto del ácido dodecanoico en la tasa de secreción del fluido de los tubos de Malpighi. Los tubos fueron puestos en una gota de solución salina (20 μ L) que contenía diferentes concentraciones del ácido dodecanoico. La primera gota secretada (control) se recogió a los 30 min, después se agrego el ácido dodecanoico a las concentraciones indicadas a la solución salina. La segunda gota secretada (experimental) se recogió a los 30 min después de añadir el ácido dodecanoico. Después del cálculo de la tasa de secreción de antes y después de la adición del ácido dodecanoico, se calcula el porcentaje de inhibición de la secreción. Cada punto representa la media \pm MES de n = 8 tubos.....	84
Figura 5.3 Efecto del ácido dodecanoico [10 mM] en la secreción del fluido de los tubos de Malpighi. La primera gota secretada (control) se recogió a los 30 min y la segunda gota secretada (experimental) se recogió a los 30 min después de añadir el ácido graso.....	85
Figura 5.4 Concentración de K^+ (Barras blancas) y Na^+ (Barras grises) en el fluido secretado antes (control: no tratado) y después (experimental) de adicionar 10 mM del ácido dodecanoico.....	86
Figura 5.5 Transporte de K^+ (Barras blancas) y Na^+ (Barras grises) en el fluido secretado antes (control: no tratado) y después (experimental) de adicionar 10 mM del ácido dodecanoico.....	87
Figura 5.6 Efecto del ácido dodecanoico en el pH del fluido secretado de los tubos de Malpighi.....	87

Índice de Cuadros

Cuadro 1.1 Metabolitos de origen fúngico con actividad insecticida.....	9
Cuadro 1.2 Actividad biológica de las especies seleccionadas de la Península de Yucatán.....	11
Cuadro 1.3 Mecanismo de acción de insecticidas obtenidos de hongos.....	12
Cuadro 2.1 Metabolitos aislados de <i>Acremonium</i> spp. y su actividad biológica.....	20
Cuadro 2.2 Datos de pesos moleculares y fórmula molecular de los componentes de la fracción ARAM-14E de <i>Acremonium murorum</i>	36
Cuadro 2.3 Fórmula y peso molecular de los componentes observados en la subfracción ARAM-16F.....	38
Table 3.1 ^1H [CDCl_3 , 600 MHz] and ^{13}C NMR [CDCl_3 , 100 MHz] spectral data of compound 1.	49
Table 3.2 Repellent activity of the extract, fractions ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) and pure compounds (50) of <i>Acremonium murorum</i> on <i>Bemisia tabaci</i> , <i>Myzus persicae</i> and <i>Rhopalosiphum padi</i> for 24 hours.....	50
Cuadro 4.1 Resultado de la partición de los diferentes lotes de cultivo de <i>Gliomastix massei</i>	62
Cuadro 4.2 Componentes de la fracción ARGM-1A y su derivado metilado (ARGM-4) detectados en el análisis de su CG-EM.....	65
Cuadro 4.3 Efecto de la inhibición del establecimiento de la fracción hexánica (ARGM-1A) y su derivado metilado (ARGM-4), esteres metilados contra <i>Myzus persicae</i> y <i>Rhopalosiphum padi</i> a $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	66
Cuadro 4.4 Dosis-respuesta de los esteres de ácidos grasos más activos contra <i>Rhopalosiphum padi</i> y <i>Myzus persicae</i>	66
Cuadro 4.5 Resultado de la actividad del ergosterol y endoperóxido de ergosterol contra tres insectos.....	68
Cuadro 5.1 Composición de la solución salina de incubación para los tubos de Malpighi de <i>Acheta domesticus</i>	80

RESUMEN

En los últimos años la actividad agrícola ha sufrido serios estragos ocasionados por los insectos plagas, y para enfrentar esta situación una alternativa es el uso de productos naturales. En este sentido, los hongos microscópicos del trópico representan una valiosa fuente de compuestos naturales con una ilimitada variedad de estructuras químicas y por ende de posibilidades de actividad biológica. Con base en lo anterior, en el laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad de Biotecnología del CICY se realizó un estudio del potencial bioplaguicida y la identificación de los metabolitos producidos por los hongos *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei* aislados de Yucatán.

Los hongos se cultivaron en arroz fermentado y se obtuvieron sus correspondientes extractos orgánicos de acetato de etilo y metanol. El efecto repelente de los extractos se evaluó en el asentamiento de *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*, así como en el índice de oviposición de *Bemisia tabaci*.

A partir de los extractos de mediana polaridad de *A. murorum* (ARAM-1B) se aislaron dos compuestos, el glucósido de acremonín A y el 1,3,4-trihidroxi-hexahidroacremonín, ambos mostraron efecto moderado en el asentamiento de *M. persicae*. El extracto metanólico es una mezcla compleja de componentes que al ser subfraccionado aumenta su actividad, principalmente contra *B. tabaci*. En una de las subfracciones se detectó el sespendol, y en el resto no se encontró coincidencias con la base de datos del equipo, sin embargo, se pudo observar que estos compuestos son altamente oxigenados.

El extracto de acetato de etilo y metanólico de *G. masseei* se fraccionó por un proceso biodirigido. La fracción de baja polaridad está constituida por una mezcla de ácidos grasos y sus derivados esterificados, en donde el 9-octadecenoato de metilo fue el más activo, con EC_{50} de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para *M. persicae* y 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para *R. padi*. La fracción de mediana polaridad es una mezcla compleja de componentes en el cual se identificó el ergosterol y no fue activo contra ninguno de los insectos. Las subfracciones obtenidas del extracto metanólico son mezclas complejas de componentes que tienen actividad principalmente contra *B. tabaci*.

Por otro lado, una serie de ácidos grasos y sus derivados esterificados se evaluaron para conocer su posible mecanismo de acción en tejidos epiteliales de insectos. Para tales efectos se usó el bioensayo de secreción de fluido. El ácido dodecanoico mostró inhibición de la secreción de fluido de los tubos de Malpighi de *Acheta domesticus*, a una concentración inhibitoria (CI_{50}) de 0.53 mM, mientras que los otros ácidos grasos no tuvieron ningún efecto sobre la secreción de fluido por los tubos.

ABSTRACT

In recent years, Agriculture has gone through serious concern due to the damage by pest insects; an alternative to solve this problem is the use of natural products. In this sense, microscopic fungi from tropical areas represent a valuable source of natural compounds with a wide arrange of chemical structures and biological activity. In the laboratory of Chemistry of Natural Products of the Biotechnology Unit at CICY, a study was carried out to characterize the biopesticidal properties and to identify the metabolites produced by the fungi *Acremonium murorum* and *Gliomastix masseei* isolated in Yucatan.

Fungi were cultured in fermented rice, and extracted with two solvents of increasing polarity, ethyl acetate and methanol. The repellent effect was evaluated on settlement of *Rhopalosiphum padi* and *Myzus persicae*, and on the oviposition activity of *B. tabaci*.

The fraction of medium polarity (ARAM-1B) of *Acremonium murorum* yielded two compounds, which were characterized as acremonin A glucoside and the novel 1,3,4-trihydroxy-hexahydroacremonin. Both compounds showed a moderate effect against *M. persicae*. The methanol extract contains a complex mixture of components that increased its activity against *B. tabaci* when subfractioned. The sespendol was detected in one of the subfractions, and for the rest of the compounds no matches were found in the database. These compounds were highly oxygenated.

Bioassay-guided separation of the ethyl acetate extract of *Gliomastix masseei* revealed the presence of fatty acids and their derivatives, where methyl 9-octadecenoate was the most active compound with EC₅₀ values of 16 µg/cm² for *M. persicae* and 35 µg/cm² for *R. padi*. The medium polarity fraction is a complex mixture of components, where ergosterol was identified, but no activity against any of the insect species was observed. The subfractions obtained from methanol extract has a complex mixture that has activity mainly against *B. tabaci*.

A number of fatty acids and esterified derivatives were evaluated to know its possible mechanism of action on insect epithelial tissues. For this purpose the fluid secretion bioassay was used. Dodecanoic acid inhibited the fluid secretion of Malpighian tubules of

Acheta domesticus, with an inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.53 mM, whereas the other fatty acids had no effect on the fluid secretion by the Malpighian tubules.

INTRODUCCIÓN

Los insectos plaga son causantes de grandes pérdidas económicas de 200 billones/año en USA y de 2 trillones en el mundo en la producción agrícola. Estos deterioran la calidad del fruto y afectan el rendimiento. Para su control, históricamente se han utilizado métodos químicos, biológicos, culturales y actualmente se implementan alternativas que permiten minimizar el uso de plaguicidas sintéticos (Cantrell *et al.*, 2012).

Desafortunadamente, el uso irracional e incontrolado de los plaguicidas sintéticos, aunque altamente efectivos, traen consigo una serie de problemas, tales como la alta persistencia en el ambiente, la inducción de resistencia desarrollada por los insectos objetivos, la toxicidad para el hombre y la fauna benéfica (Dayan *et al.*, 2009; Gutiérrez-Olivares *et al.*, 2007). Estos problemas han llevado a la necesidad de buscar más opciones de control, que sean efectivas y compatibles con el ambiente (Vázquez-Luna *et al.*, 2007).

En esta búsqueda, se han estudiado plantas, microorganismos y sus productos metabólicos. En especial, el metabolismo fúngico biosintetiza una gran variedad de sustancias químicas de diversa complejidad y con estructuras muy variadas, dando lugar a una amplia gama de actividades biológicas.

Esto ha sugerido la posibilidad de utilizar los principios activos de los hongos como herramienta de control, particularmente se han aislado metabolitos entomotóxicos de los hongos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces fumosoroseus* para el control de chapulines, termitas, cucarachas y mosquita blanca (Liu y Tzeng, 2012, Hu *et al.*, 2009).

Con estos antecedentes y mediante el monitoreo realizado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán se evaluaron extractos metanólicos y de acetato de etilo de 15 cepas fúngicas contra *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*. El extracto metanólico de *Acremonium murorum* CICY30y el extracto de acetato de etilo de *Gliomastix masseei* CICY29 mostraron mayor actividad de repelencia a una concentración de 10 mg/mL (Ruiz-Jiménez, 2011).

A la falta de estudios fitoquímicos de las especies mencionadas se planteó el objetivo de purificar los principios insecticidas de los hongos *Acremonium murorum* CICY030 y

Gliomastix masseei CICY029, y continuar con la caracterización del posible modo de acción de los principios insecticidas a fin de buscar nuevas alternativas compatibles con el ambiente.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, OBJETIVOS Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.1 Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios, también conocidos como productos naturales (PN), generalmente son estructuras de bajo peso molecular (3,000 uma) (Demain, 2014). Los PN de plantas, hongos y organismos marinos poseen alguna función vital, la cual muchas veces no se conoce con exactitud. Muchos de los PN son producidos por los seres vivos para defenderse de diversos agentes externos (depredadores y patógenos), actuando como agentes alelopáticos (liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), exposición a la luz solar u otro tipo de estrés abiótico (Ottaway, 2001; Mansaray, 2000). En el aislamiento de metabolitos secundarios, los hongos microscópicos constituyen la segunda fuente más importante, después de las plantas superiores (Trigos *et al.*, 1995). Estos microorganismos pueden producir una amplia variedad de metabolitos secundarios, con complejas estructuras químicas (Cole *et al.*, 2003). Se estiman al menos 23,000 productos naturales activos, producidos por microorganismos y de los cuales el 42% son productos derivados de hongos y 32% por actinomicetos (Demian, 2014). Los metabolitos fúngicos constituyen una fuente importante de moléculas con actividad biológica, tanto para humanos como para la agricultura (Aly *et al.*, 2011), los cuales son aislados principalmente de hongos obtenidos de suelos, y recientemente de ambientes acuáticos (Hernández-Carlos y Gamboa-Angulo, 2011; Tarman *et al.*, 2011).

1.1.1 Metabolitos fúngicos con actividad insecticida

Los insecticidas naturales a partir de extractos fúngicos constituyen una importante fuente de recursos naturales en la búsqueda de opciones en el control de insectos plagas. Considerando además el escaso número de especies evaluadas en relación al número estimado que ofrece el planeta.

En el área agrícola hay relativamente menos investigación dirigida a desarrollar alternativas naturales para el control de plagas, en especial para contrarrestar a los insectos plaga (Propagdee *et al.*, 2008; Assaf *et al.*, 2005).

Uno de los primeros estudios encaminados a la detección de metabolitos con actividad insecticida se realizó con cepas de *Metarhizium anisopliae*, lo que generó la obtención de dos depsipéptidos cíclicos denominados destruxinas A y B (Vey *et al.*, 2001). En la actualidad se conocen 35 destruxinas con actividad insecticida variable (Liu y Tzeng, 2012). Otros compuestos han sido reportados de diversos hongos, como la bassianólida, la beauvericina y las beauverólidas de *Beauveria bassiana* (Gupta *et al.*, 1995); las enniatinas de *Fusarium avenaceum* (Hermann *et al.*, 1996); las efrapeptinas de *Tolyocladium niveum* (Gupta *et al.*, 1991); de *Eupenicillium shearii* se aisló la shearamida A (Belofsky *et al.*, 1998) y B, ambas activas frente a *Helicoverpa zea* y *Spodoptera frugiperda*, respectivamente (Belofsky *et al.*, 1995). El ácido dipicolínico aislado de *Paecilomyces fumosoroseus* y de *Lecanicillium (Verticillium) lecanii*, el cual se reportó contra ninfas de *Bemisia tabaci* y *Bemisia argentifolii*, también contra *Calliphora erythrocephala* (Asaff *et al.*, 2005, Soman *et al.*, 2001); el sesquiterpenoide penifulvin A, aislado de *Penicillium griseofulvum*, exhibió propiedad antialimentaria contra *S. frugiperda* (Gaich y Mulzer, 2009). A partir de *Lecanicillium lecanii* se ha aislado vertilecanina A, que exhibe actividad insecticida frente a *H. zea* (Soman *et al.*, 2001) y fomalactona con actividad contra el nemátodo *Meloidogyne incognita* (Cuadro 1.1) (Khambay *et al.*, 2000).

El extracto obtenido del hongo *Cantharellus cibarius*, demostró resultados similares al plaguicida α -cipermetrina utilizado contra moscas y cucarachas (Cieniecka-Rosłonkiewicz *et al.*, 2007), otros extractos activos obtenidos de los géneros *Claviceps purpurea* y *Claviceps chaetomium*, mostraron actividad insecticida contra *Aphis gossypii* (Zhang *et al.*, 2010 a).

El extracto obtenido del hongo *Cantharellus cibarius*, demostró resultados similares al plaguicida α -cipermetrina utilizado contra moscas y cucarachas (Cieniecka-Rosłonkiewicz *et al.*, 2007), otros extractos activos obtenidos de los géneros *Claviceps purpurea* y *Claviceps chaetomium*, mostraron actividad insecticida contra *Aphis gossypii* (Zhang *et al.*, 2010 a).

Cuadro 1.1 Metabolitos de origen fúngico con actividad insecticida.

Especie	Compuesto	Organismo blanco	Referencia
<i>Beauveria bassiana</i>	Beauvericina, Beauverólida, Bassianólida	<i>Bemisia tabaci</i>	Gupta <i>et al.</i> , 1995
<i>Eupenicillium shearii</i>	Shearamida A y B	<i>Helicoverpa zea</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i>	Belofsky <i>et al.</i> , 1995
<i>Fusarium avenaceum</i>	Enniantinas	<i>Choristoneura fumiferana</i>	Hermann <i>et al.</i> , 1996
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Destruxina	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Vey <i>et al.</i> , 2001
<i>Paecilomyces fumosoroseus</i>	Ácido dipicolínico	<i>Bemisia tabaci</i> y <i>Bemisia argentifolii</i>	Asaff <i>et al.</i> , 2005
<i>Verticillium lecanii</i>	Ácido dipicolínico, Vertilecanin A, Fomalactona	<i>Calliphora erythrocephala</i> , <i>Helicoverpa zea</i> , <i>Meloidogyne incognita</i>	Soman <i>et al.</i> , 2001; Khambay <i>et al.</i> , 2000

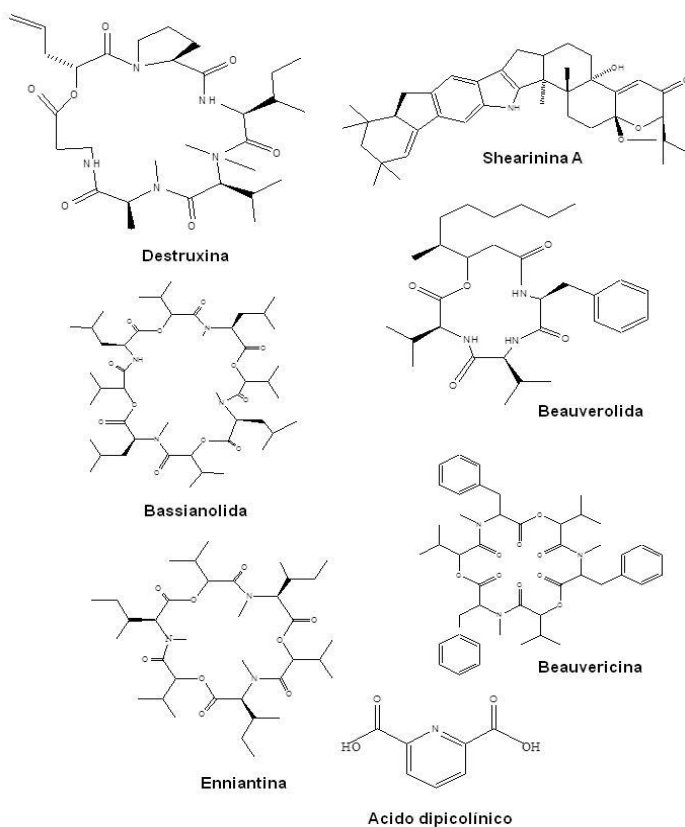


Figura 1.1 Metabolitos fúngicos con efecto insecticida.

1.2 Aislamientos fúngicos seleccionados por su actividad biológica

En los Laboratorios de la Unidad de Biotecnología (UBT) del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. se cuenta con 200 cepas de hongos aislados de cenotes y hojarasca.

Para este estudio se consideraron aquellos que previamente habían sido detectados con alguna actividad biológica. Los extractos orgánicos de las cepas se evaluaron en ensayos antimicrobianos: leishmanicida, nematocida y/o antialimentario (Cuadro 1.2) (Escalante-Rejón, 2013; Ruiz-Jiménez, 2011; Reyes-Estébanez, 2009; De la Rosa-García, 2007). Entre las cepas productoras de extractos más prometedores contra los blancos evaluados, se seleccionaron a *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei*.

Cuadro 1.2 Actividad biológica de las especies seleccionadas de la Península de Yucatán.

Especie	Actividad biológica	Tipo de extracto
<i>Acremonium murorum</i>	Antioxidante	EAcOEt; FAcN
	Antimicrobiana	EAcOEt
	Antialimentaria	EAcOEt; EMeOH
<i>Gliomastix masseei</i>	Antioxidante	EAcOEt
	Antimicrobiana	EAcOEt
	Antialimentaria	EAcOEt

EAcOEt: extracto de acetato de etilo; EMeOH: extracto metanólico; FAcN: Fracción de Acetonitrilo

1.3 Modo de acción de insecticidas naturales

Los metabolitos secundarios con actividad tóxica pueden actuar a diferentes niveles sobre la fisiología del insecto (Cuadro 1.3) (Rattan *et al.*, 2010). Los modos de acción más conocidos afectan al sistema nervioso, reguladores del crecimiento, al proceso digestivo, la replicación del ADN y la producción de energía (Wink, 2003). En el primero, actúan como agonistas de neurotransmisores o interfirieren con los canales implicados en la transmisión del impulso nervioso (Raymond *et al.*, 2005; Wink, 2000). El segundo actúa interfiriendo en el crecimiento y desarrollo normal del insecto, inhibiéndolo o

modificándolo, para llegar a producir la muerte del mismo. El proceso digestivo es afectado por inhibidores enzimáticos, principalmente hidrolasas; lo cual trae como consecuencia la reducción de la actividad catalítica en el insecto.

En cuanto al modo de acción de los metabolitos fúngicos, la destruxina es el más estudiado. Este es un ciclodepsipéptido que induce en *Manduca sexta* una parálisis atribuida a la despolarización de la membrana mediante la apertura de canales de Ca^{2+} en las células musculares (Samuels *et al.*, 1988), y afecta el flujo de Ca^{2+} intracelular y la fosforilación de las proteínas (Sowjanya y Padmaja, 2008). Dentro de los órganos diana en los cuales causa alguna alteración son el intestino medio, túbulos de Malpighi y hemocitos circulantes (Ruiz *et al.*, 2010; Dumas *et al.*, 1996) (Cuadro 1.3).

Cuadro 1.3 Mecanismo de acción de insecticidas obtenidos de hongos.

Compuesto	Mecanismo de acción	Hongo	Referencia
Bauvericina	Permeabilidad de la membrana (complejo Na^+ y K^+)	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Murata <i>et al.</i> , 1997
Destruxina A	Cambios en las propiedades del potencial transepitelial	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ruiz-Sánchez <i>et al.</i> , 2010a
Destruxina A y B	Inhibición de la V-ATPasa	<i>Metarhizium anisopliae</i>	Ruiz-Sánchez <i>et al.</i> , 2010a, 2010b
Destruxina A, B y E	Inhibición de la secreción de los tubos de Malpighi	<i>Bauveria bassiana</i>	Mikhaleva <i>et al.</i> , 1971

Existe la necesidad continua de encontrar nuevas moléculas activas con diferentes mecanismos de acción. Para incrementar las opciones de uso, maximizar la eficacia, con sitios diana ya sean específicos o múltiples de los insecticidas que garanticen la sostenibilidad económica y ecológica (Rattan *et al.*, 2010).

1.4 Características generales de los insectos plaga en estudio

1.4.1 *Bemisia tabaci* Genn. (mosquita blanca)

Bemisia tabaci Genn. (Hemiptera: Aleyrodidae), es nativa del sur de Asia, pero se encuentra distribuida principalmente en regiones tropicales. Es un insecto polífago debido a la amplia gama de plantas de que se alimenta, siendo capaz de colonizar alrededor de

600 especies (Georges *et al.*, 2008), con un número de aproximadamente 74 familias (Jing *et al.*, 2003); donde se incluyen dicotiledóneas y monocotiledóneas, de tipo silvestres y cultivadas. Algunas de estas son Brassicaceae, Convolvulaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Malvaceae y Solanaceae (Attique *et al.*, 2003; Souza y Vendramim, 2001).

El daño directo causado a las plantas por ninfas y adultos se debe a la alimentación, ya que succionan la savia por el envés de las hojas, lo cual reduce el vigor de la planta. También existe la excreción de sustancias azucaradas que propician el crecimiento del hongo saprófito conocido como fumagina (*Capnodium* spp.) que forman una capa sobre la hoja (Aguilar-Medel *et al.*, 2007).



Figura 1.2 Adultos de *Bemisia tabaci*.

En México, *B. tabaci* se reporta como plaga de importancia económica en Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Coahuila, Durango, Guanajuato, Michoacán, Oaxaca, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Díaz y Ramírez, 1993).

Otro caso relevante sobre el brote de mosquita blanca lo constituye la zona hortícola de Yucatán, ya que en el ciclo de 1990 se perdieron cerca de 200 Ha de tomate, principalmente en los municipios de Dzilam Bravo, Dzitás, Yobain y Cansahcab (Arcos, 2005; Anaya *et al.*, 1999).

Entre los insecticidas aplicados para su control están los organofosforados, los piretroides y los neonicotinoides (Bahena-Juárez *et al.*, 2012).

1.4.2 *Myzus persicae* Sulzer (pulgón verde)

Myzus persicae es una especie cosmopolita, aunque prefiere los climas templados, se encuentra principalmente en América del Norte y Europa. Es un insecto polífago que produce importantes daños directos e indirectos sobre los cultivos de *Solanum lycopersicum* L. (tomate), *Cucumis sativus* (pepino), *Solanum tuberosum* (papa), *Nicotiana tabacum* (tabaco) y otros más. El pulgón *M. persicae* quizás sea el más importante a nivel económico, ya que tiene una gama muy amplia de hospederos, desde cultivos principales y plantas secundarias.

Además, es capaz de transmitir al menos 100 tipos de virus, entre los más importantes son el *potato virus Y* (PVY), *alfalfa mosaic virus* (AMV), *tomato yellow top virus* (TYTV), *tabacco etch virus* (TEV) y *cucumis mosaic virus* (CMV) (Blackman y Eastop, 2000).

Se ha reportado su presencia en México, principalmente en el estado de Zacatecas (Medica-García y Mena-Covarrubias, 2007).

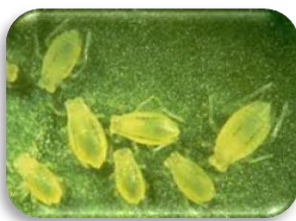


Figura 1.3 Adultos de *Myzus persicae*.

1.4.3 *Rhopalosiphum padi* L. (pulgón de los cereales)

Rhopalosiphum padi es una especie que se encuentra ampliamente distribuida, es olífaga. Esta reportada como plaga de *Avena sativa* L. (avena), *Hordeum vulgare* L. (cebada), *Zea mays* L. (maíz) y otros cultivos. Esta plaga se establece en las partes bajas de la planta, las colonias se localizan en el envés de las hojas, luego ascienden hacia las hojas superiores, tallos, espigas y mazorcas (Ninkovic *et al.*, 2003). Las colonias producen abundante mielecilla que favorece el desarrollo de hongos causantes de la fumagina.



Figura 1.4 Ninfas y adultos de *Rhopalosiphum padi*.

En el mundo es considerada una de las plagas de insectos más importantes y uno de los principales vectores del virus BYDV (*barley yellow dwarf virus*) y del virus MMV (*maize mosaic virus*) (Jiménez-Martínez *et al.*, 2004).

En México se ha reportado su presencia en la zona del Bajío, Michoacán y Sonora (Bahena-Juárez *et al.*, 2012).

Con base en lo anteriormente mencionado, aunado a todos los efectos negativos que los insecticidas sintéticos actualmente empleados tienen en el medio ambiente, la salud humana y a que cada vez son menos efectivos para controlar la población de insectos plaga, se considera esencial la búsqueda de alternativas más benignas. Por lo tanto, los hongos microscópicos representan una fuente importante para buscar y obtener metabolitos secundarios con estructuras novedosas. Por ello, se considera importante continuar las investigaciones con las cepas de *A. murorum* y *G. massei*, principalmente evaluando la actividad insecticida o repelente. En este sentido hay poca información que se ha generado con respecto a estas especies que son nativas de la Península de Yucatán. Por otra parte, es importante conocer el efecto que los metabolitos tienen en el organismo del insecto, es decir, qué proceso fisiológico afecta en el insecto. Dado lo anterior, en el presente proyecto se plantean los siguientes objetivos:

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar metabolitos insecticidas de los extractos orgánicos de las especies fúngicas *Acremonium murorum* CICY030 y *Gliomastix masseei* CICY029 (Hyphomycetes), y explorar sus mecanismos de acción.

1.5.2 Objetivos particulares

- a) Aislar y purificar los metabolitos de los extractos orgánicos de baja y alta polaridad de *Acremonium murorum* y de *Gliomastix masseei* mediante un estudio químico biodirigido.
- b) Identificar y caracterizar químicamente los metabolitos insecticidas purificados de los extractos activos de *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei* a través de análisis espectroscópicos y espectrométricos.
- c) Evaluar la actividad insecticida de los metabolitos purificados de *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei* empleando el bioensayo de repelencia contra las especies *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.
- d) Determinar el efecto de los metabolitos insecticidas purificados en el transporte del fluido y de iones en los túbulos de Malpighi de *Achaeta domestica*.

1.6 Diagrama experimental

La estrategia experimental planteada consistió en crecer las especies fúngicas *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei* en arroz fermentado, para la obtención de los extractos. Asimismo, continuar con la purificación y elucidación de los metabolitos

secundarios, para su evaluación con los insectos plaga de interés en este estudio. Finalmente, determinar el efecto que éstos tienen en los tejidos epiteliales (Figura 1.5).

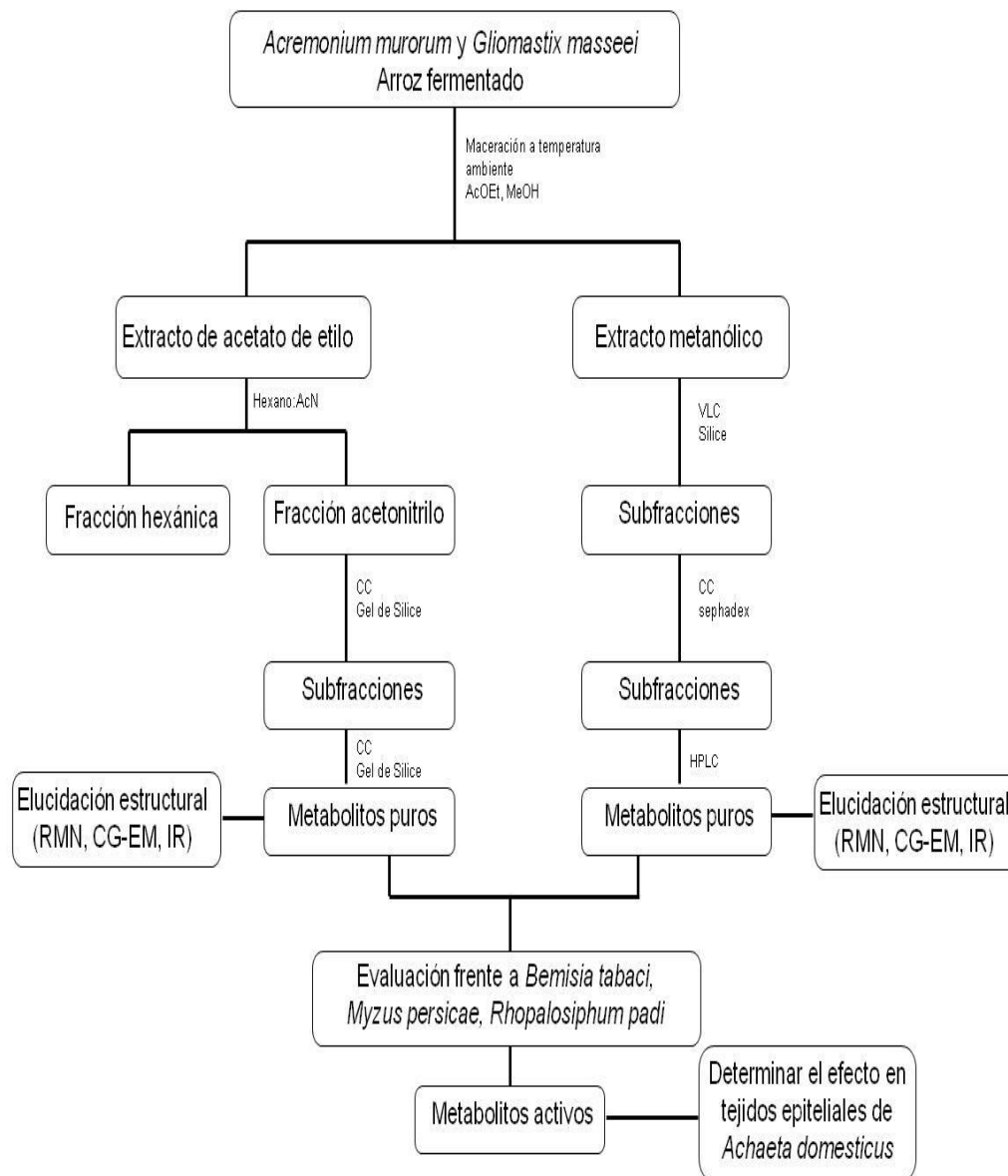


Figura 1.5 Diagrama de la estrategia experimental para el estudio de los metabolitos insecticidas de *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei*.

CAPÍTULO II. *Acremonium murorum* CICY030: Metabolitos secundarios y su actividad biológica

En la búsqueda de alternativas naturales para el control de *Bemisia tabaci* y *Rhopalosiphum padi*, los extractos orgánicos de *Acremonium murorum* se investigaron para aislar y purificar sus principios activos, utilizando los bioensayos de repelencia contra *Bemisia tabaci* y *Rhopalosiphum padi*. En este capítulo se presenta la estrategia de purificación y caracterización química de los metabolitos contenidos en el extracto metanólico producido por este hongo.

2.1 Antecedentes

La cepa de *A. murorum* CICY030 (antes XH4A) se aisló de hojarasca sumergida en el cenote Temozón, Mérida, Yucatán, la cual se encuentra depositada en la colección de hongos microscópicos de la Unidad de Biotecnología del CICY.

2.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Eumicota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Miniliaceae

Género: *Acremonium*

Especie: *Acremonium murorum* (Corda) Gams

Sinonimias: *Gliomaxtis murorum*

2.1.2 Descripción de *Acremonium murorum*

Las hifas de *A. murorum* son hialinas y septadas (1.5-2 μm). Las fiálides son simples y hialinas, con paredes lisas, a veces formando un collarite de 20-40 (-50) μm de largo y de ancho 2-2.5 μm , cerca de la base mide alrededor de 1 a 1,5 μm . Los conidios son elipsoides a subglobosos, con extremos ligeramente en punta, forman racimos en esferas unidas por un material gelatinoso y rara vez forman cadenas, son de color marrón negruzco; 4-5 \times 2-3 μm (Figura 2.1) (Kiyuna *et al.*, 2011).

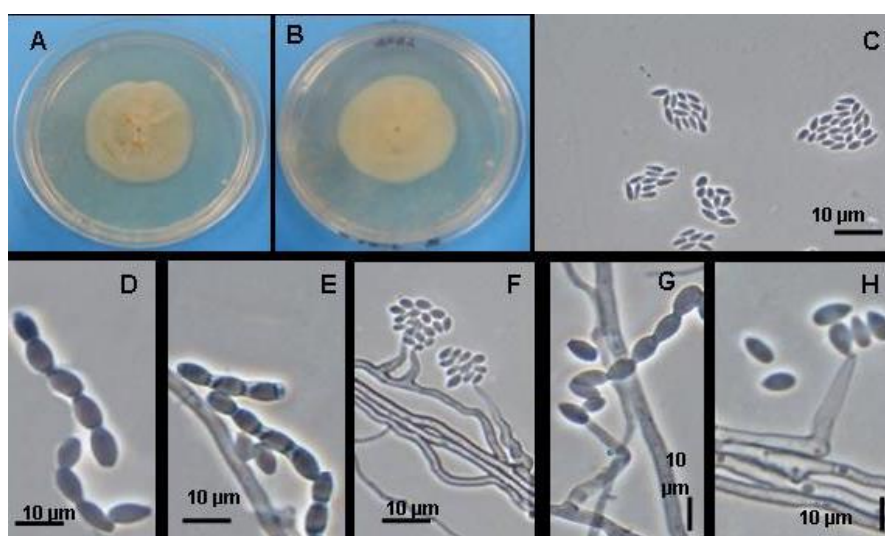


Figura 2.1 Crecimiento en PDA: Agar papa dextrosa, **A:** Anverso de la colonia; **B:** Inverso de la colonia; **C y D:** Conidios elipsoidales; **E:** Conidios doliformes; **F:** Hifas formando cordones miceliales; **G-I:** Fiálides (Hurtado-Cantillo, 2015).

2.1.3 Actividad biológica y micoquímica de *Acremonium murorum*

Los extractos orgánicos obtenidos de la cepa *A. murorum* cultivada en arroz fermentado han demostrado poseer propiedades antioxidantes y antimicrobiana contra *Xanthomonas*

campestris (De la Rosa *et al.*, 2012; Peraza-Jiménez, 2007) y actividad repelente contra *Bemisia tabaci* y *Rhopalosiphum padi* (Escalante-Rejón, 2013; Ruiz-Jiménez, 2011).

Los estudios químicos realizados a la especie *A. murorum* han reportado los metabolitos (*R*)-2-(2-hidroxiopropan-2-il)-2,3-dihidro-5-hidroxibenzofuranol (**1**), 2-(2-dimetilcroman-3,6-diol) (**2**), y 2-(3-dihidroxi-3-metilbutil)-benzeno-1,4-diol (**3**) como inhibidores de la enzima esfingomielinasa dependiente de magnesio (Lan *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 1999), este compuesto también tienen un efecto como antioxidante (Abdel-Lateff *et al.*, 2002) (Figura 2.2).

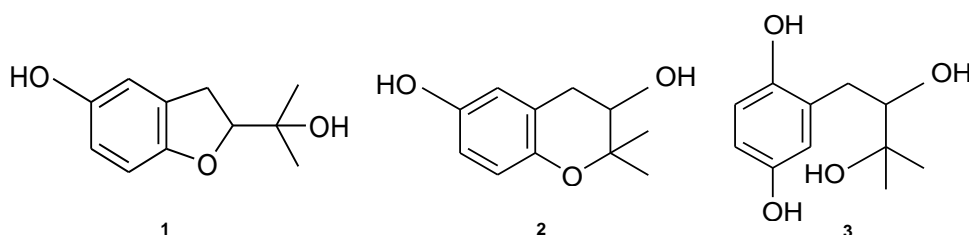


Figura 2.2 Metabolitos aislados de *Acremonium murorum*.

En general, hay poca información de la especie *A. murorum*, sin embargo, de otras especies del género *Acremonium* se han aislado más de cien compuestos, de los cuales 19 han sido evaluados contra algún modelo biológico, tales como antifúngicos, antioxidantes, antimicrobianos, entre otras. Uno de estos es la cefalosporina, el primer compuesto identificado con actividad antimicrobiana aislado de *Acremonium chrysogenum* en 1972 (Hong *et al.*, 2015); también se ha detectado a la acremolactona A con propiedades herbicidas (Sassa *et al.*, 2004), el clorocilindrocarpol con efecto antiinflamatorio (Zhang *et al.*, 2009), entre otros (Cuadro 2.1).

Los antecedentes del aislamiento y actividad biológica de los metabolitos de *Acremonium* justifican trabajar en la purificación e identificación de los metabolitos producidos por *A. murorum* CICY030, y evaluar su actividad biológica en insectos.

Cuadro 2.1 Metabolitos aislados de *Acremonium* spp. con actividad biológica.

Metabolito	Especie	Actividad	Referencia
Ácido fusídico	<i>Acremonium crotochinigenum</i>	Antibacteriana	Evans <i>et al.</i> , 2006
Acremina G,	<i>Acremonium byssoides</i>	Antifúngica	Arnone <i>et al.</i> , 2008
Acremina H–N		Antifúngica	Arnone <i>et al.</i> , 2009
Acremolactona A	<i>Acremonium roseum</i>	Herbicida	Sassa <i>et al.</i> , 2004
Acremostictina,	<i>Acremonium strictum</i>	Antioxidante, antibacteriana	Julianti <i>et al.</i> , 2011
Citosporona E		Antibacteriana, citotóxica	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2014
Acremoxantonas A	<i>Acremonium</i> sp. BCC 31806	Antibacteriana y Antifúngica	Isaka <i>et al.</i> , 2009
Acremoxantonas B		Antibacteriana	
Acremonidinas A y C		Antibacteriana	
Awajanomicina	<i>Acremonium</i> AWA16-1	sp. Anticancerígena	Jang <i>et al.</i> , 2006
Cefalosporina	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Antibacteriana	Hong <i>et al.</i> , 2015
Clorocilindrocarpol, Acremofuranona A, Ascofuranol, Cilindrol B, Dihidroresorcílico,	<i>Acremonium</i> sp.	Antiinflamatoria	Zhang <i>et al.</i> , 2009
7-hidroxi-dihidroresorcílico		Antifúngica, fitotóxico	Poling <i>et al.</i> , 2008
Pyrrocidino A y B		Fitotóxico	
Glucósido de acremonín A	<i>Acremonium</i> sp.	Antibacteriana, Antifúngica	Haiyinet <i>et al.</i> , 2002
Acremonín A		Antioxidante	Abdel-Lateff <i>et al.</i> , 2002
RHM1	<i>Acremonium</i> sp.	Antibacteriana	Boot <i>et al.</i> , 2006
Efraeptina G		Antibacteriana y citotóxico	
UCS1025A	<i>Acremonium</i> sp. KY4917	Antibacteriana y antiproliferativa	Nakai <i>et al.</i> , 2000

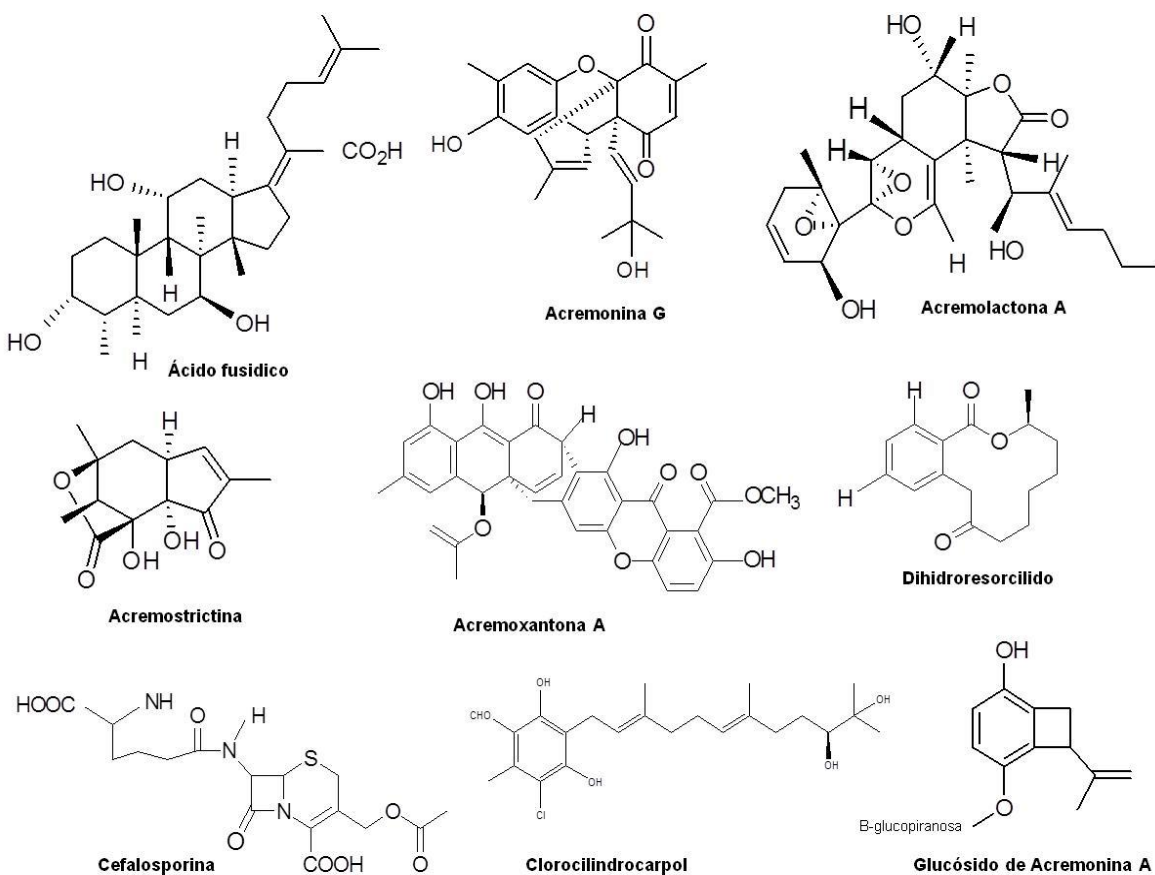


Figura 2.3 Algunas estructuras químicas de metabolitos reportados con actividad biológica a partir de cepas pertenecientes al género *Acremonium*.

2.2 Objetivos específicos

Ver Capítulo 1, sección 1.5 incisos a, b y c, página 15.

2.3 Materiales y métodos

Los procesos microbiológicos se realizaron en medio aséptico, utilizando una campana de flujo laminar vertical. Todos los materiales utilizados se llevaron a esterilizar a la autoclave a una temperatura de 121 °C, 15 lb in⁻¹ de presión por 20 min, posteriormente se dejaron a prueba de esterilidad por 24 h.

2.3.1 Métodos de extracción y purificación cromatográfica

En el proceso de extracción y fraccionamiento se emplearon disolventes destilados en el laboratorio. La eliminación de estos se realizó bajo presión reducida en un evaporador rotatorio (Büchi Re, modelo 451) equipado con un baño de agua a 40 °C. Para eliminar las trazas de disolventes en las muestras se usó un flujo de nitrógeno de alta pureza y posteriormente alto vacío en los extractos, fracciones y compuestos purificados.

Para el análisis cualitativo en cromatografía de capa delgada (CCD), se utilizaron placas cromatográficas con soporte de aluminio impregnadas con gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.2 mm de espesor (E. M. Merck). Los componentes separados por CCD se visualizaron bajo luz UV de onda corta (254 nm) y larga (365 nm), usando como revelador ácido fosfomolibdico y calor de aproximadamente 120 °C para visualizar los componentes presentes.

Para las purificaciones por cromatografía en columna por gravedad (CC) se utilizó gel sílice 70-230 y 200-400 mallas (E. M. Merck) y para las columnas líquidas al vacío (CLV) se usó gel de sílice 60 F₂₅₄ (E. M. Merck). Para la separación de compuestos por diferencia de peso molecular se utilizaron columnas de cromatografía de permeación en gel empacadas con Sephadex LH-20, de 25-100 mallas (Sigma-Aldrich).

2.3.2 Equipos analíticos

2.3.2.1 Cromatografía de Gases-Espectrometría de masas (CG-EM)

Los análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo Agilent 6890N acoplado a un detector másico 5975B de la misma marca, empleando una columna no polar Ultra 1 (100% de metil siloxano, 25 m × 0.32 mm ID, 0.52 µm de grosor de la película), a una temperatura inicial de 150 °C/4 min y una temperatura máxima de 325 °C, la velocidad del flujo de Helio de 1 mL/min. La biblioteca de comparación es NIST05a.L versión 1.20.0.24022 (2006).

2.3.2.2 Cromatografía de líquidos de Alta Resolución (HPLC, por sus siglas en inglés)

Para el perfil por cromatografía líquida de alta resolución se utilizó un equipo HPLC Agilent 1200, con una columna C18 (Zorbax-Agilent) de 250 × 4.6 mm ID, 5 µ, y un sistema de elución de MeOH:H₂O (40:60) y una rampa a 60:40/5 min, 100 MeOH/ 7 min y 60:40/ 2 min y un tiempo posterior de 1 min, con un flujo de 0.5 mL/min.

2.3.2.3 Cromatografía de líquidos de Alta Resolución-Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HPLC-EMAR)

Para el análisis de cromatografía líquida acoplado a masas de alta resolución, se utilizó un HPLC Agilent (Santa Clara, CA) 1200, usando una columna Zorbax SB-C8 de 2.1 × 30 mm, mantenido a 40 °C y con un flujo de 300 µL/min. Disolvente A: acetonitrilo al 10% y 90% de agua-ácido trifluoroacético 0.01% y formiato de amonio 1.3 mM. Disolvente B: acetonitrilo al 90% y 10% de agua con ácido trifluoroacético 0.01% y formiato de amonio 1.3 mM. El gradiente inicia con 10% de B hasta llegar a 100% de B en 6 min, se mantiene a 100% B por 2 min y finalmente regresa a 10% de B por 2 min. Las corridas se hicieron con un detector de arreglo de diodos UV de 100 a 900 nm. Acoplado a un espectrómetro de masas Bruker maXis HR-QTOF (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Alemania). La ionización del disolvente de elución se obtuvo usando la fuente de ESI ajustada a un flujo

de gas de 11 L/min a 200 °C, con una presión de 40 psi. El voltaje del capilar se fijó a 4,000 V. Los espectros de masas se obtuvieron de 150 a 2,000 m/z en modo positivo.

2.3.2.4 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H, 600 MHz), carbono 13 (RMN¹³C, 100 MHz) y los experimentos bidimensionales (COSY ¹H-¹H, DEPT, NOESY, HMQC, HMBC) se corrieron en un equipo Bruker AMX-600, utilizando disolventes deuterados indicados en cada caso, los datos se reportan en ppm.

2.3.2.5 Espectros de Infrarrojo (IR)

Los espectros de infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrofotómetro con transformada de Fourier (marca Nicolet, modelo Protegé 460 Magna IR Technology) por el método de película estacionaria sobre una pastilla de KBr, los datos se reportan en cm^{-1} .

2.3.3 Cultivo de *Acremonium murorum* en medio sólido AF

2.3.3.1 Suspensión de esporas y/o micelio

Las cepas fúngicas se cultivaron en cajas de Petri (100 × 60 mm) con PDA, durante 15-20 días en una incubadora a 25 ± 2 °C, bajo condiciones de fotoperíodo (16/8 h, luz/oscuridad). Cuando la superficie de la caja se cubrió totalmente se adicionaron 5 mL de una disolución de cloruro de sodio-0.85%-Tween 20 al 0.05%, y con un portaobjetos estéril se desprendieron las esporas cuidadosamente para obtener la suspensión correspondiente (Gómez-López *et al.*, 2005; Höller *et al.*, 2000).

2.3.3.2 Cultivo en arroz fermentado

Para el cultivo masivo de los hongos se utilizó arroz fermentado (AF) como sustrato. La fermentación se realizó en frascos de vidrio de 225 mL, en los cuales se depositaron 20 g de arroz y 30 mL de agua destilada. Los frascos se dejaron reposar a temperatura ambiente durante una noche para la fermentación del arroz. Posteriormente, se esterilizó en posición inclinada a 121 °C, 15 lb in^{-1} de presión por 30 min. Después de 24 h, cada

frasco se inoculó con 2 mL de la suspensión de esporas o micelio y se dejó en incubación durante 40 días con condiciones ambientales a 25 °C, con fotoperíodo (12/12 h, luz/oscuridad) (Soman *et al.*, 2001). Al final de este tiempo, el cultivo se congeló y se liofilizó. En total se cultivaron tres lotes de AF (1,000 g).

2.3.4 Extracción de los cultivos fúngicos

El material fúngico liofilizado se trituró y se maceró con acetato de etilo a temperatura ambiente por 24 h, proceso que se repitió dos veces y la tercera extracción con el disolvente a aproximadamente 50 °C, por media hora. El material fúngico residual se maceró con metanol a temperatura ambiente. Los disolventes se eliminaron a presión reducida, en un evaporador rotatorio equipado con baño María a 40 °C hasta obtener los extractos crudos secos obtenidos de acetato de etilo AR-10a , AR-10a-1y AR-10a-2 (0.6, 3.4563 y 2.9351 g) y los metanólicos AR-10b, AR-10b-1 y AR-10b-2 (0.625, 7.0708 y 8.0641 g). Todos los extractos se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad.

2.3.5 Fraccionamiento del extracto metanólico (AR-10b-2) de *Acremonium murorum*

2.3.5.1 ARAM-9. Separación de AR-10b-2

El extracto AR-10b-2 (8 g) se fraccionó a través de columna líquida al vacío (6 cm de diámetro y 5 cm de altura) empacada con gel de sílice, eluyendo con el sistema de disolventes hexano-diclorometano con gradiente de polaridad hasta metanol al 100%, obteniendo 11 subfracciones nombradas ARAM-9A a ARAM-9K (Figura 2.4).

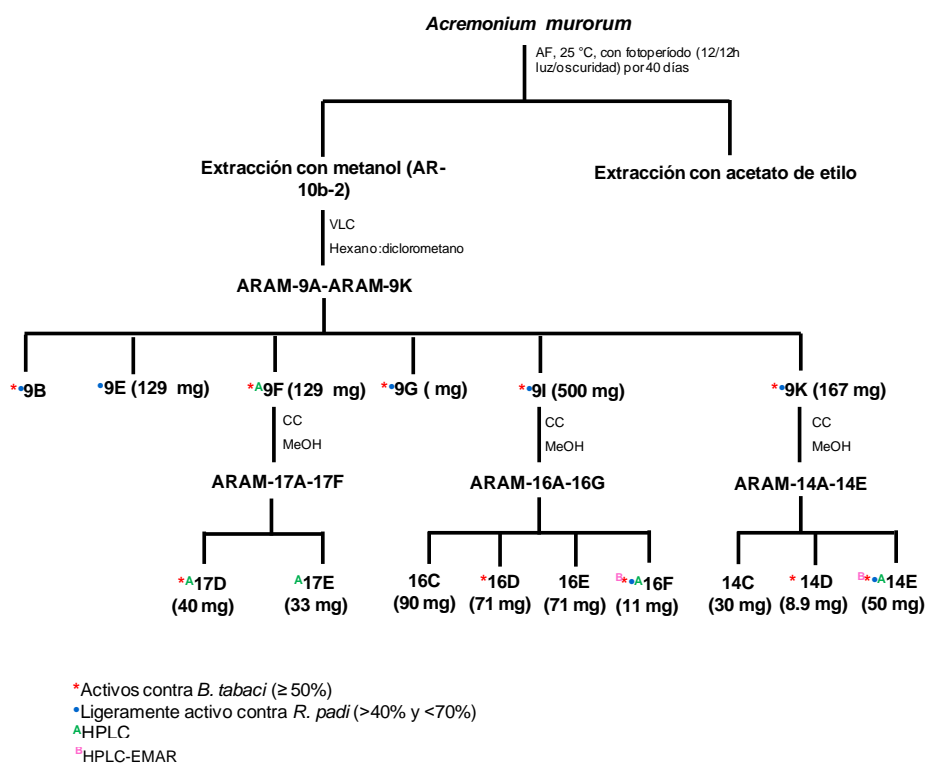


Figura 2.4 Esquema del fraccionamiento del extracto metanólico de *Acremonium murorum*.

2.3.5.2 ARAM-14. Separación de ARAM-9K

El extracto ARAM-9K (119 mg) se fraccionó a través de una CC (40 cm de largo y 2 cm de diámetro) empacada con Sephadex LH-20 y se eluyó en el sistema de disolventes metanol:agua (90:10) obteniendo 5 subfracciones (ARAM-14A a ARAM-14E).

2.3.5.3 ARAM-16. Separación de ARAM-9I

El extracto ARAM-9I (235 mg) se fraccionó a través de una CC (40 cm de largo y 2 cm de diámetro) empacada con Sephadex LH-20 y se eluyó con metanol al 100%, rindiendo siete subfracciones (ARAM-16A a ARAM-16E).

2.3.5.4 ARAM-17. Separación de ARAM-9F

El extracto ARAM-9F (129 mg) se fraccionó a través de una CC (40 cm de largo y 2 cm de diámetro) empacada con Sephadex LH-20 y se eluyó con metanol:agua (90:10), conduciendo a seis subfracciones (ARAM-17A a ARAM-17F).

2.3.6 Cría de insectos

2.3.6.1 *Bemisia tabaci*

La colonia de *B. tabaci* se estableció en jaulas entomológicas de aluminio y malla antiáfidos (1.2 × 1.2 × 1 m). Inicialmente se colectaron adultos de *B. tabaci* en cultivos de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) establecidos en los invernaderos de producción hortícola del Instituto Tecnológico de Conkal (ITC) que se localiza en el Municipio de Conkal, Yucatán. Los adultos se transfirieron a las jaulas entomológicas que contenían plántulas de 30 días de edad de *C. chinense*, establecidas en macetas de plástico que contenían Cosmopeat® (Cosmocel, Canadá) como sustrato de soporte. Dos días después de la introducción de los adultos en las jaulas, éstos fueron retirados, permitiendo que los huevos iniciaran la colonia. Cada 20-30 días se introducían nuevas plántulas con el fin de proveer hospederos nuevos a *B. tabaci*.

2.3.6.2 *Rhopalosiphum padi*

Las semillas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) se establecieron para su germinación y cuando las plántulas tenían aproximadamente 15 cm de alto se inocularon con adultos de *R. padi*. Estas se mantuvieron en cámaras climatizadas a una temperatura de 22 ± 1 °C, humedad relativa: 60-70% y fotoperiodo de 16:8 h (luz/oscuridad).

2.3.7 Evaluación de la actividad biológica

Los bioensayos contra *B. tabaci* se realizaron en los invernaderos del Instituto Tecnológico de Conkal, y los de *R. padi* en los Laboratorios de Bioplaguicidas del Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), en Madrid, España.

2.3.7.1 Bioensayo de repelencia contra *Bemisia tabaci*

Las hojas de *C. chinense* se cortaron en discos de 2 cm² que se dividieron en dos mitades, las cuales se depositaron separadas sobre agar contenido en cajas para el ensayo. Las muestras se prepararon a una concentración de 10 mg/mL (extractos orgánicos). Una de las mitades del disco foliar se impregnó con 10 µL de la muestra (100 µg/cm²) y la otra mitad con el disolvente (10 µL) utilizado en la muestra. Posteriormente, 20 individuos de *B. tabaci* se depositaron en cada una de las cajas réplica y se llevaron a incubar por 48 h en forma invertida, bajo condiciones de laboratorio, a temperatura de 26 ± 2 °C y humedad relativa del 75 ± 8% con un fotoperiodo natural (Figura 2.5). Un total de 5 repeticiones se emplearon en cada tratamiento (Cruz-Estrada *et al.*, 2013).

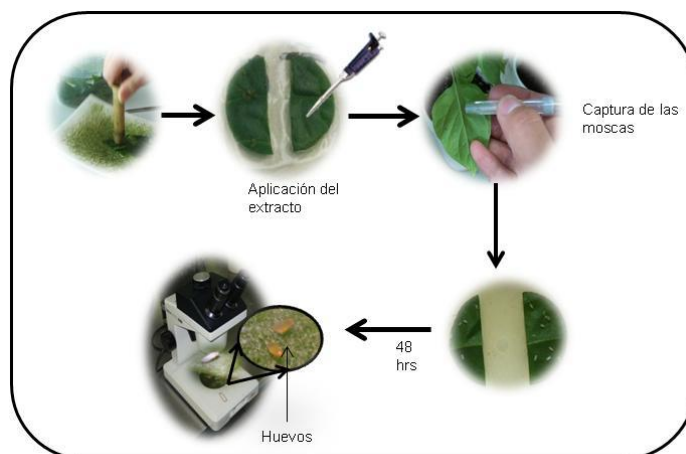


Figura 2.5 Esquema del bioensayo de repelencia contra adultos de *Bemisia tabaci*.

La actividad de repelencia de los extractos hacia los adultos de *B. tabaci* se determinó calculando el índice de la actividad de oviposición (IAO), mediante la fórmula:

$$\text{IAO} = \frac{\text{NT} - \text{NC}}{\text{NT} + \text{NC}}$$

$$\text{NT} + \text{NC}$$

Donde NT: es el número de huevos en el tratamiento y NC: número de huevos en el control. El rango de IAO es de -1 a +1, cero indica una respuesta neutral. Un índice positivo indica que hubo más huevos depositados en el tratamiento que en el control. Por el contrario, más huevos en el control que en el testigo, resulta en un índice negativo (Phasomkusolsil *et al.*, 2012).

Posteriormente se cálculo el porcentaje de repelencia efectiva (RE), mediante la fórmula:

$$\%RE = \frac{\text{NC} - \text{NT}}{\text{NC}} \times 100$$

$$\text{NC}$$

El análisis se realizó en el paquete estadístico InfoStat, mediante la comparación de medias mediante Fisher LSD ($P \leq 0.05$).

2.3.7.2 Bioensayo de repelencia de *Rhopalosiphum padi*

Las hojas de cebada se cortaron de 2 cm², las cuales se depositaron separadas sobre agar (insectagar) contenido en cajas transparentes de acrílico (3 × 3 × 1.5 cm) para el ensayo (Figura 2.6). Las muestras se prepararon a una concentración de 10 mg/mL. Una de las mitades del disco foliar se impregnó con 10 µL de la muestra (100 µg/cm²) y la otra mitad con el disolvente (10 µL) utilizado en la muestra. Posteriormente, 10 áfidos se depositaron en cada una de las cajas réplica y se llevaron a incubar por 24 horas en forma invertida, a 22 ± 1 °C y con un fotoperiodo de luz/oscuridad 16:8, en condiciones de humedad (Figura 2.6). Un total de 20 repeticiones se emplearon en cada tratamiento (González-Coloma *et al.*, 2000).

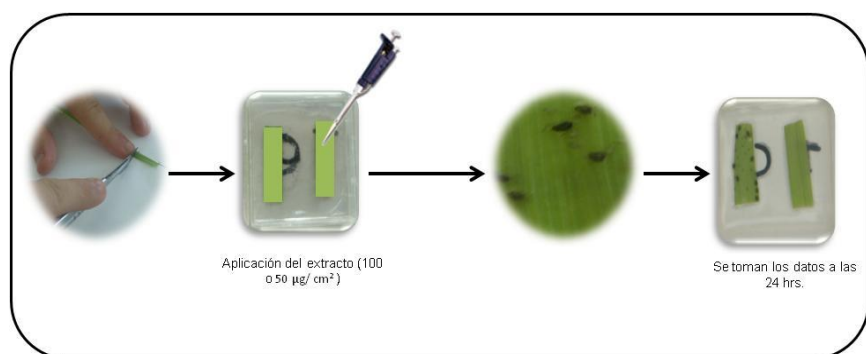


Figura 2.6 Esquema del bioensayo de repelencia contra *Rhopalosiphum padi*.

Los resultados se expresaron en porcentaje de inhibición del establecimiento (IE) (Kubo, 1991). El porcentaje de IE se calculó para cada extracto mediante la siguiente fórmula:

$$\%IE = 1 - \frac{\% \text{ de establecimiento en el tratamiento} \times 100}{\% \text{ de establecimiento en el control}}$$

2.4. Resultados

2.4.1 Extracto metanólico

Los diferentes lotes de los extractos metanólicos del cultivo masivo de *A. murorum* (AR-10b, AR-10b-1 y AR-10b-2) se evaluaron contra adultos de *B. tabaci*. Entre éstos, AR-10b-1 y AR-10b-2 causaron un IAO negativo de -0.45 y -0.43, respectivamente, lo que mostró efecto de repelencia. El cálculo de la repelencia efectiva causó efecto moderado por arriba del 50% (Figura 2.7) de los lotes AR-10b-1 y AR-10b-2. Por otro lado, el extracto AR-10b y el blanco (arroz fermentado) ejercieron un AIO positivo, esto sugiere que dichos extractos tienen efecto atrayente.

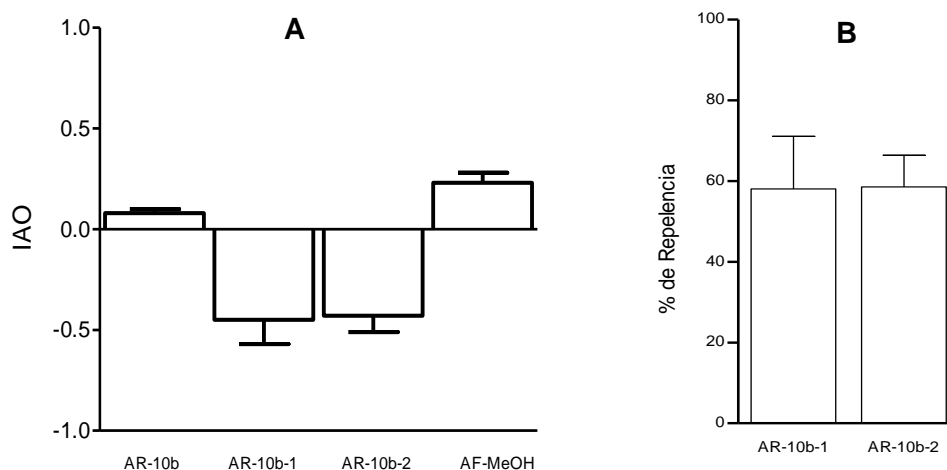


Figura 2.7 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) de tres extractos metanólicos obtenidos de *Acremonium murorum*. **B:** Porcentaje de repelencia efectiva de los extractos con AIO negativo.

En estudios previos se ha reportado el efecto del extracto metanólico (AR-10b) de *A. murorum* en la inhibición de oviposición y mortalidad de ninfas de *B. tabaci* (Escalante-Rejón, 2013); también se reportó la actividad de la inhibición de establecimiento de *R. padi* (Ruiz-Jiménez, 2011). La pérdida de actividad del extracto AR-10b puede atribuirse a la degradación de los principios activos a través del tiempo. Asimismo, el hecho de que el blanco (arroz fermentado) no haya tenido ningún efecto en el IAO indica que los extractos son los responsables de la actividad y no los componentes que se extraen del arroz.

Por lo mencionado anteriormente, se decidió continuar el trabajo con el extracto AR-10b-2. Por lo tanto, este extracto se sometió a un fraccionamiento por una CLV, donde se obtuvieron 11 subfracciones (ARAM-9 – ARAM-9K). Éstas se evaluaron contra *B. tabaci*, donde siete subfracciones causaron un IAO de -0.2 a -0.5 (Figura 2.8). Esta actividad fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$) de la producida por ARAM-9J y ARAM-9K.

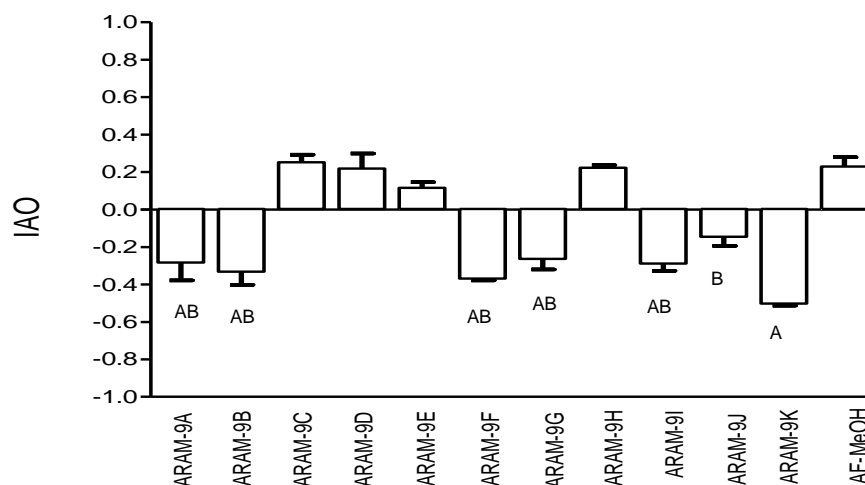


Figura 2.8 Índice de la actividad de oviposición (IAO) de las subfracciones ARAM-9A-9K. Letras: diferentes muestran diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P \leq 0.05$).

La subfracción ARAM-9K causó 66.8% de repelencia efectiva (Figura 2.9). En cambio, las subfracciones ARAM-9A, ARAM-9B, ARAM-9F, ARAM-9G y ARAM-9I causaron entre 40 a 53% de repelencia efectiva.

De esta forma se seleccionaron las subfracciones ARAM-9B, ARAM-9E, ARAM-9G, ARAM-9I y ARAM-9K para su evaluación contra *R. padi*. La subfracción ARAM-9E mostró mayor efecto contra *R. padi* que contra *B. tabaci* (Figura 2.9). En contraste, la subfracción ARAM-9K tuvo un efecto repelente de 66.8% contra *B. tabaci* y 42.8% contra *R. padi*. Estos resultados sugieren que la actividad de los componentes de cada subfracción depende de la especie de insecto evaluada.

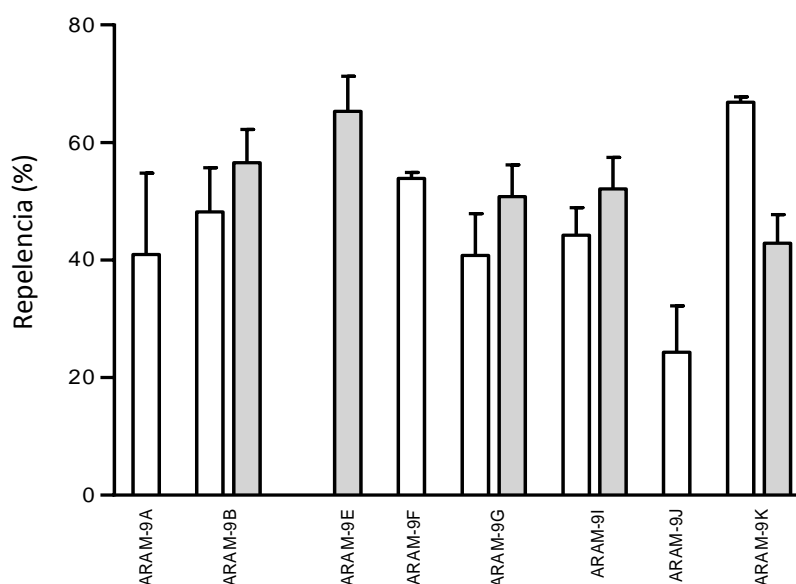


Figura 2.9 Porcentaje de repelencia efectiva de las subfracciones de AR-10b-2 contra *Bemisia tabaci* (barras blancas) y *Rhopalosiphum padi* (barras grises).

Por los resultados anteriores se continuó el trabajo con las subfracciones ARAM-9K, ARAM-9I y ARAM-9F. Para la siguiente fase del fraccionamiento, se usaron las subfracciones de mayores rendimientos en peso y menor complejidad. De esta forma, tres subfracciones de ARAM-9K (ARAM-14C, ARAM-14D y ARAM-14E) se evaluaron contra *B. tabaci*. Las subfracciones ARAM-14D y ARAM-14E mostraron efecto en el IAO (Figura 2.10), con un porcentaje de repelencia efectiva entre 40 y 50% (Figura 2.11). Asimismo, la subfracción ARAM-14E se evaluó contra *R. padi*, la actividad de IE fue de 40.3. La actividad de estos compuestos no fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$) entre ellos (Figura 2.11).

La subfracción ARAM-14E se analizó por HPLC-EM, y su cromatograma muestra que está constituido de varios componentes (Figura 2.12). Entre éstos, a cuatro se les determinó su fórmula molecular, detectando que los dos de menor tiempo de retención, y por lo tanto de mayor polaridad, son de mayor peso molecular, 493.3162 y 519.3333 umas y son compuestos nitrogenados. El peso molecular de los otros dos compuestos

fluctúa entre 297.2675 y 390.2773, cuyo número par de carbonos y los oxígenos en la fórmula molecular, sugiere que se pueden tratar de policétidos (Cuadro 2.2).

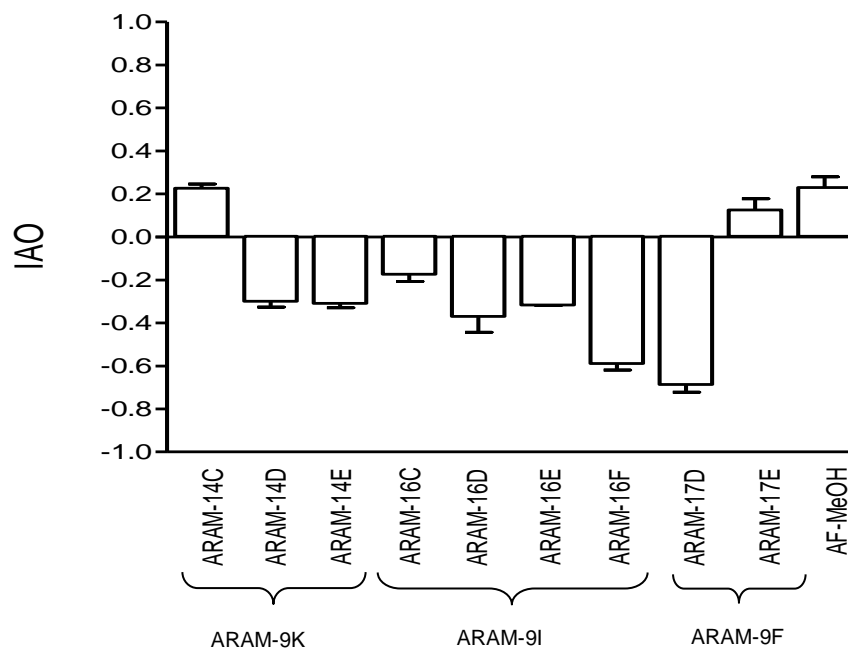


Figura 2.10 Índice de la actividad de oviposición (IAO) de las subfracciones de ARAM-9K, ARAM-9I y ARAM-9F.

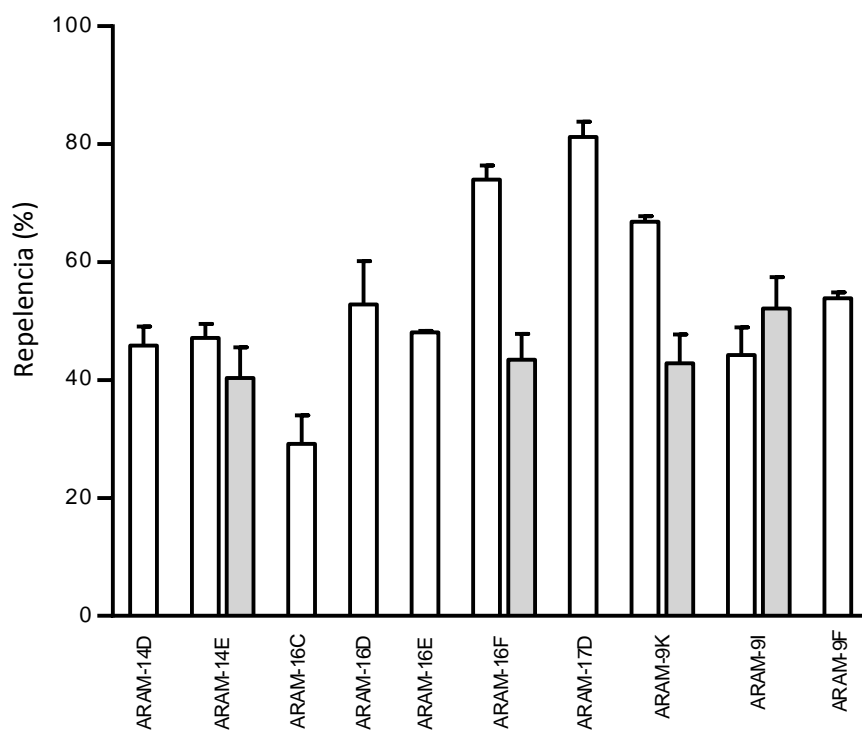


Figura 2.11 Porcentaje de repelencia efectiva de las subfracciones de ARAM-9K, 9I y 9F contra *Bemisia tabaci* (barras blancas) y *Rhopalosiphum padi* (barras grises).

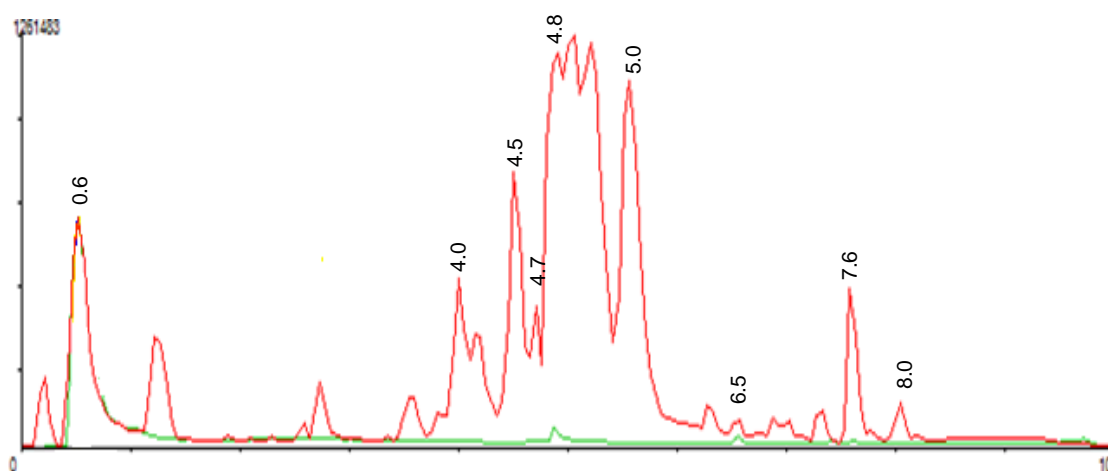


Figura 2.12 Cromatograma de los componentes de la fracción ARAM-14E, obtenido por HPLC-EM.

Cuadro 2.2. Datos de pesos moleculares y fórmula molecular de los componentes de la fracción ARAM-14E de *Acremonium murorum*.

Tiempo de retención (min)	PM	Fórmula molecular
4.7	493.3162	$C_{26}H_{43}N_3O_6$
4.8	519.3333	$C_{33}H_{35}NO_4$
6.5	297.2675	$C_{18}H_{32}O_2$
7.6	390.2773	$C_{24}H_{38}O_4$

El componente con tiempo de retención de 4.8 min, de m/z 519.3300 y fórmula molecular $C_{33}H_{35}NO_4$ correspondió al sespendol (Figura 2.13). Este compuesto fue inicialmente aislado del hongo *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25 y considerado el primer compuesto con un esqueleto indol-sesquiterpeno (Yamaguchi *et al.*, 2004). Este metabolito tiene actividad inhibidora de síntesis de ésteres de colesterol y triacilglicéridos en macrófagos de ratones (Uchida *et al.*, 2006). No se encontró ningún reporte sobre su actividad biológica en insectos o en fitopatógenos.

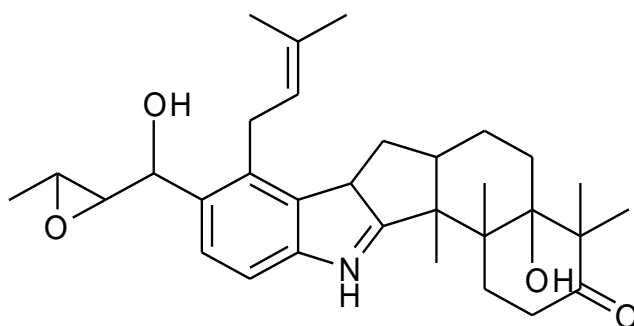


Figura 2.13 Estructura química del sespendol.

De la subfracción ARAM-9I se obtuvieron siete subfracciones (ARAM-16A-16G), de las cuales ARAM-16C, ARAM-16D, ARAM-16E y ARAM-16F se evaluaron contra *B. tabaci* por tener mayor rendimiento en peso. Las evaluaciones de IAO indicaron que las cuatro subfracciones tienen efecto en esta variable, los valores de IAO van de -0.17 a -0.59 (Figura 2.10). Por ende, se procedió a calcular el % RE, donde se observa que la subfracción más activa correspondió a ARAM-16F con 74% RE. La actividad de esta subfracción es estadísticamente diferente a lo que se observó en el resto de las subfracciones cuyos porcentajes de RE fueron menores del 50%. Comparando la actividad de la subfracción inicial, ARAM-9I, y la obtenida de ésta, ARAM-16F, se observó que esta última fue más activa (Figura 2.11). Esta se evaluó contra *R. padi*, donde causó 43% de IE (Figura 2.11).

La subfracción ARAM-16F mostró cinco componentes principales cuando se analizó por HPLC-EM (Figura 2.14 y Cuadro 2.3). Al igual que la subfracción anterior, ésta es compleja y las moléculas presentaron un peso molecular que oscila entre 318.2765 y 754.4111 umas. Ninguno de estos componentes se identificó al comparar su EM con la base de datos del equipo.

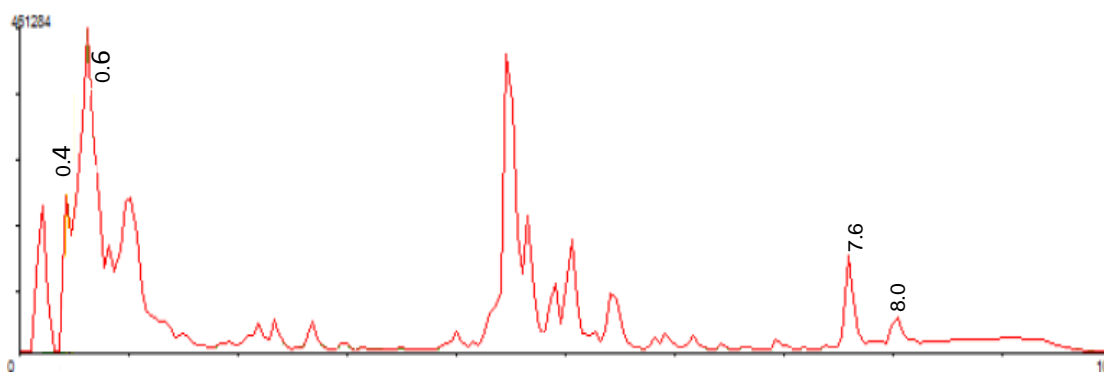


Figura 2.14 Cromatograma de HPLC-EM de ARAM-16F.

Cuadro 2.3 Fórmula y peso molecular de los componentes observados en la subfracción ARAM-16F.

Tiempo de retención (min)	PM	Formula molecular
0.4	342.1165	$C_{12}H_{22}O_{11}$
0.6	754.4111	$C_{35}H_{58}N_6O_{12}$
7.6	318.2765	$C_{24}H_{38}O_4$
8.0	278.1524	$C_{16}H_{22}O_4$

Finalmente, la subfracción ARAM-9F se filtro por una CC de Sephadex, guiando a seis subfracciones (ARAM-17A – ARAM-17F). Entre estas subfracciones, ARAM-17D causó un IAO de -0.69 (Figura 2.10), y RE de 81.22% (Figura 2.11). Este efecto es mayor que el observado en la subfracción original ARAM-9F. Por lo tanto, esta fracción y las fracciones ARAM-17D y ARAM-17E se analizaron por HPLC (Figura 2.15). Para ARAM-9F se observaron cinco componentes principales con tiempos de retención de 3.7, 4.0, 4.9, 5.8 y 9.7 min. Para el caso de ARAM-17D se observaron cinco componentes mayoritarios y uno minoritario, éste último con tiempo de retención de 10.5 min, mismo que se encuentra como mayoritario en ARAM-17E.

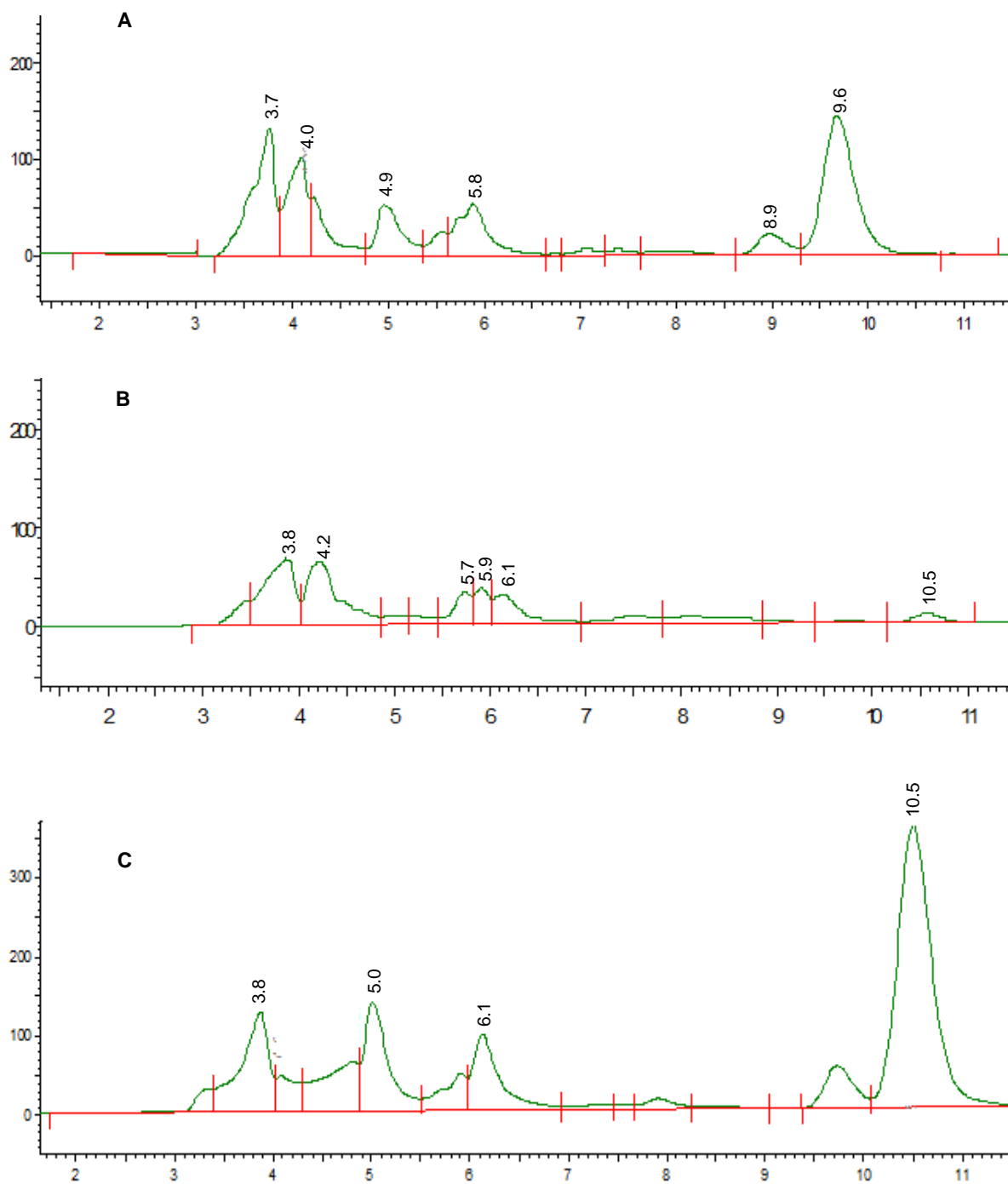


Figura 2.15 Cromatogramas de HPLC de ARAM-9F (A), ARAM-17D (B) y ARAM-17E a λ 210 nm, columna C18, metanol:agua (40:60).

En general, los extractos metanólicos de *A. murorum* muestran actividad de inhibición de asentamiento en *R. padi* e inhibición de actividad de oviposición de *B. tabaci*, siendo en este caso más sensible *B. tabaci*. Asimismo, se observó que tres de las subfracciones obtenidas mostraron actividad contra *B. tabaci*. En algunos casos la actividad fue mayor cuando se fraccionaron estas subfracciones. En las subfracciones activas se detectaron componentes con más de dos oxígenos presentes en su estructura, esto concuerda con la micoquímica reportada para el género, donde la mayoría de los metabolitos reportados contienen en su estructura varios oxígenos, así como nitrógeno, tales como acremina G, acremostriquina, UCS1025A, entre otros (Julianti *et al.*, 2011; Arnone *et al.*, 2008; Agatsuma *et al.*, 2002). Estos metabolitos se han detectado principalmente con propiedades antimicrobianas (Cuadro 2.1). No hubo coincidencia con ninguno de los metabolitos previamente reportados para este género con lo que se observó en el presente estudio para la cepa *A. murorum*.

2.5 Conclusiones

- El extracto metanólico es una mezcla compleja de componentes que actúan como repelente contra *B. tabaci* y *R. padi*.
- En la subfracción ARAM-14E se detectó el sespendol, que tienen un esqueleto novedoso denominado indolsesquiterpeno, el cual proviene de la ruta del mevalonato. Este compuesto presenta actividad significativa contra *B. tabaci* y *R. padi*.
- La subfracción ARAM-17D fue la más activa contra *B. tabaci* y en el análisis de HPLC se observaron cinco componentes principales.

CAPÍTULO III. Antifeedant activity on insects and metabolites from *Acremonium murorum*, a saprophyte fungus isolated from a sinkhole in Yucatán

Continuando la purificación de los extractos orgánicos de *Acremonium murorum*, en este capítulo se presenta la estrategia de aislamiento, purificación y caracterización química de los metabolitos contenidos en el extracto de acetato de etilo de este hongo. Para esto se realizó el aislamiento biodirigido con los bioensayos de repelencia contra *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.

3.1 Introduction

Fungi from the genus *Acremonium* have been isolated from both terrestrial and marine sources, and the genus contains about 209 species [<http://www.indexfungorum.org>, accession date: 31/08/2016,]. Species belonging to the *Acremonium* genus have been recognized as rich sources of biologically active metabolites against human and agricultural diseases and pathogens (Bugni and Ireland, 2004; Sasamura *et al.*, 2010). In previous explorations, our research group isolated a strain identified as *Acremonium murorum* from plant debris submerged in a sinkhole, a typical aquatic ecosystem in the peninsular region of Yucatán. The organic extracts of this strain showed good effect on two extremely harmful phytophagous insects: *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi*. These species are highly destructive by directly or indirectly feeding and the subsequent transmission of viral infections in Cucurbitaceae, Fabaceae and Solanaceae (Islam and Ren, 2009). Compounds reported from this species included the (*R*)-2-(2-hydroxypropan-2-yl)-2,3-dihydro-5-hydroxybenzofuran, 2-dimethyl-chroman-3,6-diol, and 2-(3-dihydroxy-3-methylbutyl)-benzene-1,4-diol as inhibitor of the magnesium-dependent sphingomyelinase enzyme (Tanaka *et al.*, 1999; Lan *et al.*, 2014); these compounds also have significant DPPH radical scavenging effect (Abdel-Lateff *et al.*, 2002). However, there are no reports on antifeedant or insecticidal activity from *Acremonium* spp., a very important application in the search for alternative options in organic agriculture.

In this study, we reported the bio-direct isolation and structure elucidation of two compounds produced by *A. murorum*, and their antifeedant activity on *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, and *Spodoptera littoralis*.

3.2 Experimental section

3.2.1 General

^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded in CDCl_3 in a Bruker AMX-400 spectrometer operating at 400 and 100 MHz, respectively, using TMS as an internal standard. Chemical shifts were reported in ppm and coupling constants (J) were given in Hz. The spectra were obtained in CDCl_3 solutions and referred to the residual peaks of CHCl_3 at 7.26 ppm and 77.0 ppm for ^1H and ^{13}C , respectively. Two-dimensional experiments (^1H - ^1H COSY, HSQC, DEPT and HMBC) were obtained in the same equipment. The IR spectrum was recorded on a Nicolet 8700 FT-IR spectrometer. The HR-MS spectrum was recorded on a JEOL GCMate II FAB [+], NBA matrix, with Calibration Ultramark and Resolution 3000. GC-MS analyses were performed on an Agilent Technologies 6890N chromatograph coupled to an Agilent Technologies 5975B mass selective detector, with Ultra 1 column [methyl siloxane, 25 m long, 0.32 mm i.d., 0.52 μm film thickness, helium at flow rate = 1.0 ml/min, $T_1 = 150\text{ }^\circ\text{C}$, gradient = 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$, $T_2 = 325\text{ }^\circ\text{C}$ (20 min)].

Chromatographic separations were carried out by column chromatography packed with silica gel (230-400 mesh, Merck). Thin-layer chromatography analysis was performed using on a Kiesel gel 60F₂₅₄ plate (Merck), and detection was performed by UV lamp at 254 and 365 nm, and phosphomolybdic acid solution by spraying and heating.

3.2.2 Fungal material and culture conditions

The fungus *A. murorum* was obtained from the culture collection of the Biotechnology Unit in the Yucatan Center for Scientific Research. This fungus was isolated from the submerged plant litter of sinkhole located in Merida, Yucatán, as previously reported (Gamboa *et al.*, 2012). Fungi were grown in fermented rice (FR) for 40 days at $25 \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ and a light-dark photoperiod of 12:12 h (Soman *et al.*, 2001).

3.2.3 Fungal extraction and purification of compounds

The biomass of *A. murorum* was obtained from lyophilized samples of the fungal culture. Fragmented samples were successively extracted with ethyl acetate (3 × 50 mL each). Solvent was eliminated by vacuum, and the crude extract (highly viscous brownish mixture) yielded 3.7 g (6.1%).

The crude extract was partitioned using hexane and acetonitrile obtaining fractions ARAM-1A and ARAM-1B, respectively. The ARAM-1B fraction was subjected to silica gel column chromatography, eluted with mixtures of hexane, acetone, and methanol, monitoring by TLC to produce 16 sub-fractions. The sub-fractions 11 and 12 were combined and passed through silica gel column chromatography and eluted with a mixture of dichloromethane, acetone, and methanol (75:20:5) to yield compounds **1** (5 mg) and **2** (10 mg).

Acremonetriol (8-isopropenylbicyclo[4.2.0]octane-2,3,5-triol, **1**): IR ν_{\max} (KBr) 3441 cm^{-1} (OH), 2924 cm^{-1} (H-C); MS FAB⁺ at 199.1334 m/z , calculated for C₁₁H₁₈O₃ [M + H]⁺ 199.2581. ¹H and ¹³C NMR data: see Table 3.1.

3.2.4 Bioassay of oviposition inhibition on *Bemisia tabaci*

Adult whiteflies were obtained from a stock colony of *B. tabaci* maintained on eggplant plants and kept in a greenhouse at 25-35 °C, 55-75% relative humidity and natural light (Cruz-Estrada *et al.*, 2013).

For bioassay, disks (2 cm²) of fresh habanero pepper leaves were cut in half, set separately on an agar bed (2%) and placed in a lid of 10 mL plastic jars. Each half of leaves set on the bed of agar were treated with the extract (100 µg/cm²) and the other half was treated with dimethylsulfoxide (DMSO):water (1:1, 10 µL) as negative control. Once the leaves were treated, 30 adult whiteflies were placed in each plastic jar that was set upside down, in such a way that the treated and control leaf sections were in the bottom. Jars were incubated upside down at 26 ± 2 °C, 75 ± 8% relative humidity and natural light. EtOAc extract of fermented rice was used as positive control. A total of five replicates for each extract were tested. The repellent activity of the extracts was determined by oviposition inhibition that was calculated by the number of eggs laid on the leaf discs. Results were recorded 48 h after *B. tabaci* exposure. An oviposition inhibition (% OI) was

calculated for the organic extract and the isolated compounds at an initial dose of 100 and 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively [$\% \text{OI} = (\text{C} - \text{T}/\text{C}) * 100$, where T) number of eggs on treated surface, C) number of eggs on control surface.

3.2.5 Bioassay of settling inhibition in *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi*

Adults of *M. persicae* and *R. padi* were grown on pepper (*Capsicum annuum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) plants, respectively, and maintained at 21 ± 2 °C, 60-70% room humidity, and a photoperiod of 16:8 h (L:D) in a growth chamber.

For the bioassay, two pieces of bell pepper from a leaf or fragments of barley (1 cm^2) were treated with the organic extract (acetone solution), isolated compounds or only the solvent (acetone), using a concentration of $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Treated leaf sections were set on plastic boxes ($3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm}$) bottom-lined with 2% agar. In this experiment, 20 replicates per extract were used. After solvent evaporation, 10 apterous aphids were taken from the colony and placed in each plastic box. The percentage of aphids settled on each leaf section was recorded after 24 h of aphid exposure to treated leaf sections as described by Gonzalez-Coloma *et al.* (2000). A settling inhibition index (% SI) was calculated for the organic extract and isolated compounds at an initial concentration of 100 and $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectively [$\% \text{SI} = 1 - (\% \text{T}/\% \text{C}) * 100$, where % T) % aphids on treated surface, % C) % aphids on control surface] (Gonzalez-Coloma *et al.*, 2000).

3.3 Results and Discussion

The active EtOAc extract from *A. murorum* was partitioned with acetonitrile and hexane. The defatted fraction was successively passed through chromatography columns to yield a new compound named acremonetriol B (**1**) and the known acremonin A glucoside (**2**).

Compound **1** was obtained as a colorless oil, the molecular formula was deduced by accurate mass measurement to be $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{O}_3$ (calculated m/z 198.1177), with three degrees of unsaturation. The structure was deduced first from analysis of their ^1H , ^{13}C NMR, and bidimensional spectral data (Table 3.1). Expected 11 carbons were observed in the ^{13}C

NMR spectrum as one quaternary sp^2 , six methine (three oxygenated at 78.6, 72.5, 66.3 ppm), three methylene (one sp^2 at 109.1 ppm) groups and only one methyl (Figure 3.1).

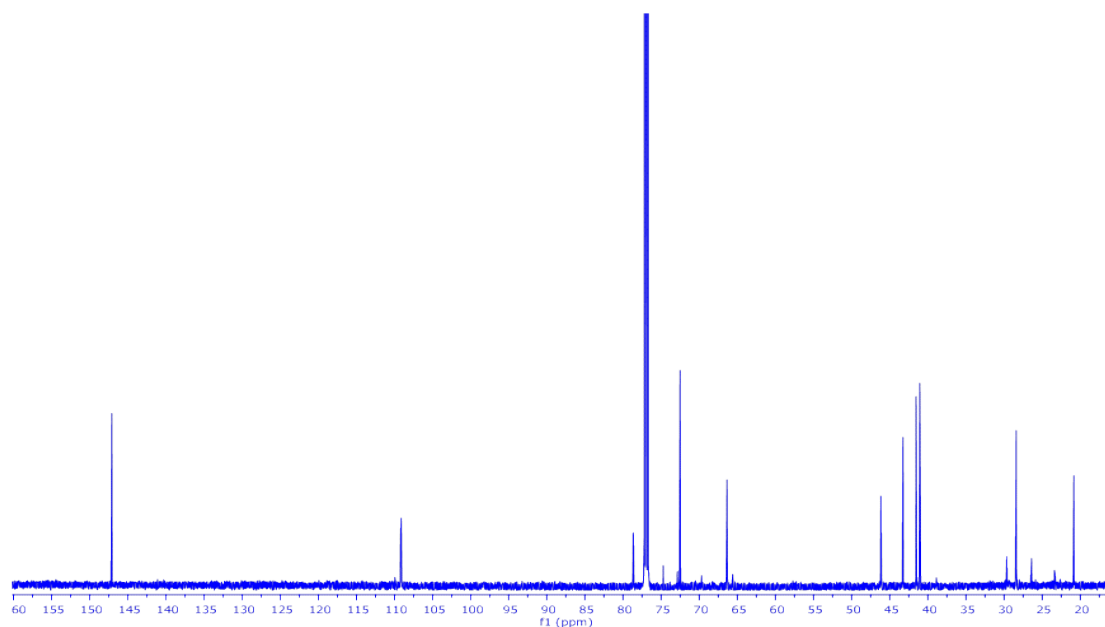


Figure 3.1 ^{13}C RMN spectrum of acremonetriol (**1**) from *Acromonium murorum* (CDCl_3 , 100 MHz).

In the ^1H NMR spectrum (Figure 3.2) of **1** two unprotected signals at 4.74 and 4.79 ppm of sp^2 methylene group were observed, and the unique double bond in the structure. Also, the allylic methyl protons at 1.72 ppm bound to quaternary sp^2 carbon suggested that they belonged to an isopropenyl chain such as the one in acremonine A (Abdel-Lattef *et al.*, 2002). Subsequently, a bicyclic molecule explained the other degrees of unsaturation, but with saturated rings. These data, together with the number and the ppm carbon values (Table 3.1) and the similarity with acremonin A, suggested fused cyclobutane and cyclohexane rings. The presence of alcohol groups in the structure of **1** detected by a strong band at 3441 cm^{-1} in its IR spectrum was confirmed by the protons shifted at 4.03, 3.73, and 3.48 ppm in its ^1H NMR spectrum.

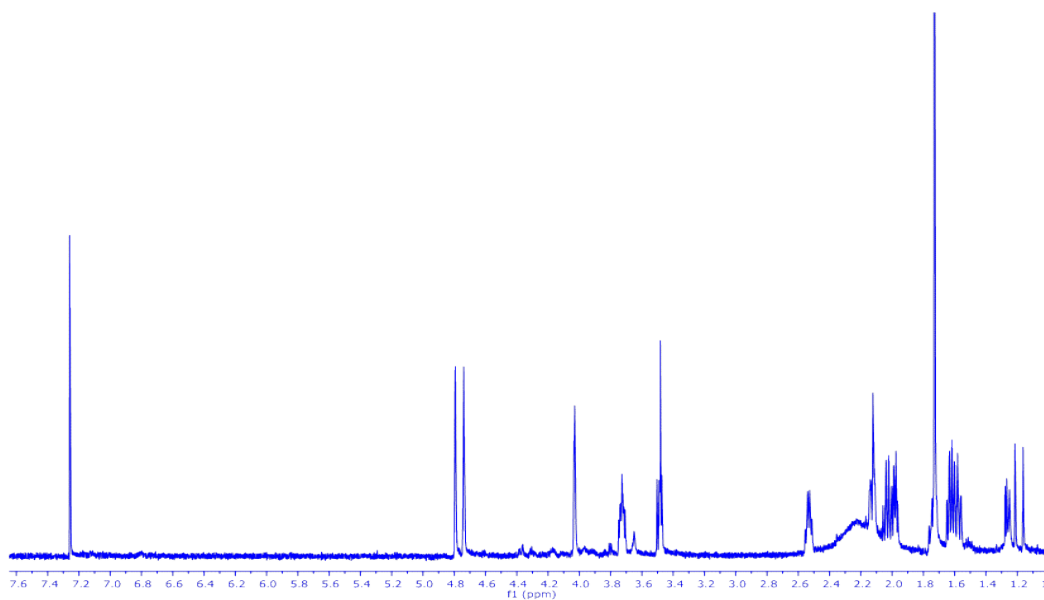


Figure 3.2 ^1H RMN spectrum of acromonetriol (1) from *Acremonium murorum* (CDCl_3 , 600 MHz).

HMBC correlations (Table 3.2) of H-1 with C-3, H-2a, H-2b, H-4 and H-5 with C-1 and C-4, together with couplings of the protons observed in the ^1H - ^1H -COSY experiment allowed assignment of the three alcohols in positions C-1, C-3 and C-4 of the cyclohexane ring (Figure 3.3).

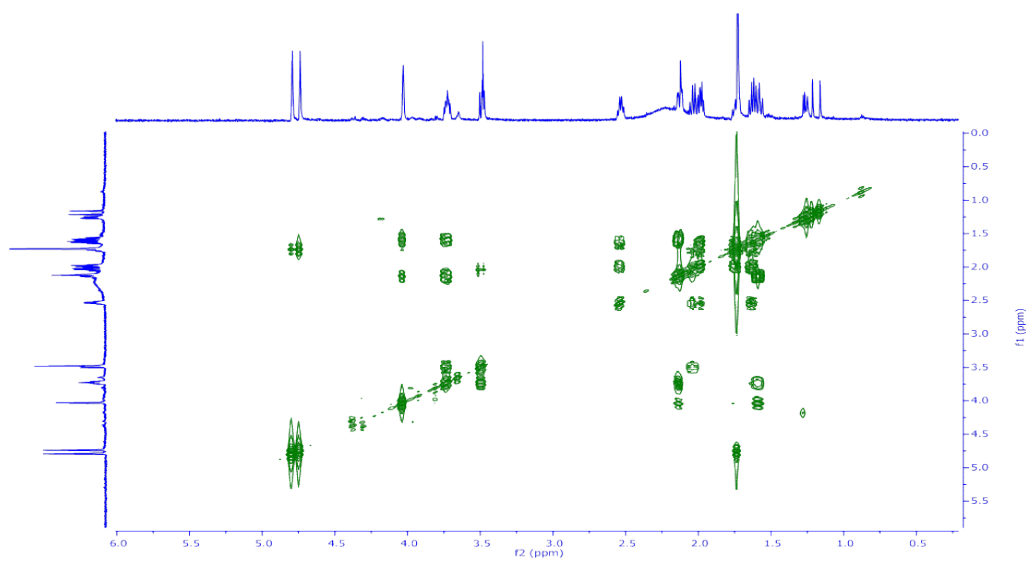


Figure 3.3 ^1H - ^1H COSY Spectrum of acromonetriol (1) from *Acremonium murorum* (CDCl_3 , 600 MHz).

The saturated bicycle is similar to *bis*-homoinositol, a synthetic derivative of inositol (Kara and Balci, 2003). The structure of **1** was then identified as 8-isopropenylbicyclo[4.2.0]octane-2,3,5-triol with the trivial name of acremonetriol (Figure 3.4).

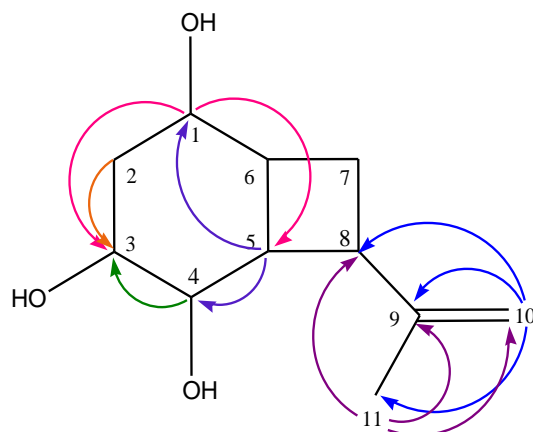


Figure 3.4 Structure and key HBMC correlations of acremonetriol.

Table 3.1 ^1H [CDCl_3 , 600 MHz] and ^{13}C NMR [CDCl_3 , 100 MHz] spectral data of compound **1**.

Position	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$, m, $J = \text{Hz}$	^1H - ^1H COSY	HMBC
1	66.3 (d)	4.03, bs	H-2a,b, H-6	C-3, C-5
2	41.5 (t)	a. 2.13, dd, 4.33, 5.6	H-1, H3	C-3
		b. 1.60, dd, 2.71, 13.7	H-1, H-3, H-6	C-3
3	72.5 (d)	3.73, ddd, 5, 8.1, 11.5	H-2a, b, H-4	
4	78.6 (d)	3.48, dd, 10.4, 8.2	H-3, H-4	C-3
5	43.3 (d)	2.0, dd, 11.1, 11.1	H-4, H-6, H-8	C-1, C-4
6	41.1 (d)	1.73, m	H-1, H-5, H-7a, b	
7	28.4 (t)	a. 1.96, dd,	H-6, H-8	
		b. 1.62, m	H-6, H-8	
8	46.2 (d)	2.54, dd,	H-5, H-7a, b	
9	147.1 (s)			
10	109.1(t)	a. 4.79, bs	H-10a, H- 11	C-8, C-9, C-11
		b. 4.74, bs	H-11	
11	20.9 (q)	1.72, 3H, s	H-10a, b	C-8, C-9, C-10

Comparison of the ^1H and ^{13}C NMR data of compound **2** with literature data enabled identification of this compound as acremonin A glucoside (Abdel-Lateff *et al.*, 2002). Both compounds **1** and **2** are related, and compound **1** might be biosynthesized by a common precursor, or by microbial oxidation of the aromatic precursor acremonin A (Hudlicky *et al.*, 1996). Interestingly, both strains have different origins, *A. murorum* was isolated from a freshwater while *Acremonium* sp. (related *Acremonium roseogriseum*) from a marine algae.

In the present work, the ethyl acetate extract, fractions, and compounds obtained from *A. murorum* were assessed against the phytophagous *B. tabaci*, *M. persicae*, and *R. padi*, and the chewing insect *S. littoralis*. The results (Table 3.2) showed no activity on *B. tabaci* and *S. littoralis*, and the most active effect was produced by exposition to ethyl acetate extract on the settling inhibition of *M. persicae* and *R. padi* at $100\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ for 24 h. When this full extract was separated, both fractions (acetonitrile and hexane fraction) showed a similar, significant effect only on *M. persicae*. Finally, the pure compound **1** ($50\ \mu\text{g}/\text{mL}$) was able to inhibit the settling of both aphids (SI = 55.6 and 67.2%, respectively), and **2** only on *M. persicae* (SI = 59%).

Table 3.2 Repellent activity of the extract, fractions ($100\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$), and pure compounds ($50\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$) of *Acremonium murorum*. on *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae*, and *Rhopalosiphum padi* for 24 hours.

Type of extract	% IO	% SI	% SI
	<i>Bemisia tabaci</i>	<i>Myzus persicae</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>
EtOAc extract	35.7 ± 11.4 a	67.5 ± 7.4 a	75.3 ± 5.0 a
ARAM-1A (AcN fraction)	31.6 ± 10.7 ab	76.1 ± 5.8 a	48.6 ± 6.9 bc
ARAM-1B (hexane fraction)	43.8 ± 14.8 a	67.8 ± 7.05 a	41.5 ± 7.5 c
1	24.4 ± 8.6 ab	55.6 ± 5.4 ab	59.0 ± 4.5 ab
2	19.6 ± 6.2 ab	67.2 ± 4.8 a	48.1 ± 4.9 bc
Blank (fermented rice)	34.1 ± 12.8 a	43 ± 8.2 b	48.4 ± 7.3 bc

Similar letters within the same column are not significantly different Fisher LSD ($P \leq 0.05$).

%IO: inhibition of oviposition; %IS: settling inhibition

The hexane fraction is slightly more active than the ethyl acetate extract and acetonitrile fraction. This could be attributed to fatty acids and methyl esters in the hexane fraction, which have previously been reported with antifeedant activity against *M. persicae* and *R. padi* (Ruiz-Jiménez *et al.*, 2016; Santana *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2010).

Several compounds have been previously isolated from the *Acremonium* genus. The compound acremonin A glucoside has been well characterized as antioxidant, however, this metabolite has not been previously reported as repellent to insects. The activity may be dependent on the number and the location of the hydroxyl groups, suggesting that hydroxyl groups positively affect the repellent activity against different pests (Nerio *et al.*, 2010). Strasser *et al.* (2010) reported that *M. persicae* is susceptible to the compound destruxin E (LD₅₀: 0.4 µg/cm²), in contrast, the cereal aphid *R. padi* continued to feed on cereal leaves treated with destruxin E even at relatively high doses (e.g. 6.6 mg/cm²).

In practical terms, the repellent effect is more advantageous for preventing pests in the adult stage from colonizing host plants, and also to avoid virus infection from adult vectors carrying a viral load Schuster *et al.* (2009). On the other hand, van den Heuvel *et al.* (1998) demonstrated that the transmission of potato leafroll luteovirus (PLRV) by *M. persicae* was inhibited by 50-60% and 40-70% for neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seed kernel extracts and azadirachtin, respectively.

3.5 Conclusions

Repellent activity of the organic extract, fractions, and isolated compounds of *A. murorum* differed in their effectiveness on the three different insects. This is the first report of acremonetriol and acremonin A glucoside from *A. murorum* with antifeedant effect on aphids *M. persicae* and *R. padi*. The evaluations against more target phytophagous insects in agriculture will increase its activity spectrum and its biopesticide potential.

CAPÍTULO IV. *Gliomastix masseei* CICY029: metabolitos secundarios y sus propiedades insecticidas

En este capítulo se evaluaron los extractos de acetato de etilo y metanol de *Gliomastix masseei* contra las especies *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*. Lo anterior fue con la finalidad de determinar cuáles son los metabolitos que están presentes y también conocer los efectos con los diferentes insectos antes mencionados.

4.1 Antecedentes

La cepa de *Gliomastix masseei* CICY029 (antes MR36) se aisló de hojarasca en el estado de Yucatán. La cepa se encuentra depositada en la colección de hongos microscópicos de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C (CICY).

4.1.1 Clasificación taxonómica

Reino: Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Gliomastix*

Especie: *Gliomastix masseei* (Sacc. & Totter) Matsush

4.1.2 Descripción de *Gliomastix masseei*

Las hifas de *G. masseei* son hialinas a marrón pálido, tabicadas, miden 1.5-2 μm de ancho. Las fiálides en su mayoría nacen solas o se encuentran unidas, paredes lisas de color oscuro en la parte superior formando una collarete, 20-40 (-50) μm larga y 2.5-3.0 μm de ancho, cerca de la base de 1.5 a 2.0 μm . Los conidios se encuentran en las cadenas, son de color marrón negruzco, son elipsoidales, con la base truncada, de color negro en ambos, 5-8 (-10) \times 2.5 - 3 μm . Las clamidosporas ausentes (Kiyuna *et al.*, 2011) (Figura 4.1).

Esta especie comúnmente se encuentran en el suelo, asociado con las plantas (Domsch *et al.*, 2007).

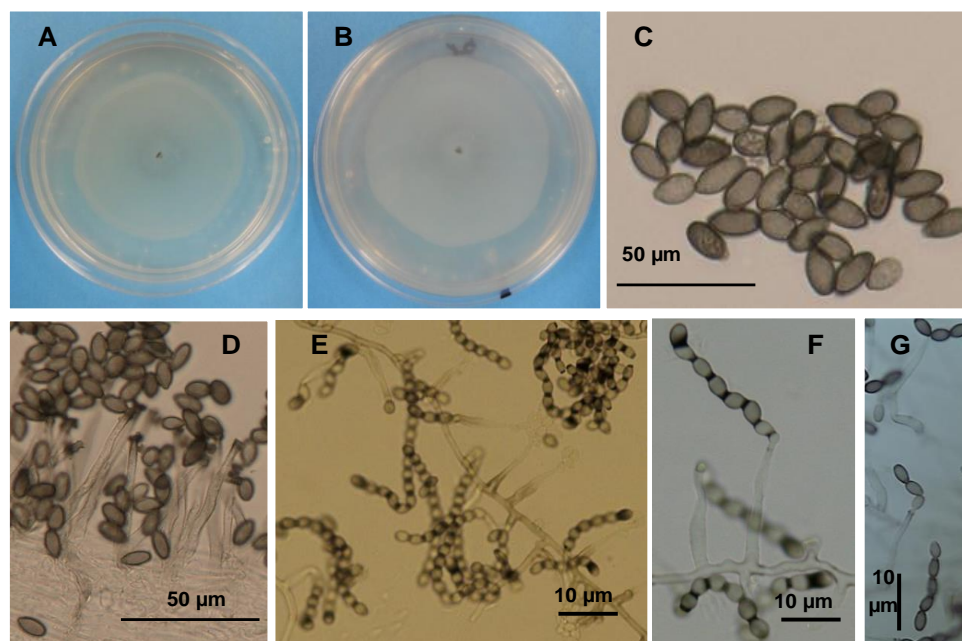


Figura 4.1 *Gliomastix murorum*. Crecimiento en AM: Agar maíz A: Anverso de la colonia; B: Inverso de la colonia; C y D: Conidios elipsoidales y fiálides agrupadas. E-G Conidios doliformes y elipsoidales formando cadenas (Hurtado-Cantillo, 2015).

4.1.3 Propiedades biológicas y químicas de *Gliomastix masseei*

Los extractos orgánicos de *G. masseei* presentan actividad antioxidante, antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* y *Xanthomonas campestris* y antialimentaria

contra *M. persicae* y *R. padi*; además inhibe la oviposición de *B. tabaci*, y causa efectos letales en huevos y ninfas (Escalante-Rejón, 2013; Ruiz-Jiménez, 2011; Reyes-Estebanez, 2009).

4.1.4. Propiedades biológicas y químicas del género *Gliomastix*

En general, muy pocas especies pertenecientes al género *Gliomastix* han sido estudiadas, actualmente se reportan 37 especies pertenecientes a este género. Entre éstas, de dos cepas de las especies *G. murorum* se ha reportado actividad antimicrobiana. Zhao *et al* (2012) reporta 40 componentes, principalmente ácidos grasos, donde el ácido palmítico (15.5%) y el ácido (*E*)-9-octadecenoico (11.6%) son los componentes mayoritarios y poseen actividad antibacteriana. Adicionalmente, se identificaron el 6-pentil-5,6-dihidropiran-2-ona (9.7%) y ácido 7Z,10Z-hexadecadienoico (8.3%).

Del micelio de *G. murorum* Ppf8 se aislaron aceites activos contra *Magnaporthe oryzae* y *Xanthomonas vesicatoria* (Zhao *et al.*, 2009a; Zhao *et al.*, 2009b). De los metabolitos antimicrobianos reportan al ergosterol y el 2,3-dihidro-5-hidroxi- α,α -dimetil-2-benzofuranometanol (también llamado 2-(1-hidroxi-1-metil)-2,3-dihidrobenzofuranol). Este último aislado de *Acremonium* sp. con propiedades antioxidantes (Abdel-Lateff *et al.*, 2002).

Por lo mencionado anteriormente, los extractos orgánicos de *G. masseei* son sumamente interesantes para conocer los metabolitos responsables de sus propiedades insecticidas y desarrollar a futuro plaguicidas eco-amigables. En el presente trabajo se propuso llevar a cabo la purificación e identificación química de los metabolitos producidos por la cepa *G. masseei* a través de bioensayos guiados de repelencia contra *B. tabaci*, *M. persicae* y *R. padi*.

4.2. Objetivos específicos

Ver Capítulo 1, sección 1.5 incisos a, b y c, página 15.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Cultivo de *Gliomastix masseei* en medio sólido

4.3.1.1 Suspensión de esporas y/o micelio

Ver Capítulo II. Apartado 2.3.3.1, página 24

4.3.1.2 Cultivo en arroz fermentado

Ver Capítulo II. Apartado 2.3.3.2, página 24

4.3.2 Preparación de los extractos orgánicos

4.3.2.1 Obtención de los extractos orgánicos fúngicos

Ver Capítulo II. Apartado 2.3.4, página 25

Los extractos crudos secos obtenidos de acetato de etilo AR-9a y AR-9a-1 (600 mg y 2.8 g) y los metanólicos AR-9b y AR-9b-1 (625 mg y 4.9 g), se mantienen a 4 °C en la oscuridad.

4.3.3 Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo

4.3.3.1 Partición líquido-líquido

Los extractos de AcOEt de cada lote se partitionaron entre hexano y acetonitrilo (3x, 3:1). Como resultado se obtuvieron las fracciones de baja polaridad ARGM-1A y 2A (246.2 mg y 1.5 g) y de mediana polaridad ARGM-1B y 2B (282 mg y 1.0 g), así como los precipitados ARGM-1C y 2C (17.3 mg y 9.9 mg). El disolvente se elimina por concentración a presión reducida a sequedad y las muestras se conservan en refrigeración a 4 °C.

4.3.3.2 ARGM-4. Reacción de metilación de ARGM-1A

La muestra ARGM-1A (20 mg) se resuspendió en 5 mL de acetona y se le adicionan 50-60 mg de carbonato de potasio con agitación constante. A los 20 min se le agrega 150 µL

de yodometano, y se mantiene a temperatura ambiente, en agitación constante por 48 h, donde se obtuvo la fracción ARGM-4 (19.6 mg) (Juvale *et al.*, 2013).

4.3.3.3 ARGM-3. Fraccionamiento por CC de ARGM-1B

El extracto ARGM-2B (282 mg) se fraccionó en una columna de cromatografía (20 cm de largo y 1.5 cm de diámetro) empacada con gel de sílice (60 GF₂₅₄) y se eluyó en el sistema de disolventes hexano: acetona (90:10), obteniendo como resultado 19 fracciones (ARGM-3A a ARGM-3S) (Figura 4.2).

4.3.3.3 ARGM-6. Fraccionamiento por CC de ARGM-2B

El extracto ARGM-2B (1 g) se fraccionó en una columna de cromatografía líquida al vacío (20 cm de largo y 2.5 cm de diámetro) empacada con gel de sílice (60 GF₂₅₄) y se eluyó en el sistema de disolventes hexano:diclorometano con gradiente de polaridad, obteniendo como resultado 15 fracciones (ARGM-6A a ARGM-6O) (Figura 4.2).

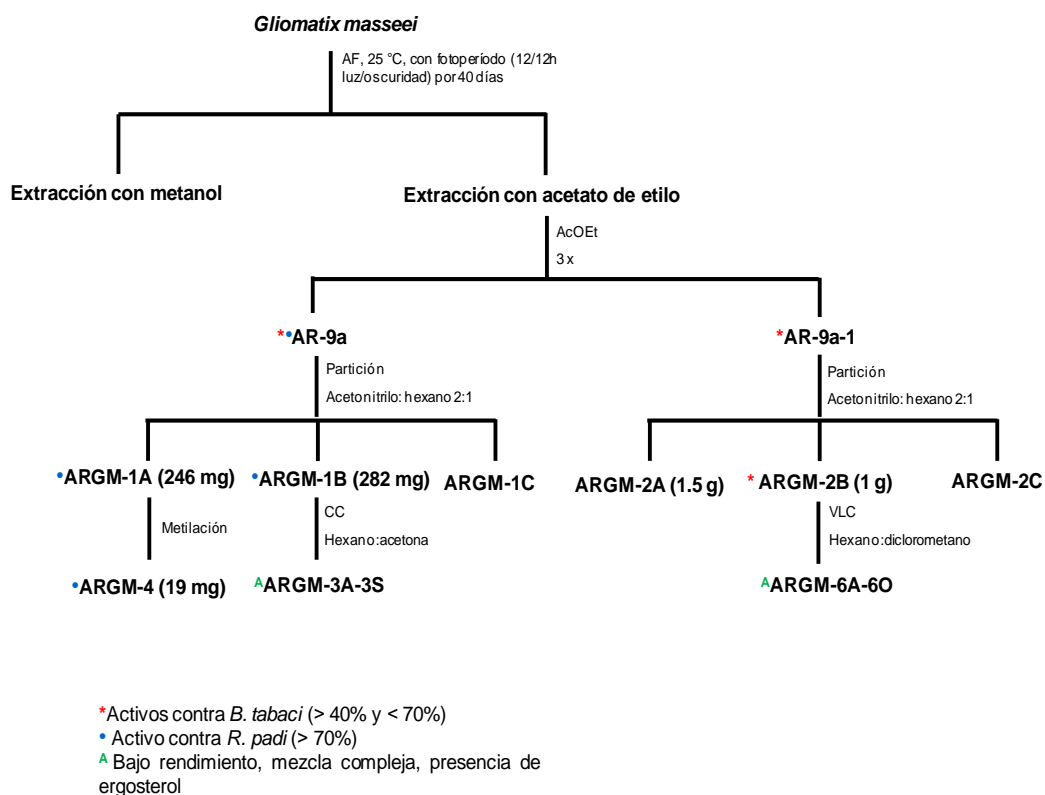


Figura 4.2 Esquema de la partición y purificación del extracto de acetato de etilo *Gliomatix masseei*.

4.3.4 Fraccionamiento del extracto metanólico de *G. masseei*

4.3.4.1 ARGM-8. Separación de AR-9b

El extracto AR-9b (6.5 g) se fraccionó a través de columna líquida al vacío (6 cm de diámetro y 5 cm de altura) empacada con gel de sílice; se eluyó en el sistema de disolventes hexano-diclorometano con gradiente de polaridad hasta metanol al 100%, obteniendo 12 subfracciones nombradas ARGM-8A a ARGM-8L (Figura 4.3).



Figura 4.3 Esquema de purificación del extracto metanólico de *Gliomatix masseei*.

4.3.4.2 ARGM-11. Separación de ARGM-8F

El extracto ARGM-8F (58 mg) se fraccionó a través de una CC (40 cm de largo y 2 cm de diámetro) empacada con Sephadex LH-20 y se eluyó con metanol al 100%, se obtuvieron 7 subfracciones (ARGM-11A a ARGM-11G).

4.3.4.3 ARGM-13. Separación de ARGM-8L

El extracto ARGM-8L (500 mg) se fraccionó a través de una CC empacada con Sephadex LH-20 y se eluyó en el sistema de disolventes acetona: metanol (90:10), obteniendo 11 subfracciones (ARGM-13A a ARGM-13K).

4.3.4.4 ARGM-14. Separación de ARGM-8G

El extracto ARGM-8G (60 mg) se fraccionó a través de una CC (40 cm de largo y 2 cm de diámetro) empacada con Sephadex LH-20 y se eluyó con metanol 100%, obteniendo 10 subfracciones (ARGM-14A a ARGM-14J).

4.3.4.5 ARGM-18. Separación de ARGM-13J

El extracto ARGM-13J (140 mg) se fraccionó a través de una CC (40 cm de largo y 2 cm de diámetro) empacada con Sephadex LH-20 y se eluyó en el sistema de disolventes metanol 100%, obteniendo 7 subfracciones (ARGM-18A a ARGM-18G).

4.3.5 Aislamiento y purificación de los compuestos mediante diversas técnicas

Ver Capítulo II. Apartado 2.3.1, página 22.

4.3.6 Métodos espectroscópicos de identificación química

Para CG-EM y HPLC ver Capítulo II. Apartado 2.3.2.1 y 2.3.2.2, página 23.

4.3.7 Evaluación de la actividad biológica

4.3.7.1 Bioensayo de repelencia contra *Bemisia tabaci*

Ver Capítulo II. Apartado 2.3.7.1 página 28.

4.3.7.2 Bioensayo de establecimiento *Rophalosiphum padi*

Ver Capítulo II. Apartado 2.3.7.2 página 29.

4.3.7.3 Bioensayo de establecimiento de *Myzus persicae*

Las hojas de chile (*Capsicum annuum* var. *annuum*) se cortaron en discos de 2 cm² que se dividieron en dos mitades, las cuales se depositaron separadas sobre agar (insectagar) contenido en cajas transparentes de acrílico (3 × 3 × 1.5 cm) para el ensayo (Figura 4.4). Las muestras se prepararon a una concentración de 10 mg/mL. Una de las mitades del disco foliar se impregnó con 10 µL de la muestra (100 µg/cm²) y la otra mitad con el disolvente (10 µL) utilizado en la muestra. Posteriormente, se depositaron 10 áfidos en cada una de las cajas réplica y se incubaron por 24 h en forma invertida, a 22 ± 1 °C y con un fotoperiodo de luz/oscuridad 16:8, en condiciones de humedad. Un total de 22 repeticiones se emplearon en cada tratamiento (González-Coloma *et al.*, 2000).

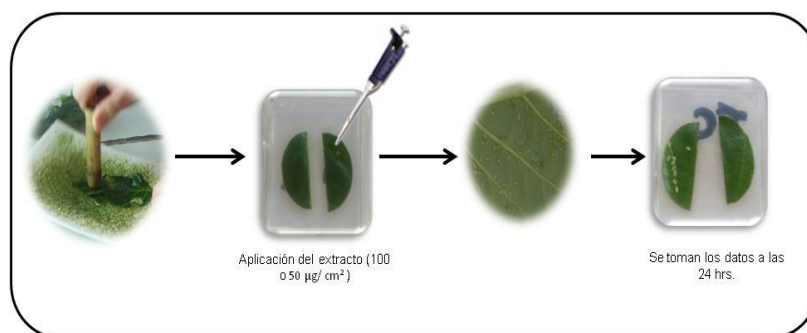


Figura 4.4 Esquema del bioensayo contra *Myzus persicae*.

4.4 Resultados y discusión

3.4.1 Extracto de acetato de etilo

Los extractos de acetato de etilo obtenidos de cultivos masivos de *G. masseei* se prepurificaron por partición entre hexano y acetonitrilo. En general, ambas fracciones muestran rendimiento similar (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1 Resultado de la partición de los diferentes lotes de cultivo de *Gliomastix masseei*.

Fracción/Lote	Lote 1 mg	Rendimiento (p/p) %	Lote 2 mg	Rendimiento (p/p) %
Hexánica	246.2	41.03	1551.5	58.45
Acetonitrilo	282	47	1018.8	38.38
Precipitado	17.3	2.9	9.9	0.37

P: peso en mg.

Posteriormente se evaluó el efecto de repelencia contra adultos de *B. tabaci*, *M. persicae* y *R. padi*, a una concentración de 10 mg/mL. Los datos obtenidos de las evaluaciones de los diferentes lotes de *G. masseei* MR36 (AR-9a, AR-9a-1) causaron IAO de -0.36 y -0.20 contra *B. tabaci*, respectivamente, así mismo el porcentaje de repelencia efectiva fue menor de 30% (Figura 4.5). Escalante-Rejón (2013) reporta que el extracto AR-9a inhibe la oviposición de *B. tabaci* en 80% y tiene efectos letales contra la ninfas (mortalidad de 90%). Sin embargo, en este estudio la actividad disminuyó en un 50%, lo que sugiere que el extracto pierde efectividad con el tiempo.

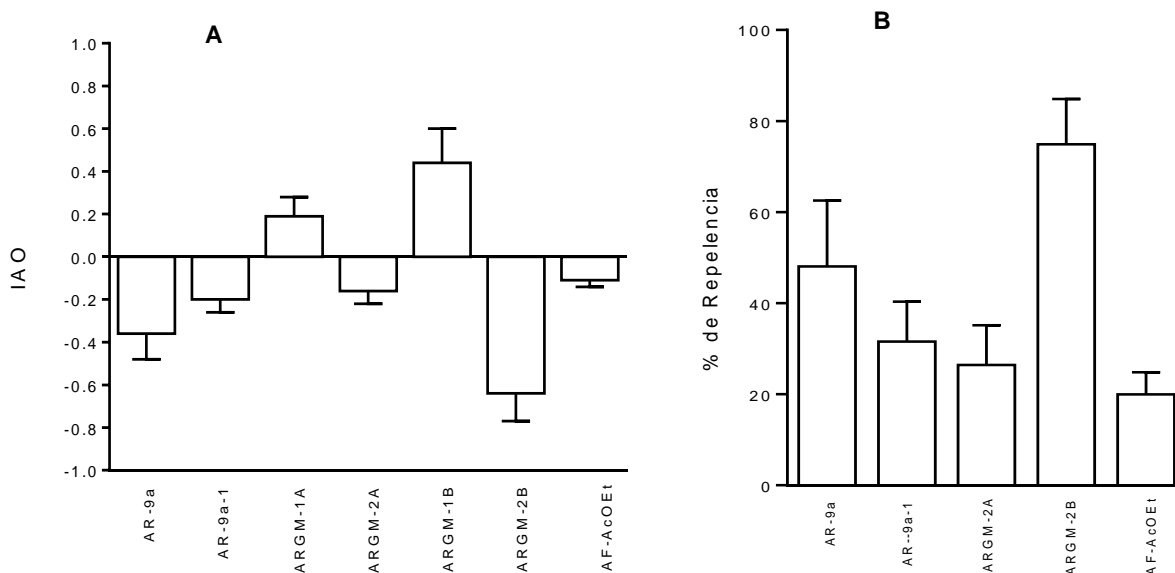


Figura 4.5 A: índice de la actividad de oviposición (IAO) de tres extractos obtenidos de *Glliomastix masseei*. **B:** Porcentaje de repelencia efectiva de los extractos con AIO negativo.

Para continuar con la purificación de ambos lotes, estos se fraccionaron con una partición líquido-líquido, donde se obtuvieron dos fracciones de baja (ARGM-1A, ARGM-2A) y dos de mediana polaridad (ARGM-1B y ARGM-2B). Las fracciones de baja y mediana polaridad (ARGM-1A y ARGM-1B) del extracto crudo AR-9a causó un IAO positivo (Figura 4.5 A). Caso contrario, se observó que las fracciones ARGM2-A y ARGM-2B causaron un IAO negativo (-0.16 y -0.64 , respectivamente). Con base en estos resultados se calculó la repelencia efectiva. ARGM-2B tuvo mayor efecto para repeler a *B. tabaci*. El efecto de esta fracción fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$) al del extracto blanco (arroz fermentado, AF-AcOEt) (Figura 4.5 B).

Las evaluaciones de la actividad del extracto AR-9a contra los pulgones *M. persicae* y *R. padi* mostraron porcentajes de inhibición del establecimiento de 91.7 y 92.1%,

respectivamente (Ruiz-Jiménez, 2011). Por lo descrito anteriormente las fracciones obtenidas se evaluaron contra ambos áfidos.

La fracción hexánica (ARGM-1A) y de acetonitrilo (ARGM-1B) demostraron tener efecto contra *M. persicae* con porcentajes de IE de 87.7% y 92.5%, respectivamente. En el caso de *R. padi* se obtuvieron porcentajes de IE de 70.8 y 76.5%, respectivamente. La actividad se detectó en las fracciones de baja y mediana polaridad. Debido a los resultados obtenidos, la fracción hexánica (ARGM-1A) y su derivado metilado (ARGM-4) se analizaron por CG-EM, donde se observó la presencia de cuatro ácidos como componentes mayoritarios (Cuadro 4.2). Los ácidos grasos detectados corresponde a los ácidos hexadecanoico (16:0), octadecanoico (18:0), 9-octadecenoico (18:1) y 9-12 octadecadienoico (18:2). Los compuestos más abundantes correspondieron a los ácidos hexadecanoico (74%) y 9-12 octadecadienoico (16.81%).

Debido a que la fracción hexánica no fue activa contra *B. tabaci*, no se continuó con la evaluación contra este insecto, pero sí contra las dos especies de áfidos, donde se observó buena actividad.

Adicionalmente, se evaluó la fracción metilada contra ambos áfidos y se observaron valores de IE de 76.6% para *M. persicae* y 84.1% para *R. padi* (Cuadro 4.3). También se evaluaron los ésteres de metilo de los ácidos grasos (hexadecanoico, ácido 9-octadecanoico y ácido 9,12-octadecenoico).

El hexadecanoato de metilo mostró actividad moderada contra *M. persicae* y *R. padi*, cuyos valores de IE fueron 69.4 y 61.8%, respectivamente, estos resultados son similares a los reportados por Santana *et al.* (2012). El 9-octadecenoato de metilo tiene un efecto contra ambas especies de áfidos, mientras que el 9,12-octadecadienoato de metilo sólo inhibe el establecimiento del *M. persicae* (IE = 70%). Estudios previos reportaron el efecto antialimentario de los ácidos libres contra áfidos (Castillo *et al.*, 2010).

Cuadro 4.2 Componentes de la fracción ARGM-1A y su derivado metilado (ARGM-4) detectados en el análisis de su CG-EM.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Abundancia relativa (%)
Fraction ARGM-1A		
Hexadecanoato de metilo	9.88	15.0
Hexadecanoato de etilo	10.88	3.0
9,12-Octadecadienoato de metilo	11.82	17.8
9-Octadecenoato de metilo	11.91	9.3
9,12-Octadecadienoato de etilo	12.46	5.4
ARGM-4		
Hexadecanoato de metilo	9.58	75.0
9,12-Octadecadienoato de metilo	11.49	3.0
9-Octadecenoato de metilo	11.59	16.8
Octadecanoato de metilo	11.86	4.0

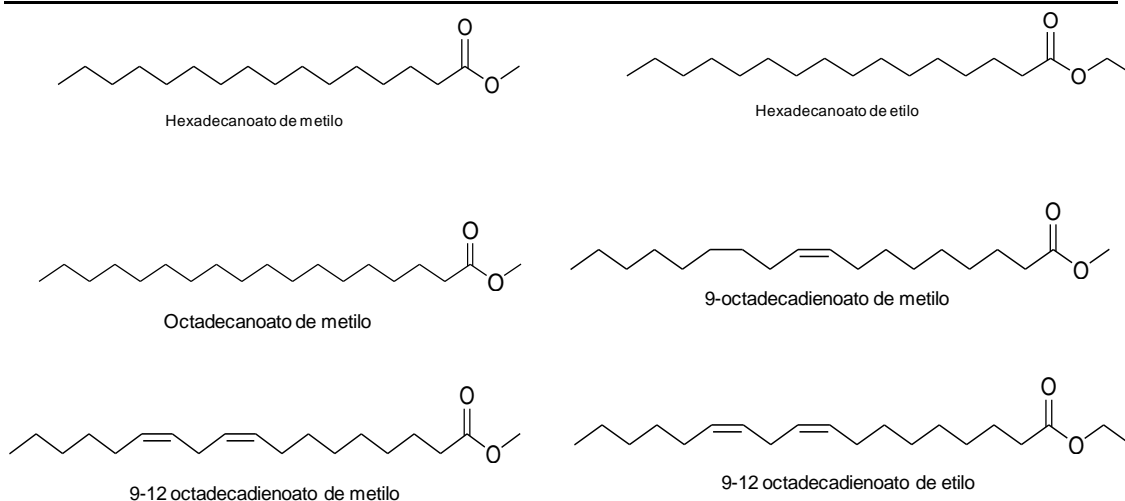


Figura 4.6 Estructuras de los metil ésteres de los ácidos grasos detectados.

Cuadro 4.3 Efecto de la inhibición del establecimiento de la fracción hexánica (ARGM-1A) y su derivado metilado (ARGM-4), ésteres metilados contra *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi* a 50 µg/ cm².

Muestra	IE (%)	
	<i>Myzus persicae</i>	<i>Rhopalosiphum padi</i>
ARGM-1A (Fracción hexánica)	87.7 ± 3.8	70.8 ± 4.6
ARGM-4 (Metilado)	76.7 ± 4.0	84.1 ± 3.3
Hexadecanoato de metilo	69.6 ± 4.4	61.8 ± 4.4
9-Octadecenoato de metilo	83.5 ± 3.7	71.4 ± 4.4
9,12-Octadecadienoato de metilo	76.1 ± 3.4	61.6 ± 4.9

IE: Inhibición del establecimiento

Cuadro 4.4 Dosis-respuesta de los ésteres de ácidos grasos más activos contra *Rhopalosiphum padi* y *Myzus persicae*.

Compuesto	Concentración µg/ cm ²	<i>M. persicae</i>		<i>R. padi</i>	
		IE (%)	CE ₅₀ (CL) µg/cm ²	IE (%)	CE ₅₀ (CL) µg/cm ²
9-Octadecenoato de metilo	50	83.5 ± 3.7	16	71.4 ± 4.4	35
	25	66.9 ± 8.6	(15, 17)	34.0 ± 6.5	(29, 41)
	12.5	38.8 ± 9.0		23.4 ± 6.7	
9,12-Octadecadienoato de metilo	50	76.2 ± 3.4	20	nt	
	25	52.7 ± 9.0	(18, 22)		
	12.5	41.0 ± 9.0			

La evaluación de dosis-respuesta de los ésteres de ambos ácidos grasos mostró que el 9-octadecenoato de metilo es más activo, con una CE_{50} de 16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y 35 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ contra *M. persicae* y *R. padi*, respectivamente. El 9,12-octadecadienoato de metilo, en contraste, sólo fue activo contra *M. persicae* ($CE_{50} = 20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) (Cuadro 4.4).

En general, se observó que durante la purificación del extracto, la actividad de la inhibición del establecimiento disminuye para *R. padi*, de 91.0% (extracto crudo) a 70% (fracción de baja polaridad) y 76% (fracción de mediana polaridad). Esto indica un efecto sinergista entre algunos metabolitos de la mezcla.

Los efectos de algunos ácidos grasos y sus derivados sobre insectos plagas han sido reportados (Santa *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2010). El ácido 9,12-octadecadienoico muestra actividad contra *Aedes aegypti*, *Callosobruchus maculatus*, *Lymantria dispar*, *Liposcelis bostrychophila* y *Malacosoma disstria*; ácido 9-octadecenoico sobre *Anopheles aegypti* y *Anopheles stephensi*; el ácido 9,12-octadecadienoico, hexadecanoico y octadecanoico sobre *Spodoptera frugiperda* (Kannathasan *et al.*, 2008; Abedowale y Adedire, 2006; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2001). Los ácidos grasos insaturados pueden ser extraídos de plantas y de hongos. Éstos han sido reportados de diferentes especies de hongos, tales como *Aspergillus ustus*, *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp., y *Rhizopus oryzae* (Oleinikova *et al.*, 2011; Oda *et al.*, 2003; Ruess *et al.*, 2003), entre otros.

La purificación de las fracciones de mediana polaridad (ARGM-1B y 2B) mostró la presencia del ergosterol por comparación directa con su estándar ($R_f = 0.37$, sistema hexano:acetona (85:15)). Por lo tanto, este compuesto se evaluó contra los tres insectos (*B. tabaci*, *M. persicae* y *R. padi*) y se observó bajo efecto frente a los tres insectos, siendo estadísticamente iguales ($P \leq 0.01$) (Cuadro 4.5). El ergosterol es oxidado en presencia de luz a endoperoxido de ergosterol, por ello, aunque no fue detectado en las subfracciones, se decidió evaluarlo. Los resultados muestran que tiene baja actividad frente a *M. persicae* (Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5 Resultado de la actividad del ergosterol y endoperóxido de ergosterol contra tres insectos.

Muestras/Insecto	<i>B. tabaci</i>	<i>M. persicae</i>	<i>R. padi</i>
	RE (%)	IE (%)	
Ergosterol	58.38	51.81	51.46
Endoperóxido de ergosterol	0	64.38	38.57

RE: repelencia efectiva; IE: inhibición del establecimiento.

Hay reportes de la actividad biológica del ergosterol, principalmente antimicrobiana (Zhao *et al.*, 2012; Cai *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2005), pero no hay reportes sobre su efecto contra insectos.

Debido al bajo rendimiento y a la complejidad de las fracciones de *G. masseei* obtenidas no se siguió trabajando con ellas.

La actividad del extracto crudo de *G. masseei*, comparado con las fracciones, sugieren que el efecto de inhibición del establecimiento se deba a efectos de sinergismo entre los componentes conocidos y minoritarios no conocidos.

4.4.2 Extracto metanólico

El extracto metanólico de los diferentes lotes del cultivo masivo de *G. masseei* (AR-9b y AR-9b-1) se evaluaron contra *B. tabaci*, siendo el principal modelo para purificación semibiodirigida.

Los resultados mostraron que ambos extractos causaron un IAO negativo y un porcentaje de repelencia mayor al 50% (Figura 4.7). En estudios previos se reportaron efectos letales en ninfas (mortalidad de 82%) y en huevos (mortalidad de 99%) de *B. tabaci* (Escalante-Rejón, 2013). También se ha evaluado contra *R. padi*, obteniendo porcentajes de inhibición del establecimiento de 74% (Ruiz-Jiménez, 2011).

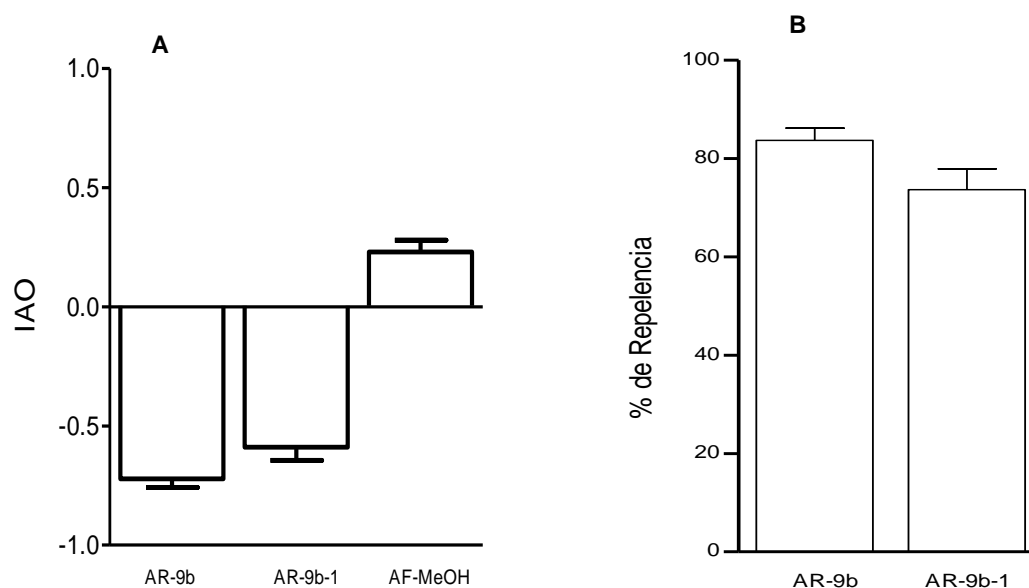


Figura 4.7 A. Índice de la actividad de oviposición (IAO) de dos extractos metanólicos (AR-9b, 9b-1) obtenidos de *Gliomastix masseei*. **B:** Porcentaje de repelencia efectiva de los extractos con AIO negativo.

Por lo anterior, ambos extractos se fraccionaron y se evaluaron contra *B. tabaci*. Los resultados mostraron que las subfracciones causaron un IAO menor a -0.18 (Figura 4.8 A), por lo que se calculó el porcentaje de RE para cada subfracción (Figura 4.8 B). Las subfracciones ARGM-8F y ARGM-8L causaron porcentajes de RE de 68 a 75.4%, respectivamente. El resto de las subfracciones causó menos del 60% de RE, siendo estadísticamente diferentes ($P \leq 0.01$) ARGM-8L (Figura 4.8 B).

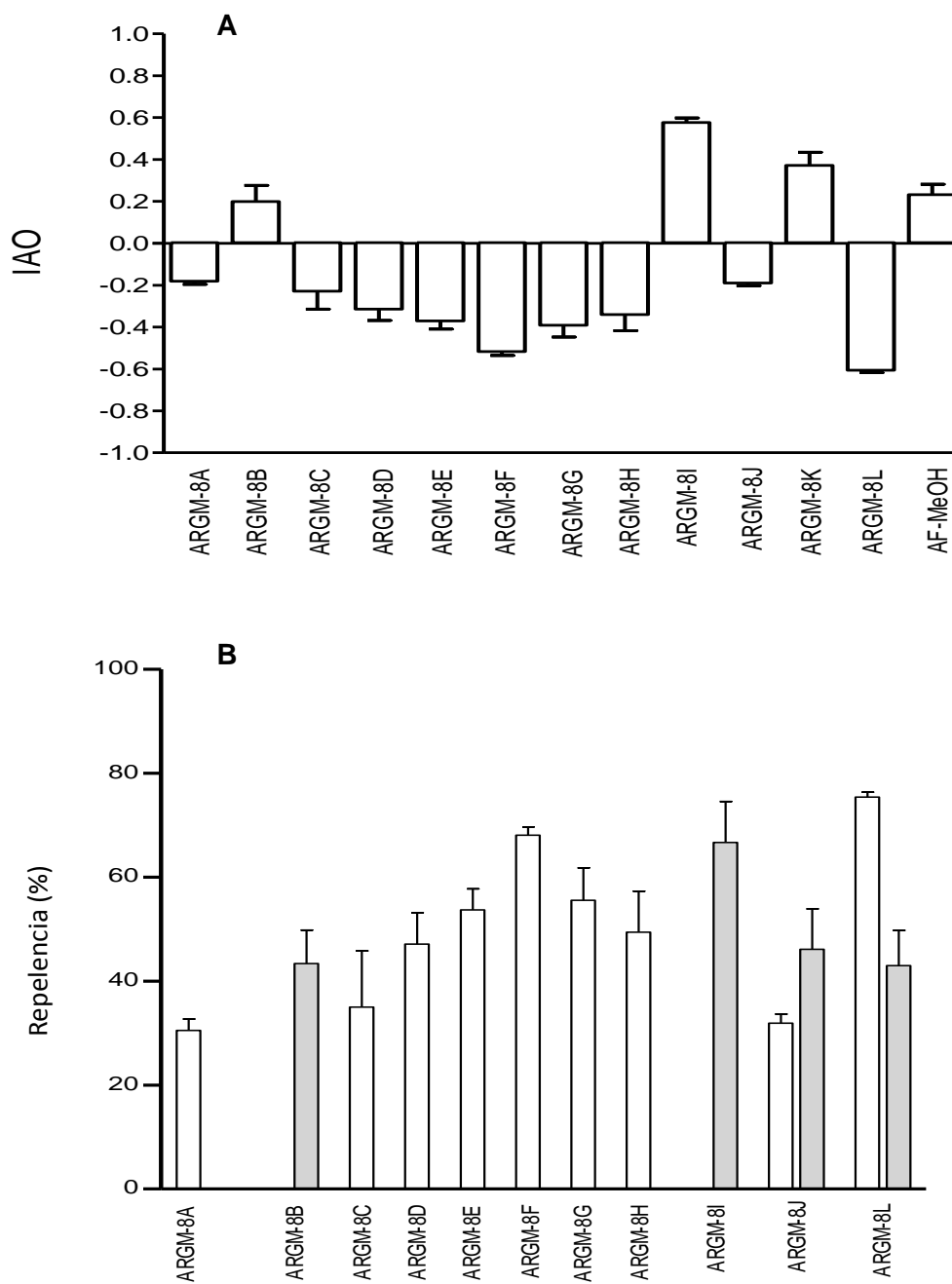


Figura 4.8 A: Índice de la actividad de oviposición (IAO) contra *Bemisia tabaci*. **B:** Repelencia, barras blancas (*Bemisia tabaci*) y barras grises (*Rhopalosiphum padi*).

De acuerdo al rendimiento de cada subfracción, se seleccionaron las subfracciones ARGM-8B, ARGM-8I, ARGM-8J y ARGM-8L para ser evaluados contra *R. padi*. Los resultados mostraron que las subfracciones tuvieron una actividad mayor al 40% (Figura 4.8B). ARGM-8B y ARGM-8I tienen ligera actividad sobre *R. padi*, pero no contra *B. tabaci*. Contrariamente, ARGM-8L mostró efecto contra ambas especies de insectos, esto se debe a la composición de la subfracción y la sensibilidad de ambos insectos.

Para continuar con el proceso de purificación, se seleccionaron las subfracciones ARGM-8F, ARGM-8G y ARGM-8L por su alta actividad contra *B. tabaci*.

El fraccionamiento sucesivo biodirigido de la subfracción ARGM-8F guió a las subfracciones ARGM-11A – ARGM-11G, y para la subfracción ARGM-8G se obtuvieron las subfracciones ARGM-14A – ARGM-14J. De estas subfracciones se seleccionaron las de mayor rendimiento, las cuales fueron ARGM-11B, ARGM-11C, ARGM-11D, ARGM-14E y ARGM-14F. En la Figura 4.9A se observa que estas subfracciones causaron un IAO negativo (-0.59, -0.49, -0.40, -0.36 y -0.45, respectivamente), lo cual indicaron buen efecto de repelencia. Con estos datos se calculó el porcentaje de RE, donde se observó que la subfracción ARGM-11B tuvo la mayor actividad (RE, 74.3%), lo cual fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$) al efecto de ARGM-11D y ARGM-14E.

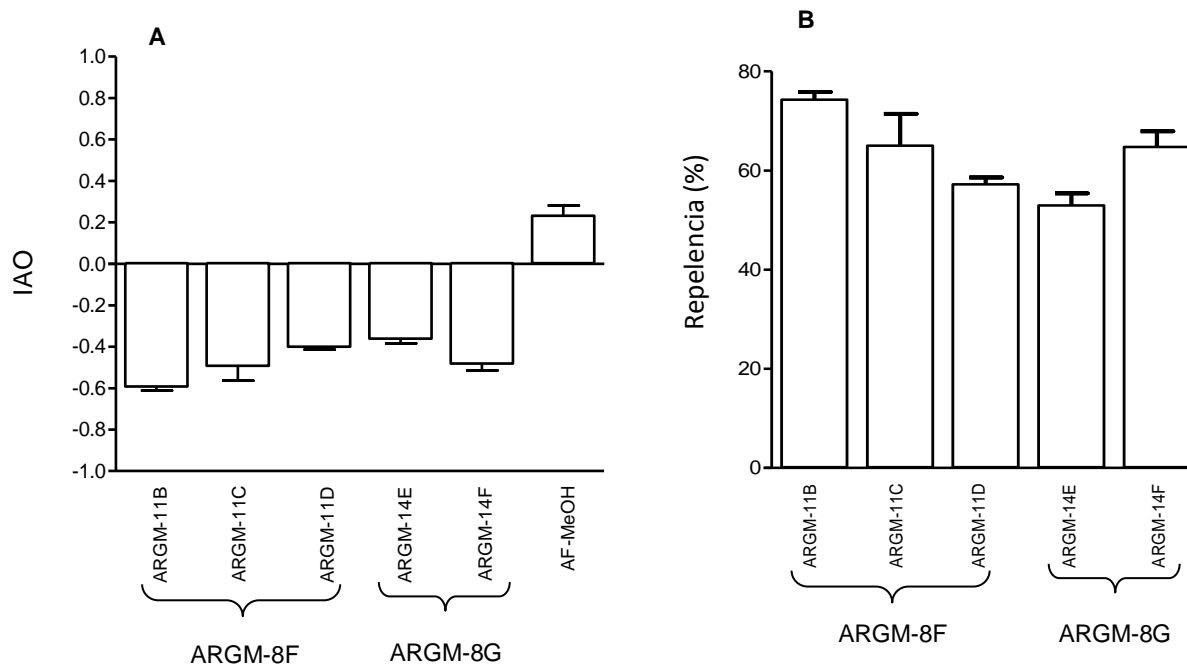


Figura 4.9 A: Índice de la actividad de oviposición (IAO) y **B:** Repelencia contra *Bemisia tabaci*.

Para determinar la complejidad de ARGM-11B y ARGM-14F, estas fracciones se analizaron por HPLC (Figura 4.10). Diversos componentes minoritarios se encuentran en ambas muestras. En el caso de ARGM-11B hay un componente principal con tiempo de retención de 3.4 min. ARGM-14F tiene dos componentes principales con tiempos de retención de 5.4 y 5.6 min, respectivamente.

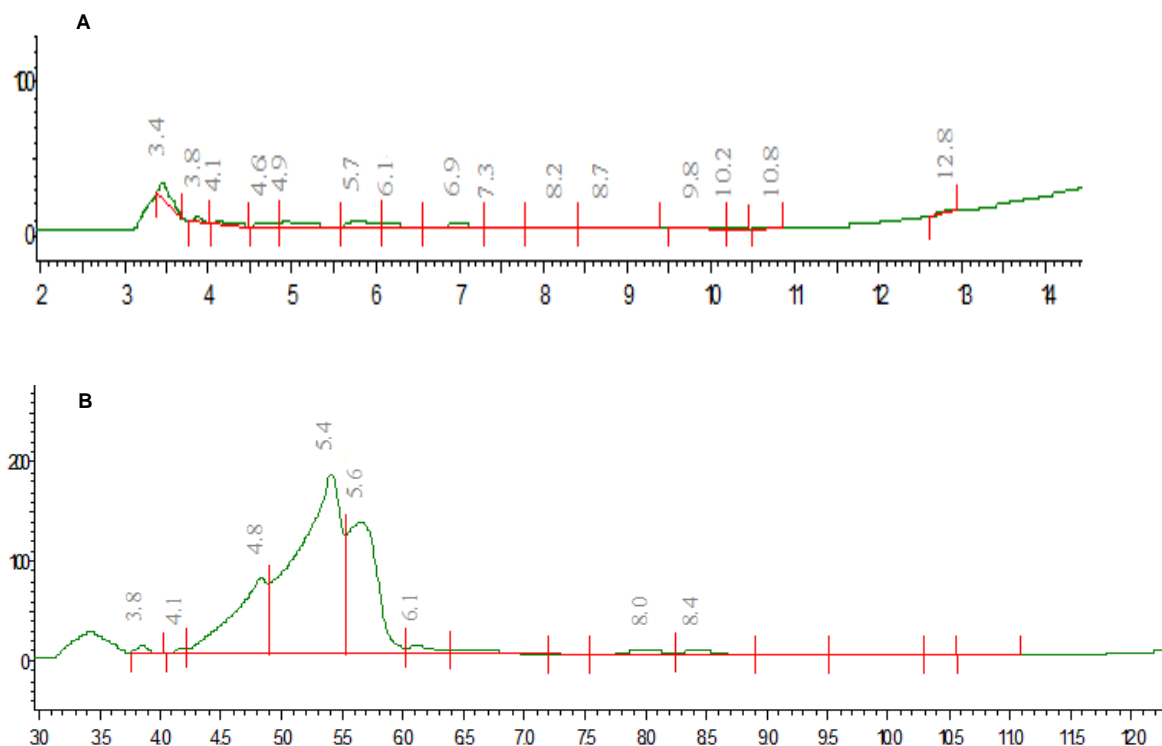


Figura 4.10 Cromatograma de HPLC de **A:** ARGM-11B y **B:** ARGM-14F, λ 210 nm, columna C18, metanol:agua (40:60).

Debido al bajo rendimiento de ambas subfracciones, no se continuó trabajando con ellas y no fue posible evaluarlas contra *R. padi*.

Ocho subfracciones obtenidas de ARGM-8L, se evaluaron contra *B. tabaci*, de las cuales cinco produjeron un IAO negativo, lo que mostraron actividad de repelencia (Figura 4.11 A). Por ello, se determinó el porcentaje de repelencia, y ARGM-13J y ARGM-13K causaron los porcentajes más altos (53.6 y 61% RE, respectivamente). En el análisis comparativo no hubo diferencia estadística significativa entre el efecto de ambas

subfracciones, pero el efecto del resto de las subfracciones evaluadas sí fue estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$).

Por el rendimiento y la actividad que presentó, ARGM-13J se evaluó contra *R. padi*, presentando actividad ligera (61.3%). Al comparar ARGM-13J contra *R. padi* y *B. tabaci*, el análisis estadístico indicó que no hay diferencia significativa ($P \leq 0.01$) entre el efecto en ambos insectos, lo que sugiere su uso para repeler a *R. padi* y *B. tabaci*.

Con los resultados mencionados anteriormente, se siguió con la purificación de la subfracción ARGM-13J, guiando a las subfracciones ARGM-18A – ARGM-18G. La subfracción ARGM-18B se analizó por HPLC-EM (Figura 4.12).

En el HPLC acoplado a masas se observaron componentes minoritarios, la base de datos mostró el peso molecular y la estructura de dos componentes. El componente con tiempo de retención de 7.6 min tiene un peso molecular de 318.27 ($C_{24}H_{38}O_4$) y a 8.0 min un peso molecular de 278.15 ($C_{16}H_{22}O_4$), los cuales no coinciden con ninguno de los componentes de la base de datos del equipo.

En resumen, la complejidad de las subfracciones se determinó por medio del HPLC, lo que permitió deducir que *G. masseei* produce diversos compuesto minoritarios, esto se ve reflejado en la actividad de repelencia contra *B. tabaci*, ya que dichas subfracciones fueron activas, pero no se continuó con la purificación por los bajos rendimientos. La actividad puede deberse a la mezcla de los compuestos minoritarios presentes en las subfracciones activas.

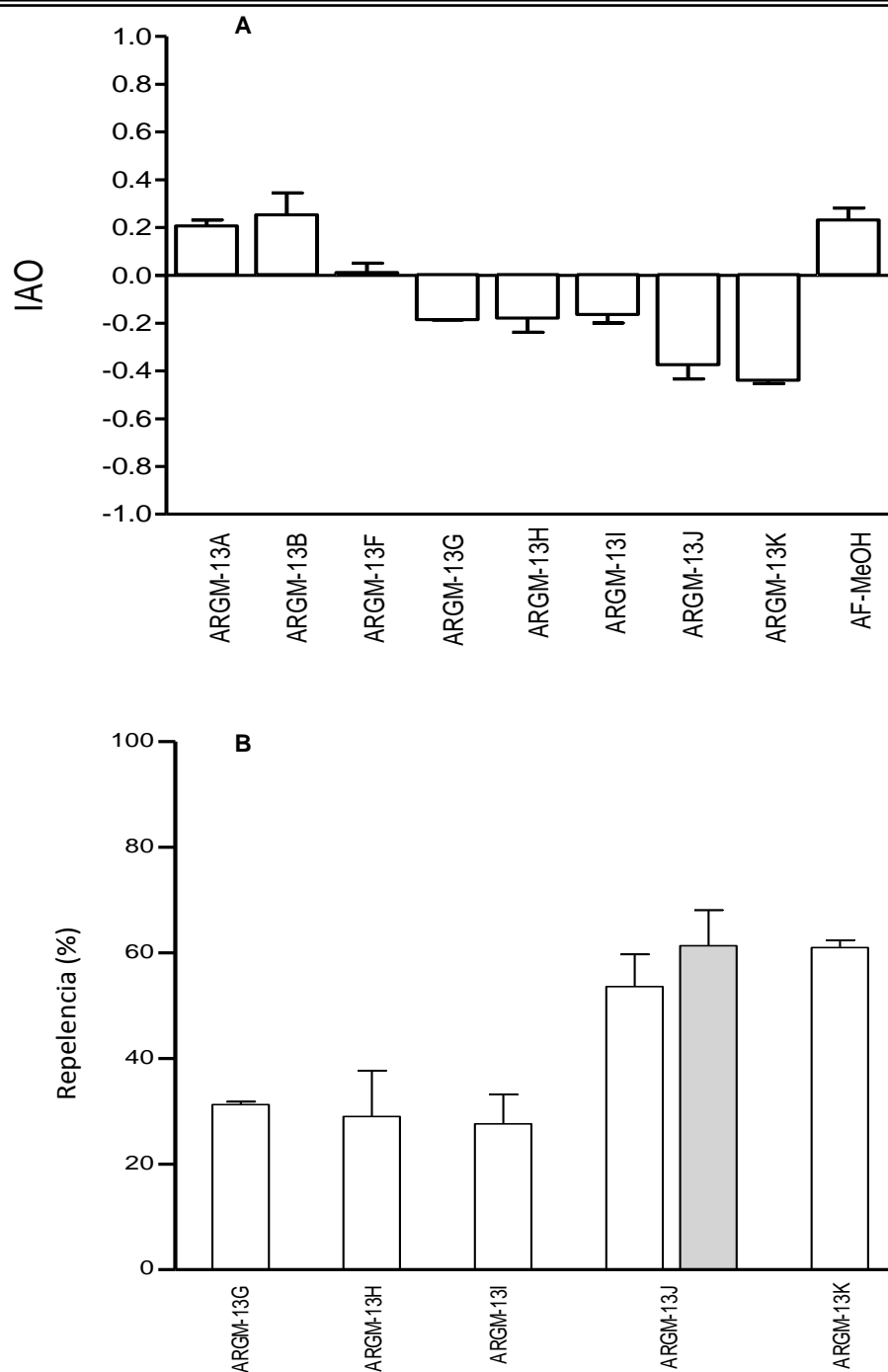


Figura 4.11 A: Índice de la actividad de oviposición (IAO) contra *B. tabaci*. **B:** Porcentaje de repelencia, barras blancas (*Bemisia tabaci*) y barras grises (*Rhopalosiphum padi*).

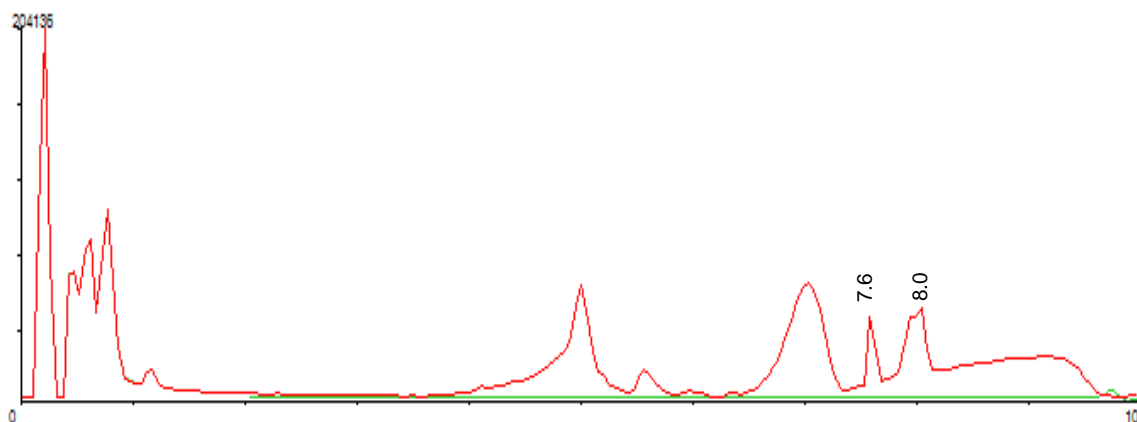


Figura 4.12 Cromatograma de HPLC-EM de ARGM-18B, λ 210 nm, columna C18.

4.5 Conclusiones

- La fracción de baja polaridad del extracto de acetato de etilo de *G. masseei* se caracterizó por estar compuesta por ácidos grasos de cadena larga e insaturados, donde el éster metilado del ácido 9-octadecanoico fue el más activo contra *R. padi* a la CE_{50} de $35 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- El extracto metanólico de *Gliomastix masseei* inhibe la oviposición de *Bemisia tabaci*, siendo un candidato para el control de esta.

CAPÍTULO V. Exploración del posible mecanismo de acción de ácidos grasos en tejidos epiteliales de insectos

En este capítulo se analizan los compuestos que presentaron actividad contra *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*, que principalmente fueron los ácidos grasos. La finalidad es saber qué daños están ocasionando a nivel fisiológico en un insecto modelo, que para este estudio se utilizó a *Achatea domesticus*.

5.1 Antecedentes

Los ácidos grasos (AG) consisten de una cadena hidrocarbonada y originada de la vía de los policétidos. En los sistemas biológicos, la cadena usualmente contiene entre 10 y 28 átomos de carbono. Los AG pueden ser saturados e insaturados; los primeros tienen enlaces simples entre carbonos (C-C), mientras que los insaturados poseen uno o más dobles enlaces en la cadena de carbono (C=C) (Desbois *et al.*, 2010).

Los AG provienen de una amplia gama de fuentes biológicas, incluyendo animales, plantas, algas y hongos, entre otras. En los hongos se han reportado tanto ácidos grasos saturados como insaturados, tales como los ácidos hexadecanoico, octadecanoico, tetradecanoico, 9Z-octadecenoico (Zhao *et al.*, 2012; Ruess *et al.*, 2002).

Se reportan diversas actividades biológicas de los AG, dentro de las cuales la toxicidad y el efecto fumigante ha sido documentado en el control de *Blattella germanica* (Sims *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2010) y en varias especies de áfidos. También se ha reportado su actividad de repelencia (Santana *et al.*, 2012; Castillo *et al.*, 2010). Por otro lado, se ha deducido que el largo de la cadena y el grado de insaturación es importante para su actividad biológica (Sims *et al.*, 2014).

En cuanto al mecanismo de acción, hay poca información reportada de este tema. Los autores sugieren que es muy similar al mecanismo que presentan las sales de los ácidos

grasos, los cuales penetran a través de la cutícula de los insectos y causan un daño a la membrana celular (Sims *et al.*, 2014) . Los efectos de los ácidos grasos se encuentran principalmente estudiados en la membrana plasmática de las bacterias (Desbois *et al.*, 2010).

No hay reportes sobre el mecanismo de acción de los AG en tejidos internos de los insectos, en particular, en tejidos epiteliales del sistema excretor. Sin embargo, hay otros compuestos que se han evaluado, como la destruxina, que es un metabolito fúngico que causa alteración en el intestino medio, tubos de Malpighi y hemocitos circulantes (Ruiz *et al.*, 2010; Dumas *et al.*, 1996). Otro metabolito fúngico es la beauvericina, que forma complejos con los iones Na⁺ y K⁺ que causan el incremento de la permeabilidad natural y artificial de las membranas (Mikaleva *et al.*, 1971).

Por todo lo anterior, en el presente estudio se planteó el objetivo de establecer el mecanismo de acción de los ácidos grasos que están presentes en los hongos estudiados, mediante bioensayos a nivel fisiológico utilizando como modelo los tubos de Malpighi de *Acheta domesticus*.

5.2 Objetivos específicos

Ver Capítulo 1, sección 1.5 incisos d, página 15.

5.3 Materiales y métodos

Los estándares de AG se obtuvieron de Sigma-Aldrich.

Los metilados de los ácidos grasos, se prepararon como se indica en el capítulo IV, apartado 4.3.3.2, página 56

Las muestras se prepararon a una concentración inicial de 100 mM con etanol. Posteriormente se tomaron alícuotas y se aforaron con la disolución salina para hacer diluciones seriadas, hasta tener una concentración de 5 mM, la cual se empleó en el bioensayo.

5.3.1 Cría de insecto (*Acheta domesticus*)

Los insectos se obtuvieron y se mantuvieron a 28 °C, con agua destilada. Los adultos de *A. domesticus* se emplearon en los bioensayos.

Este estudio comprendió una serie de experimentos que permitieron evaluar el efecto de los ácidos grasos en la tasa de secreción, así como variaciones en la concentración y flujo de iones (Na^+ y K^+) y del pH en el fluido secretado por los tubos de Malpighi de *A. domesticus*.

5.3.2 Disección de los túbulos de Malpighi

Las patas traseras de los insectos se sujetan y se decapitan con una ayuda de una tijera. Posteriormente se corta la cutícula de la parte ventral del cuerpo en dirección longitudinal. El insecto se fija para su disección con alfileres bajo una disolución salina de incubación (Cuadro 5.1), se sujetan sus patas en dirección contraria al cuerpo, para evitar que los túbulos de Malpighi (TM) se enreden. Se aparta el cuerpo grasoso y traquéolas del insecto para exponer los TM, y mediante una pinza de disección se cortan los TM y se extraen del cuerpo del insecto. Finalmente, se cortan individualmente los TM que se usan en los bioensayos.

Cuadro 5.1 Composición de la disolución salina de incubación para los tubos de Malpighi de *Acheta domesticus*.

	Concentración (mmol ⁻¹)
Cloruro de sodio	100
Cloruro de potasio	8.6
Cloruro de calcio	2
Cloruro de magnesio	8.5
Bicarbonato de sodio	4
Bifosfato de sodio	4
Hidróxido de sodio	11
Hepes	10
Glucosa	25
Prolina	24
pH ^a	7.2

^aAjustado usando NaOH y HCl.

5.3.3 Ensayo de secreción del fluido

El ensayo de secreción de fluido se llevó a cabo mediante la técnica de Ramsay (Coast, 1988). Después de la disección, inmediatamente se transfieren los TM con ayuda de un capilar de vidrio muy fino, de la cámara de disección a una gota de disolución salina (18 µL) depositada en una caja de Petri con el fondo recubierto de silicón elastómero transparente y sumergida en aceite de parafina. Los segmentos proximales de los TM se sacan de la gota de disolución salina y se fijan alrededor de un alfiler fino de acero, el cual está anclado en el fondo de la caja Petri. Las gotas del líquido secretado se recogen a intervalos de 30 minutos, utilizando un capilar de vidrio muy fino y se depositan en la parte inferior de la caja Petri. La primera gota secretada (control) se recoge a los 30 min, después se adiciona la muestra a la disolución salina de incubación. La segunda gota secretada (experimental) se recoge a los 30 min después de añadir la muestra. Después se calcula la tasa de secreción de antes y después de la adición del AG.

La tasa de secreción se calcula dividiendo el volumen de la gota secretada ($\pi d^3/6$), donde d es el diámetro medido usando un micrómetro ocular, por el tiempo de duración en que tarda en formarse una gota. La tasa de secreción se expresa como $\mu\text{l min}^{-1}\text{mm}^{-1}$, obtenido por la división del volumen por el tiempo de colección (min) y por la longitud del túbulo de Malpighi (mm).

La curva dosis-respuesta del AG activo fue calculada por medio de la siguiente serie de diluciones: 10, 1.0, 0.5, 0.1 y 0.01 mM.

5.3.4 Medición de la concentración de iones (Na^+ y K^+) y pH en el fluido secretado

La concentración de iones en el fluido secretado se mide con microelectrodos de iones selectivos (Na^+ , K^+ , H^+) descritos previamente por Coast *et al.* (2007). Los microelectrodos de K^+ se llenan con disolución de 0.5 M KCl, y la parte frontal se llena con un ionóforo K^+ I-coctel B; el microelectrodo de Na^+ , con 0.5 M NaCl, y la parte frontal se llena con el ionóforo de sodio II-coctel A. Para el microelectrodo selectivo de H^+ , 5M de citrato sódico, y la parte frontal se llena con el ionóforo de H^+ I-coctel B.

Las disoluciones se calibran y las pendientes de los microelectrodos quedan de la siguiente manera: Na^+ : 15 mM NaCl/135 mM LiCl y 150 mM NaCl (pendiente, 55.1 ± 0.5 mV); K^+ : 15 mM KCl/135 mM de NaCl y 150 mM KCl (pendiente, 58.2 ± 2 mV). Los microelectrodos selectivos de H^+ se calibraron en disolución salina ajustando el pH 6.5 y pH 7.5; la pendiente para una diferencia de una unidad de pH fue de 54.0 ± 0.53 mV. Los electrodos se conectaron a través de cables de plata a un amplificador ML165 pH Amp, que a su vez estaba conectado a un sistema de adquisición de datos PowerLab 4/30 (ADInstruments, Colorado Springs, CO).

La concentración de Na^+ y K^+ en la gota del fluido secretado se calcula utilizando la siguiente fórmula $[\text{Ion}] = C \times 10^{(\Delta V/\text{pendiente})}$, donde $[\text{Ion}]$ es la concentración del ion en la gota de líquido secretado; C es la concentración de iones en una de las disoluciones de calibración; ΔV es la diferencia de voltaje entre la gota de líquido secretado y la calibración de la disolución; y la pendiente es el cambio en el voltaje en respuesta a un cambio de la concentración del ión.

El flujo del ión ($\text{nmol min}^{-1} \text{mm}^{-1}$), se calcula como el producto de la tasa de secreción y la concentración de cada ión (mmol l^{-1}) en la gota obtenida. Se realizaron de siete a ocho repeticiones.

5.3.5 Análisis estadístico

Los resultados se expresan como medias \pm error estándar de la media de n repeticiones. La concentración media inhibitoria (IC_{50}) se obtuvo por análisis de regresión no lineal; las diferencias significativas entre medias se determinan mediante la prueba t de Student, usando GraphPad versión 3.06 para Windows (GraphPad Inc, La Joya, CA). Se consideraron las medias significativamente diferentes cuando $P \leq 0.05$.

5.4 Resultados

5.4.1 Tasa del fluido secretado

En la Figura 5.1 se muestra el efecto de los AG y sus ésteres a una concentración de 500 μM sobre la tasa de secreción del fluido. A esta concentración, el ácido dodecanoico fue el único que mostró efecto significativo sobre la tasa de secreción, el cual se redujo de 332.20 ± 29.10 a $226.28 \pm 24.12 \text{ pl min}^{-1}\text{mm}^{-1}$ mostrando una diferencia significativa ($P \leq 0.01$).

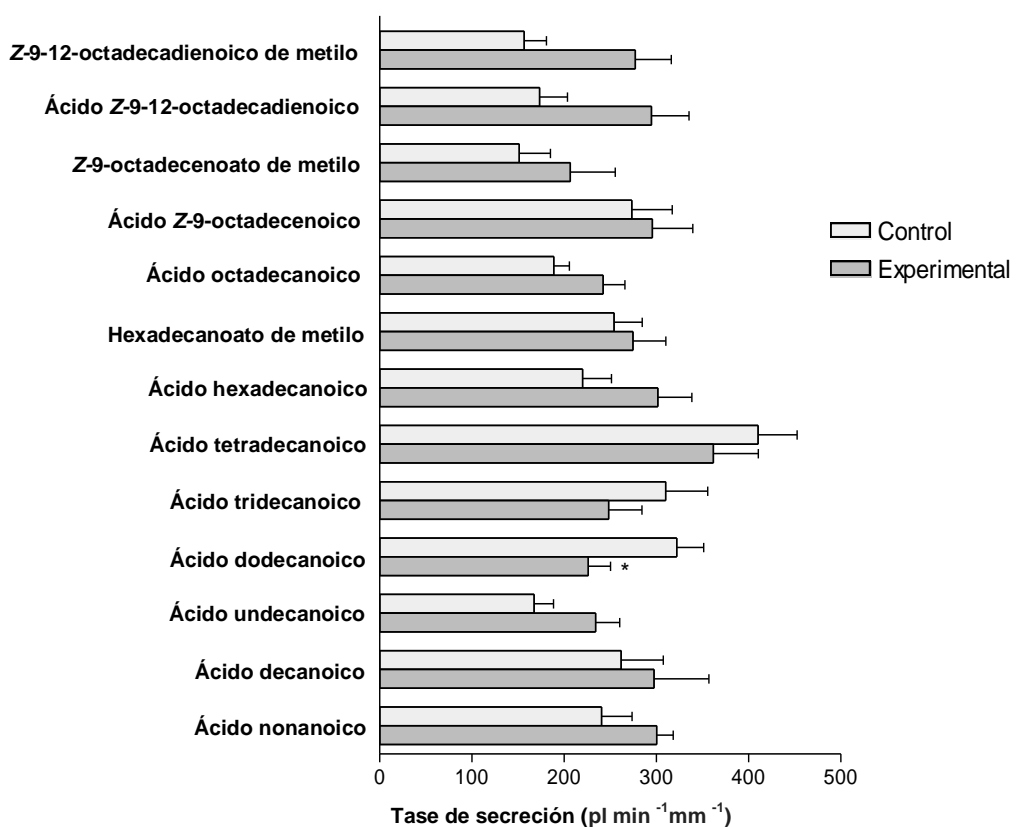


Figura 5.1 Efecto de los ácidos grasos y ésteres [500 μM] en la secreción del fluido de los tubos de Malpighi. Las barras representan la media del error estándar. * Indica que hay una diferencia significativa.

La curva de dosis-respuesta del ácido dodecanoico para la tasa de secreción del fluido se muestra en la Figura 5.2. La secreción de fluido decrece significativamente cuando los tubos son tratados a concentraciones más altas. La CI_{50} (concentración inhibitoria) calculada fue de 0.53 mM.

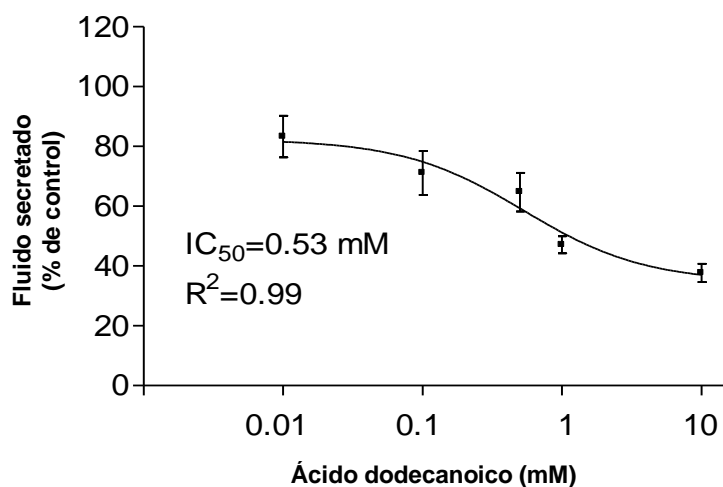


Figura 5.2 Curva de dosis-respuesta del efecto del ácido dodecanoico en la tasa de secreción del fluido de los tubos de Malpighi. Los tubos fueron puestos en una gota de disolución salina (20 μL) que contenía diferentes concentraciones del ácido dodecanoico. La primera gota secretada (control) se recogió a los 30 min, después se agregó el ácido dodecanoico a las concentraciones indicadas a la disolución salina. La segunda gota secretada (experimental) se recogió a los 30 min después de añadir el ácido dodecanoico. Después del cálculo de la tasa de secreción de antes y después de la adición del ácido dodecanoico, se calcula el porcentaje de inhibición de la secreción. Cada punto representa la media \pm MES de $n = 8$ tubos

5.4.2. Concentración de iones (K^+ y Na^+) y pH en el fluido secretado

Para determinar el efecto del ácido dodecanoico sobre la composición del fluido secretado, se midió la concentración de K^+ y Na^+ a intervalos de 40 min antes y después de adicionar 10 mM del ácido dodecanoico. A esta concentración, la tasa del fluido secretado decrece significativamente (226.17 a 88.97 $\text{pl min}^{-1}\text{mm}^{-1}$) (Figura 5.3).

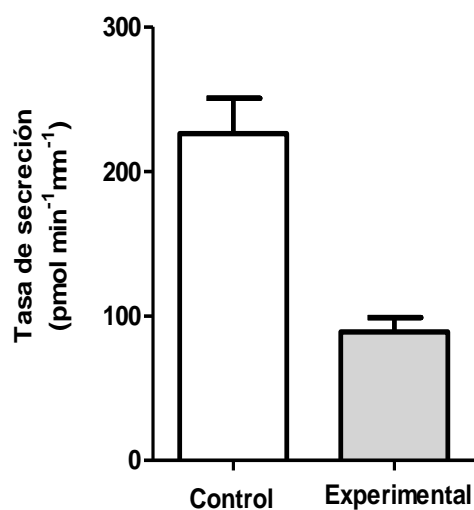


Figura 5.3 Efecto del ácido dodecanoico [10 mM] en la secreción del fluido de los tubos de Malpighi. La primera gota secretada (control) se recogió a los 30 min y la segunda gota secretada (experimental) se recogió a los 30 min después de añadir el ácido graso.

Después de agregar el ácido dodecanoico se observó un pequeño decremento en la concentración de K^+ (42.77 ± 6 a $36.79 \pm 6.3 \text{ mmol l}^{-1}$), sin embargo, no hay un cambio significativo en el fluido secretado (Figura 5.4). En contraste, hay un incremento significativo de la concentración de Na^+ en el fluido secretado de 45.24 ± 4 en el control a $64.62 \pm 10 \text{ mmol l}^{-1}$ en túbulos expuestos al ácido dodecanoico (Figura 5.4), siendo estadísticamente diferente ($P \leq 0.01$).

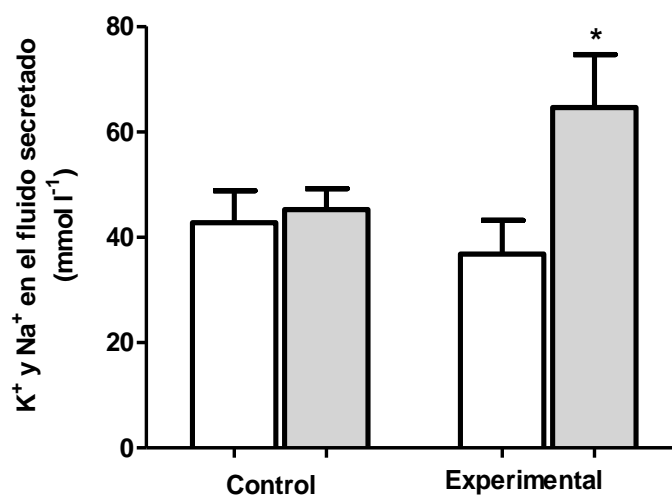


Figura 5.4 Concentración de K⁺ (barras blancas) y Na⁺ (barras grises) en el fluido secretado antes (control: no tratado) y después (experimental) de adicionar 10 mM del ácido dodecanoico.

El transporte de K⁺ y Na⁺, se calculó mediante la tasa de secreción y la concentración de cada ión en el fluido secretado. En éste se observó un decremento del flujo de K⁺ de 10.02 ± 1.5 a 3.31 ± 0.5 nmol min⁻¹mm⁻¹, por otra lado el Na⁺ presentó la misma tendencia (10.18 ± 1.3 a 6.15 ± 1.5) (Figura 5.5), siendo ambos estadísticamente diferentes al control ($P \leq 0.01$).

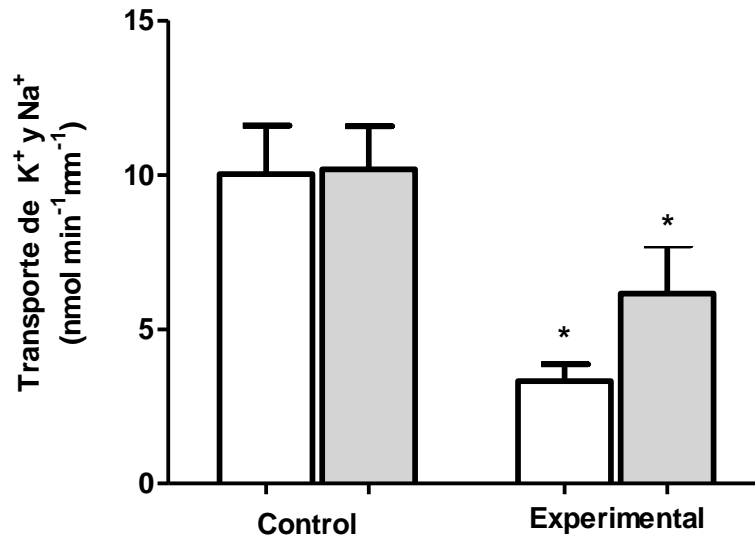


Figura 5.5 Transporte de K⁺ (barras blancas) y Na⁺ (barras grises) en el fluido secretado antes (control: no tratado) y después (experimental) de adicionar 10 mM del ácido dodecanoico.

Por otra parte, se midió el pH del fluido secretado de los túbulos de Malpighi, el cual varía de 6.9 a 6.8. No se observó ninguna diferencia ($P \leq 0.05$, $n = 7$) cuando se exponen a 10 mM del ácido dodecanoico con respecto al control (Figura 5.6).

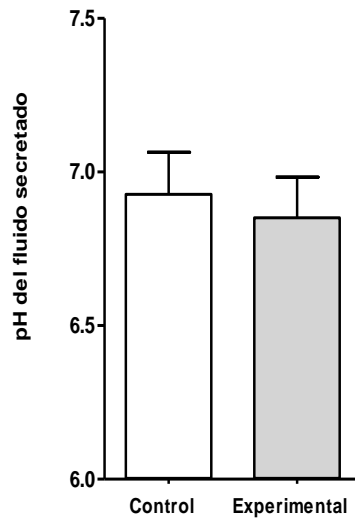


Figura 5.6 Efecto del ácido dodecanoico en el pH del fluido secretado de los tubos de Malpighi.

5.5 Discusión

Se han realizado varios trabajos con los ácidos grasos y sus ésteres, con diferentes actividades biológicas, sin embargo, hay poca información con respecto al posible mecanismo de acción sobre insectos. Estos estudios demostraron que la toxicidad de los ácidos grasos saturados aumenta con la longitud de la cadena (C10-C12), disminuyendo con ácidos de C14-C16, y aumenta nuevamente a partir de ácidos grasos con C18 saturados e insaturados. Se ha reportado que el hexadecanoato de metilo tiene efecto en células musculares de ácaros, afectando la integridad estructural de la membrana del retículo endoplasmático a una concentración 5 mg/mL y tiene un acaricida y repelente (Wang *et al.*, 2010). También sugieren que puede interferir con las acuaporinas, que son las que regulan el paso de iones y solutos en la membrana (Lai *et al.*, 2005). El ácido dodecanoico presenta actividad contra *B. tabaci* y *M. persicae*; a pesar de su actividad biológica, no se encontraron reportes en la literatura sobre su posible mecanismo de acción.

Por lo anteriormente mencionado, en el presente estudio se evaluaron los AG con los tubos de Malpighi, que son los encargados de la secreción. La secreción obtenida de los tubos está formada por el transporte de los iones Na^+ , K^+ y Cl^- en el lumen del tubo, y es el resultado de una compleja interacción de diferentes mecanismos de transporte iónico como bombas, canales y transportadores, que se encuentran distribuidos en la membrana celular (Coast *et al.*, 2012).

Los datos obtenidos muestran que las concentraciones de los iones en el fluido secretado expuestos a 10 mM ácido dodecanoico, pueden ser alterados. La concentración de K^+ no sufrió ningún cambio, sin embargo, la concentración de Na^+ aumenta considerablemente a expensas del K^+ . Estos datos son muy similares a los obtenidos por Ruiz-Sánchez *et al* (2012), donde evaluó el efecto de dextruxina A sobre los túbulos de Malpighi de *Drosophila melanogaster*. Otros compuestos que afectan el tejido epitelial de los tubos de Malpighi, como la bumetanida, también han mostrado en *Aedes aegypti* un decremento en el fluido secretado y aumento en la concentración de Na^+ en el fluido secretado (Scott *et*

al., 2004). La bumetanida también se ha evaluado en los tubos de Malpighi de *A. domesticus*, mostrando patrones similares a los resultados mostrados (Coast *et al.*, 2012). Se sabe que la bumetanida inhibe el cotransportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$ en los tubos de Malpighi, por ello la secreción del K^+ es afectada (Wiehart *et al.*, 2003; Ianowski *et al.*, 2001; Bladrick *et al.*, 1988). Por otra lado, trabajos anteriores sugieren que ciertos compuestos que inhiben la secreción de fluido en los tubos de Malpighi, como la bafilomicina o la destruxina, ejercen un efecto en la V-H+ATPasa apical, lo que puede ser monitoreado con el cambio de pH del fluido secretado por los tubos de Malpighi en algunas especies de insectos, como *Rhodnius prolixus* (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2010; Wiczoreck *et al.*, 2000). En este trabajo no se observó cambios significativos en el pH del fluido secretado después de adicionar el ácido dodecanoico a la disolución peritubular, lo que podría descartar la posibilidad que este compuesto actúe en la V-H+ ATPasa.

5.6 Conclusiones

- ✓ De los ácidos grasos evaluados, sólo el ácido dodecanoico mostró efecto en la secreción de fluido de los tubos de Malpighi de *A. domesticus*.
- ✓ La concentración inhibitoria (CI_{50}) del ácido dodecanoico es de 0.53 mM en los tubo de Malpighi de *A. domesticus*.
- ✓ La concentración de K^+ y H^+ en el fluido secretado no varió por efecto del ácido dodecanoico, sin embargo, la concentración de Na^+ incrementó significativamente.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

Los metabolitos fúngicos presentan una gran variedad de estructuras químicas, de diversa complejidad, y propiedades biológicas de reconocidas aplicaciones en farmacia y agricultura (Demian y Sánchez, 2009; Demian, 2014; Duke *et al.*, 2010). Esto ha sugerido la posibilidad de utilizar los principios activos de los hongos como herramienta de manejo de plagas agrícolas. El presente trabajo se dirigió a complementar el estudio micoquímico de *Acremonium murorum* y *Gliomastix masseei* biodirigido a través de ensayos de repelencia contra los insectos *Bemisia tabaci*, *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*.

Para llevar a cabo este trabajo, primero se reactivaron ambas cepas fúngicas y se verificó su pureza. Ambas cepas se identificaron previamente por taxonomía tradicional y molecular (Hurtado-Cantillo 2015; Moo Koh, datos no publicados). La comparación de las secuencias en el GenBank de *A. murorum* presentó un índice de identidad del 95%, comparado con una cepa depositada perteneciente a la especie *A. murorum* con número de accesión EF029216.1. Para *G. masseei* la secuencia de bases mostró un índice de identidad del 99%, comparado con la cepa *G. masseei* con número de accesión AB540554.1. Las discrepancias observadas pueden ser atribuidas a un polimorfismo en el genoma de las cepas.

El cultivo de las cepas masivo se realizó en un medio sólido de arroz fermentado, donde se observó que ambas cepas crecieron abundantemente en este medio. Al final del crecimiento, se realizó la extracción del cultivo sólido (micelio-arroz) de forma sistemática con dos disolventes de polaridad ascendente (AcOEt y MeOH), donde el extracto metanólico tuvo un mayor rendimiento que el acetato de etilo, esto sugiere que las cepas están produciendo componentes polares y complejos.

En cuanto a las evaluaciones de actividad biológica contra los insectos, las fracciones de baja y mediana polaridad de *G. masseei* fueron más efectivas contra *M. persicae* y *R. padi*. Con respecto a *Acremonium murorum*, las fracciones de baja y mediana polaridad mostraron poca efectividad contra las tres especies de insectos evaluados.

Durante el trabajo de purificación de los compuestos de *G. masseei* se detectaron ácidos grasos y sus derivados metilados, el compuesto más abundante correspondió al ácido

hexadecanoico, en la fracción de mediana polaridad se identificaron trazas de ergosterol. En *A. murorum* el ergosterol fue el compuesto principal y en menor proporción se encontraron los ésteres metilados del ácido hexadecanoico y octadecanoico, con ligera efectividad contra los tres insectos. A partir de la fracción de mediana polaridad de *A. murorum* se obtuvieron dos compuestos, uno novedoso nombrado como acremonetriol y el conocido glucósido de acreminín A derivado de hidroquinona, ambos con actividad moderada contra *M. persicae*.

Los extractos metanólicos de *G. masseei* fueron activos principalmente contra *B. tabaci* y presentaron actividad moderada contra *R. padi*. En una de las subfracciones del extracto metanólico de *A. murorum* se detectó el sespendol; este compuesto tuvo moderada actividad contra *B. tabaci* y *R. padi*.

En ambas cepas, las subfracciones ARAM-14E, ARAM-16F y ARGM-17D muestran complejidad al ser vistas en placa cromatográfica y numerosos componentes activos contra *B. tabaci*, llegando a aumentar la actividad al ser fraccionados.

Después de una búsqueda exhaustiva en la literatura, no se detectaron extractos fúngicos que hayan sido probados contra los tres insectos en estudio. Otros hongos o sus extractos de amplia aplicación en el control de insectos incluyen *Beauveria bassiana* y *Metharizium anisoplae*, los cuales producen beauvericina y destruxinas, principalmente (Vey *et al.*, 2001; Gupta *et al.*, 1995).

Los resultados de la identificación de ambas cepas mediante biología molecular y taxonomía tradicional, aunadas a su perfil químico y de actividad biológica, permitieron corroborar que ambas especies pertenecen a géneros diferentes. En la literatura estos dos géneros se encuentran en discusión constante, llegando a describir a todos como pertenecientes al género *Acremonium* (Sumerbell *et al.*, 2011).

Con las aportaciones del presente estudio se enriquece el conocimiento de la actividad biológica de *A. murorum* y *G. masseei* aisladas de las regiones tropicales del sureste de México. Estas son evidencias del potencial de aplicación de los metabolitos microbianos como productos biotecnológicos ecoamigables en el manejo de plagas en agricultura.

Debido a lo antes mencionado se considera importante continuar las investigaciones con las cepas de *A. murorum* y *G. masseei*, para optimizar la producción de los

extractos/principios activos a través de diferentes estrategias, tales como cambiar y/o modificar los medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Muy importante también sería continuar las evaluaciones a nivel vivero para determinar la efectividad de los mismos en estas condiciones, considerando también las evaluaciones de inocuidad.

Otra aportación complementaria e importante para este estudio fue evaluar el efecto de algunos compuestos a nivel fisiológico a través del ensayo de secreción de fluido de los tubos de Malpighi, para lo cual se usó *Achetus domesticus* como insecto modelo. Los ácidos grasos que tuvieron actividad biológica contra las especies en estudio se evaluaron en los ensayos de secreción de fluido. Entre los ácidos grasos evaluados se encuentran los de cadena mediana (ácidos decanoico, undecanoico, dodecanoico, tridecanoico y tetradecanoico) (Cruz-Estrada, 2014), así como los de cadena larga saturados (ácido hexadecanoico y octadecanoico) e insaturados (ácido 9-octadecenoico y 9,12-octadecadienoico) (Castillo *et al.*, 2012; Santana *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos mostraron que el ácido dodecanoico reduce la tasa de secreción de fluido de los tubos de Malpighi con una CI_{50} (concentración inhibitoria media) de 0.53 mM, así también incrementa la concentración del Na^+ en el fluido secretado y no hay cambios en el pH, por lo que podría descartarse la posibilidad de que actúe en la $V-H^+ATPasa$, la cual está presente en la membrana apical de los tejidos epiteliales. Es necesario realizar otras pruebas para saber a qué nivel actúa, ya que la secreción de fluido obtenida de los tubos es el resultado de una compleja interacción de diferentes mecanismos de transporte iónico, como bombas, canales y transportadores (Coast *et al.*, 2012).

Con la finalidad de incrementar las opciones de uso de productos agroecológicos en agricultura, es importante continuar las exploraciones de cepas microbianas para detectar aquellas que puedan ser útiles en el control de insectos plaga. El conocimiento de aplicaciones potenciales de los microorganismos incentivará su conservación y uso sostenible.

ANEXO

Insect deterrent and nematotoxic screening of microfungi from Mexico and anti-aphid compounds from *Gliomastix masseei*

Evaluación de la actividad disuasiva de insectos y nematotóxica de microhongos de México y compuestos anti-áfidos de *Gliomastix masseei*

Ana L Ruiz-Jiménez, Azucena González-Coloma, Mari Fe Andrés-Yeves, Esaú Ruiz-Sánchez, Gabriela Heredia, Sergio Peraza-Sánchez, Irma L Medina-Baizabal, Manuela Reyes-Estebanez, Blondy Canto-Canché, Marcela Gamboa- Angulo

Abstract

Fungal metabolites are promising alternatives for the development of biorational pesticides. In this sense, microfungi from tropical regions are valuable sources of natural compounds for pest management. With the aim of broadening the search for new eco-friendly products to manage plant pests, this study was carried out to evaluate the biological activity of 23 tropical fungal extracts on three species of phytophagous insects and a plant parasitic nematode. In addition, the active principles of the most effective extract were identified. The insect deterrent activity of fungal extracts was evaluated on settling of the aphids *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi*, and on feeding of the lepidoptera larva *Spodoptera littoralis*; the nematostatic activity was evaluated on mobility of *Melodogyne javanica*. Active metabolites from *Gliomastix masseei* were identified by GC-MS techniques and by comparison with commercial standards. Results showed seven extracts with strong effect on settling of *M. persicae* and *R. padi* (settling inhibition >80%). The calculated median of effective concentration (EC₅₀) values ranged from 8 to 38 µg/cm² for the extracts of *Clonostachys rosea* and *G. masseei*, respectively. Bioassay-guided separation of the ethyl acetate extract of *G. masseei* revealed the presence of fatty acids and their derivatives, where methyl 9-octadecenoate was the most active compound with EC₅₀ values of 16 µg and 35 µg/cm² for *M. persicae* and *R. padi*, respectively. Extracts of *C. rosea* and *G. masseei* could be a promissory option in the control of pest aphids in agriculture.

Keywords: *Clonostachys rosea*; Fatty acids; *Gliomastix masseei*; *Myzus persicae*; *Rhopalosiphum padi*.

Resumen

Los metabolitos fúngicos son agentes prometedores para el desarrollo de plaguicidas biorracionales. En este sentido, los hongos microscópicos de zonas tropicales representan una valiosa fuente de compuestos naturales para el manejo de plagas. Con la finalidad de ampliar la investigación en productos eco-amigables, en este estudio se evaluó la actividad biológica de 23 extractos de hongos sobre tres especies de insectos fitófagos y un nematodo fitoparásito, además se identificaron los componentes del extracto más activo. El efecto disuasivo de los extractos fúngicos se evaluó en el asentamiento de *Myzus persicae* y *Rhopalosiphum padi*, así como en la alimentación de *Spodoptera littoralis*; la actividad nematostática se evaluó sobre la movilidad de *Meloidogyne javanica*. Los metabolitos activos de *Gliomastix masseei* se identificaron por CG-EM y por comparación con muestras comerciales. Los resultados mostraron siete extractos con fuerte efecto en la inhibición del asentamiento (>80%) de *M. persicae* y *R. padi*. Los valores de la concentración efectiva media (CE₅₀) estuvieron en el rango de 8 a 38 µg/cm² para los extractos de *Clonostachys rosea* y *G. masseei*, respectivamente. El extracto de acetato de etilo de *G. masseei* se fraccionó por un proceso bidirigido revelando la presencia de ácidos grasos y sus derivados, donde el 9-octadecenoato de metilo fue el más activo, con CE₅₀ de 16 µg/cm² para *M. persicae* y 35 µg/cm² para *R. padi*. Los extractos fúngicos de *C. rosea* y *G. masseei* pueden ser una alternativa promisoriosa en el control de áfidos plaga en agricultura.

Palabras clave: *Clonostachys rosea*; Ácidos grasos; *Gliomastix masseei*; *Myzus persicae*; *Rhopalosiphum padi*.

Introduction

The negative impact of synthetic pesticides on the environment and human health has highlighted the use of natural products as a promising alternative for biorational plant pest management⁷. Fungal secondary metabolites are considered a valuable source of molecules with a wide variety of

biological applications. Various reports have pointed out the potential of these compounds for the control of insects and nematodes. One of the first detailed works on the insecticidal properties of fungal metabolites was published by Cole & Robinson⁹. More recently, Asaff *et al.*⁴ showed that dipicolinic and oxalic acids, isolated from *Paecilomyces fumosoroseus*, have strong insecticidal effects on nymphs of *Bemisia* species. Likewise, Gaich *et al.*¹² showed that the sesquiterpenoid, penifulvin A (*Penicillium griseofulvum*) has antifeedant effects on *Spodoptera frugiperda*. In addition, nematotoxic activity has been reported in a wide variety of fungal metabolites, such as cytochalasin B, enniatin B, moniliformin, verrucarins A²⁰, trichodermin^{36, 37}, and butyric acid from *Paecilomyces lilacinus* 6029³³.

Our research group has undertaken a long term project on bioprospection of mycodiversity and its biotechnological application. In this sense, the search for microfungi in the tropical regions of Mexico has yielded a fungal collection whose mycelial extracts have been evaluated on several pathogenic bacteria and fungi, as well as the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*^{13, 29}. None of these native fungi have been assessed against phytophagous insects. Therefore, in the present work, with the aim of broadening the search for new and more eco-friendly agents to control plant pests, twelve saprophytic fungi (Table 1) were selected, based on their biological profile. The fungi were cultured and their organic extracts evaluated on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Neal) Chitwood (Nematoda: Meloidogynidae), the polyphagous Lepidoptera *Spodoptera littoralis* Boisduval (Lepidoptera: Noctuidae), and the aphids *Myzus persicae* Sulzer (Hemiptera: Aphididae) and *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae). In addition, one of the most active extracts was partitioned and the active constituents were identified through bioassay-guided fractionation.

Materials and Methods

Saprophytic fungi

Fungal strains were obtained from the culture collection of the Unidad de Biotecnología of the Centro de Investigación Científica de Yucatán (Table 1) as previously reported by Gamboa-Angulo *et al.*¹³ and Reyes-Estebanez *et al.*²⁹.

Culture and extraction of fungi

Fungi were grown in fermented rice (FR) for 40 days at 25 ± 2 °C and a light-dark photoperiod of 12:12 h. Fungal cultures were lyophilized, fragmented and extracted with ethyl acetate three times (50 ml \times 100 g FR) and methanol (50 ml \times 100 g FR, at approximately 50 °C). The solvents were eliminated by reduced pressure in a rotary evaporator. Ethyl acetate (EA) and methanol (ME) extracts were kept in darkness at 4 °C until use²⁹.

Partition and chromatographic fractionation of ethyl acetate extract of *Gliomastix masseei*

Ethyl acetate extract (100 mg) of *G. masseei* was re-suspended in acetonitrile (5 ml) and partitioned with hexane three times (2:1, 1:1, 1:1, v/v). Solvents were eliminated under reduced pressure to obtain fractions of low (ARGM-1A, 21%) and medium (ARGM-1B, 5%) polarity, and a precipitate. Both fractions were sub-fractionated by silica gel chromatographic column and eluted with hexane, ethyl acetate, acetone, and methanol mixtures. Extract and fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel (60F₂₅₄ plates) and detected under UV light and by spraying phosphomolybdic acid as revealing agent.

Preparation of methyl derivatives

Methyl derivatives of fatty acids were prepared in the laboratory. Potassium carbonate (50 mg) re-suspended in acetone was added to the sample (100 mg) and, after 15 min of continuous stirring, methyl iodide was added (150 μ l) and the mixture left for one night at room temperature. Methylated products were recovered by extraction with ethyl acetate¹⁷.

Analytical methods

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analyses were performed on an Agilent Technologies 6890N chromatograph coupled to an Agilent Technologies 5975B mass selective detector, with Ultra 1 column [methylsiloxane, 25 m long, 0.32 mm i.d., 0.52 μ m film thickness, helium at flow rate = 1.0 ml min⁻¹, T_1 = 150 °C, gradient = 10 °C min, T_2 = 280 °C (20 min)]. Each extract was analyzed using 0.4 μ l of sample at 2% (w/v). Most components were identified by matching their mass spectra to those of the corresponding compounds in the database of the equipment (NIST 05) and/or by comparison with commercial standards (Sigma-Aldrich).

Bioassays

Settling inhibition of *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi*

Evaluations of settling inhibition (SI) were performed on adults of *M. persicae* and *R. padi*. Aphids were grown on pepper (*Capsicum annuum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.), respectively. Colonies were kept in a growth chamber at 60-70% room humidity, photoperiod of 16:8 h (L:D), and temperatures of 21 ± 2 °C.

Bioassays were conducted in plastic boxes ($3 \times 3 \times 1.5$ cm) lined at the bottom with 2% agar. Two leaf pieces (*ca.* 1 cm²) cut from the appropriate host plant were placed on the agar. One piece was coated with 100 µg extract diluted in 10 µl of either acetone or methanol (treated = T) and the other leaf piece was coated only with 10 µl of the respective solvent (control = C). Twenty replicates (plastic boxes) per extract were evaluated, each replicate containing ten aphids. The percentage of aphids settled on each piece of leaf was recorded 24 hours after exposure. A settling inhibition index (%SI) was calculated for each extract, $\%SI = [1 - (\%T/\%C)] \times 100$, where %T and %C are the percentage of aphids settled on the treated and control leaf pieces, respectively⁶. The dose-response experiments for the most active extracts were carried out with the following serial dilutions: 200, 100, 50, 20, and 4 µg/cm².

Feeding inhibition of *Spodoptera littoralis*

Spodoptera littoralis larvae were reared on an artificial diet as described by Poitout and Bues²⁶. The colony was kept in a growth chamber at 60-70% room humidity, photoperiod of 16:8 h (L:D), and temperature of 20 ± 2 °C. For the bioassay, sixth-instar larvae of *S. littoralis* were used. Two larvae were placed in a Petri dish (9 cm diameter \times 1 cm) containing agar (2%). Four wells were made and four discs (1 cm²) of fresh bell-pepper leaves were deposited into. Two of the discs were coated with 100 µg of the extracts dissolved in 10 µl acetone or methanol (T), and the other two discs were coated with the solvent only (C). Larvae were starved for three hours prior to the experiments and subsequently placed on the leaf disc and allowed to consume approximately 75% of the disc area before evaluation. Each treatment was conducted in quintuplicate and repeated two times for the active extracts. The uneaten disc areas were measured with a digital program (Image J Version 1.37r, 2006, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), and percentage of feeding inhibition was calculated by the equation $\%FR = [1 - (T/C)] \times 100$, where T and C are the consumption of treated and control leaf discs, respectively⁶.

Mobility inhibition of *Meloidogyne javanica*

Egg masses of *M. javanica* were obtained from roots of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) grown under greenhouse conditions. The eggs were incubated in distilled water at 25 °C for 24 hours to obtain second-stage juveniles (J2). Bioassay with J2 was performed in 96-well plates. Fungal extracts were dissolved in DMSO with 0.6% tween 20 (20 µg/µl). Subsequently, 5 µl of the extracts were deposited in each well and 100-150 J2 in 95 µl of water were added to each well. Well-plates were incubated at 25 °C for 72 hours. Inhibition of mobility (IM) of J2 was obtained as previously described by Hernández-Carlos *et al.*¹⁶.

Data analysis

The effect of an extract is considered strong when SI > 70% for aphids,¹⁵ FR > 80% for *S. littoralis*¹⁰ and IM > 90% after 48 h exposure for *Meloidogyne* spp.². Effective concentrations (EC₅₀) were calculated by probit analysis using the Statistical Analysis System (SAS), version 8.1 for Windows. EC₅₀ values were considered significantly different if confidence limits did not overlap.

Molecular identification of *Gliomastix masseei*

Molecular identification of the fungal strain MR-36 was performed as described by Moo-Koo *et al.*²². Mycelial mass of fungal culture was obtained and the genomic DNA extracted using the Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrepTM. Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) regions (ITS1-5.8S rDNA ITS2) were amplified and sequenced using primers ITS1 and ITS4³⁵. The amplified products were visualized by electrophoresis in 2% agarose gel (p/v) (Sigma®) and the products of amplification were sequenced in Macrogen (www.macrogen.com). Sequences were edited to eliminate the noise at ends, minus strands were converted into reverse complement, and both strands were aligned. A query of 500 bp was used to compare with those in the database of the Gene Bank of the National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.gov>), using the software BLAST, and deposited in GenBank (accession number KR069085).

Results

The results of settling inhibition, feeding reduction, and nematotoxic activities are shown in Table 2. None of the extracts inhibited mobility of *M. javanica* (MI < 50%) or feeding of *S. littoralis* (FR

< 70%). In contrast, the EA extracts of *Gliomastix masseei*, *Perelegamyces parviechinulatus* and *Verticillium* sp. TH28, and the ME extracts of *Clonostachys rosea* and *Corynespora cassiicola*, *Phialophora verrucosa*, and *Spadicoides* sp. inhibited the settling of *M. persicae* and *R. padi* (SI > 80%; Table 2). The extracts of *C. rosea* and *G. masseei* caused strong settling inhibition of both aphid species. The dose-response evaluations for these extracts are shown in Table 3. For *M. persicae*, the ME extract of *C. rosea* was the most active, with an EC₅₀ value of 8 µg/cm²; whereas for *R. padi*, the EA extract of *G. masseei* was the most active with an EC₅₀ value of 19 µg/cm².

Molecular identification by using ITS1 and ITS4 primers resulted in a DNA band of ~650 bp. After edition, 561bp were used as query in blast, finding highest homology with *G. masseei* (first hit accession AB540554.1). Query cover about 97% of known *G. masseei* ITS fragment, with an E value of 0.0 and 99% of identity.

The chemical composition of the EA extract of *G. masseei* was determined by a bioassay-guided fractionation. The hexane (ARGM-1A) and acetonitrile (ARGM-1B) fractions had strong effects on settling inhibition of *M. persicae* (>85%) and *R. padi* (SI>70%) (Table3). Analysis of fraction ARGM-1A and its methyl derivative (ARGM-4) by GC-MS and by comparison with commercial standards (free and methyl esters) revealed the presence of four fatty acids as major components. Fatty acids included hexadecanoic acid (16:0), octadecanoic acid (18:0), 9-octadecenoic acid (18:1) and 9,12-octadecadienoic acid (18:2) (Table 4). The most abundant components were hexadecanoic acid (74%) and 9,12-octadecadienoic acid (16.8%). In addition, ARGM-1A fraction was methylated and the product, ARGM-4, also had an effect on settling of both aphid species.

Purification of the second fraction ARGM-1B by silica gel columns yielded a complex mixture of compounds which included ergosterol. This compound was isolated and identified by comparison with a commercial sample (E6510-10G, Sigma-Aldrich). The subfractions were not active on settling of aphids.

The compounds isolated in this work and commercial standards were evaluated on both aphid species (Table 5). Methyl hexadecanoate had a low effect on settling of *R. padi* and was not tested on *M. persicae*. Methyl 9-octadecenoate strongly inhibited the settling of both aphid species (SI >70%), likewise, methyl 9,12-octadecadienoate only inhibited the settling of *M. persicae* (SI >70%). Ergosterol showed no activity. Dose-response evaluation of both active pure esters showed

that methyl 9-octadecenoate was the most active compound with an EC₅₀ value of 16 µg/cm² for *M. persicae* and 35 µg/cm² for *R. padi* (Table 5).

Discussion

In the present work, the evaluation of organic extracts of microfungi showed that the ME and EA extracts had different effects on the plant pest targets. The extracts had very low or no effect on *S. littoralis* or *M. javanica*. However, various extracts displayed a strong effect on settling of the aphids *M. persicae* and *R. padi*. To our knowledge, the fungal extracts evaluated in the present work had not been previously assessed on aphid settling. The results showed that 30% of the evaluated fungi produced metabolites that deter aphids. The most active were the EA extract of *G. masseei* (EC₅₀, 15-19 µg/cm²) and the ME extract of *C. rosea* (EC₅₀, 8-38 µg/cm²).

Molecular identification pointed out to be *G. masseei*. Minor discrepancies between query and retrieved sequences were observed, but identity was supported by the congruency of molecular identification with traditional taxonomy performed according to Kiyuna *et al.*¹⁹. Thus, the ITS fragment was enough to identify the fungus and discrepancies can be attributed to usual polymorphism among strains. The fungus *G. masseei* is a cosmopolitan species that has antimicrobial properties²⁸; however, no studies on identification of secondary metabolites produced by this species have been reported. The primary fractionation (ARGM-1A and 1B) of the extract revealed that *G. masseei* produces metabolites that affect settling of aphids. These metabolites were detected in the low and medium polarity fractions. In the low polarity fraction, fatty acids and their derivatives are the most abundant components. Although hexadecanoic acid (75%) was the major constituent, its effect on settling of *M. persicae* was produced only by their derivatives methyl and ethyl esters (5.5-8.7 µg/cm²), in agreement with previous reports³². Surprisingly, these compounds showed no effect on settling of *R. padi*. Other components of the low polarity fraction were the methyl esters of 9,12-octadecadienoic acid (17.8%) and 9-octadecenoic acid (9.3%). In this case, previous studies have shown that the acid forms of these compounds have anti-aphid properties⁸. In the present study, methyl 9-octadecenoate was the most active compound with an EC₅₀ of 16 and 35 µg/cm², for *M. persicae* and *R. padi*, respectively (Table 5). Methyl 9,12-octadecadienoate, in contrast, only inhibited the settling of *M. persicae* (EC₅₀ = 20 µg/cm²), but not of *R. padi*.

During the purification of the extract, we observed that the settling inhibition activity remained in low and medium polarity fractions for *M. persicae*, but decreased for *R. padi*, where SI values decreased from crude extract (91.9) to 70 and 76%, respectively. An opposite trend was observed for the natural methylated ARGM-4 fraction (SI = 84%). We then verified the activity of the isolated methyl esters mixture and an artificial mixture of commercial standards of the major constituents present in the fraction ARGM-1A. The mixture was prepared with the methyl esters of the hexadecanoic, 9,12-octadecadienoic, and 9-octadecenoic acids (27:6:1). The methyl 9-octadecenoate and natural mixture of hexane fraction inhibited the settling of both aphids (SI >70%), but 9,12-octadecadienoate and the artificial mixture only inhibited the settling of *M. persicae*, in the same manner as the saturated methyl hexadecanoate. These data showed that on esterified fatty acids, the pattern for anti-aphid activity is different in comparison with that of the free unsaturated fatty acids⁸. The difference between the effects on settling of *R. padi* caused by the artificial and natural mixtures can be attributed to the presence of other minor unknown constituents in the latter.

The biological activity of fatty acids and their derivatives on pest insects have been previously reported²⁷. For example, 9,12-octadecadienoic acid has shown activity on *Aedes aegypti*, *Callosobruchus maculatus*, *Lymantria dispar*, *Liposcelis bostrychophila*, and *Malacosoma disstria*; 9-octadecenoic acid on *Anopheles aegypti*, *Anopheles stephensi*; 9,12-octadecadienoic, hexadecanoic and octadecanoic acids on *Spodoptera frugiperda*^{1,18,25}. Fatty acids can be extracted from plants and from fungi. In this sense, various studies have found that different species of fungi, such as *Aspergillus ustus*, *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Penicillium* sp., and *Rhizopus oryzae* produce this type of compounds^{23, 24, 31}.

The TLC and GC-MS analyses of acetonitrile fraction of *G. maseei* showed a complex mixture of compounds, where traces of ergosterol, a component of fungal membrane, were observed. Ergosterol is commonly oxidized in the presence of light into ergosterol endoperoxide. There are various reports on strong antimicrobial activity of ergosterol endoperoxide, but no data on its effect against insects has been published^{5, 30}. Although ergosterol endoperoxide was not detected in *G. maseei* extracts, its effect was evaluated on aphid settling, where this compound slightly inhibited the settling of *M. persicae* and *R. padi* (Table 5).

It is important to note that the activity of the full extract of *G. masseei*, compared to that of the fractions, subfractions and commercial standards, suggests that the anti-aphid effect was most likely due to the synergistic effect of the known and unknown minor components, but further investigation is required in this regard.

The fungus *C. rosea* is a cosmopolitan species which has shown a wide range of biological activities, in particular as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi and nematodes^{21,34}. The activity in this case has been attributed to secondary metabolites, such as gliocladine A-E, verticillin A and 11'-deoxy-verticillin A, Sch52900, and Sch52901¹¹. In previous works, we have found that the EA extract of *C. rosea* is active against human pathogenic bacteria, plant pathogenic fungi, and plant parasitic nematodes^{13,14}. Surprisingly, in the present work, the EA extract of *C. rosea* showed no activity on *M. javanica*.

It is also pertinent to mention that the effect of the most active fungal extracts evaluated in the present work was similar to that of other natural products isolated from microorganisms or plants³.

In summary, the settling inhibition capacity of the fungal extracts screened in this work highlights the potential of these compounds for biorational plant protection. ME extracts of *C. rosea* and EA extracts of *G. masseei* showed the highest anti-settling activity on *M. persicae* and *R. padi*. Furthermore, we observed that ester derivatives of hexadecanoic, 9-octadecenoic and 9,12-octadecadienoic acids were some of the active principles and the most abundant components in the EA extract of *G. masseei*, which may have synergistic effect with other unknown minor constituents. This work also contributes with insights on the biological activity of natural products derived from micromycetes isolated from the tropical regions of Mexico.

Ethical disclosures

Protection of people and animals subjects. The authors declare that no experiments were performed on humans or animals for this study.

Confidentiality of data. The authors declare that this article does not appear patient data.

Right to privacy and informed consent. The authors declare that this article does not appear patient data.

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgements

This research was supported by Conacyt (Grants 47549 and 2009/CB131256, respectively); our thanks also go to Conacyt for the postgraduate scholarship to A.L.R.J. (Conacyt No. 228272). We thank Daniela Hurtado-Cantillo, Miguel Tzec-Sima and Felicia Moo-Koh for the analyses of *G. masseei*.



References

1. Adebawale KO, Adedire CO. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *Afr J Biotechnol.* 2006;5:901-6.
2. Ahmad F, Rather MA, Siddiqui MA. Nematicidal activity of leaf extracts from *Lantana camara* L. against *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood and its use to manage roots infection of *Solanum melongena* L. *Braz Arch Biol Technol.* 2010;53:543-8.
3. Argandoña VH, Roviroso J, San-Martín A, Riquelme A, Díaz-Marrero AR, Cueto M, Darias J, Santana O, Guadaño A, González-Coloma A. Antifeedant effects of marine halogenated monoterpenes. *J Agric Food Chem.* 2002;50:7029-33.
4. Asaff A, Cerda-García-Rojas C, de la Torre M. Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68:542-7.
5. Budhiraja A, Nepali K, Sapra S, Gupta S, Kumar S, Dhar KL. Bioactive metabolites from an endophytic fungus of *Aspergillus* species isolated from seeds of *Gloriosa superba* Linn. *Med Chem Res.* 2013;22:323-9.
6. Burgueño-Tapia E, Castillo L, González-Coloma A, Joseph-Nathan P. Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene *p*-benzoquinone and some of its derivatives. *J Chem Ecol.* 2008;34:766-71.
7. Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO. Natural products as sources for new pesticides. *J Nat Prod.* 2012;75:1231-42.
8. Castillo L, Díaz M, González-Coloma A, González A, Alonso-Paz E, Bassagoda MJB, Rossini C. *Clytostoma callistegioides* (Bignoniaceae) wax extract with activity on aphid settling. *Phytochemistry.* 2010;71: 2052-7.
9. Cole M, Rolinson GN. Microbial metabolites with insecticidal properties. *Appl Microbiol.* 1972;24:660-2.
10. Di Toto Blessing L, Álvarez Colom O, Popich S, Neske A, Bardón A. Antifeedant and toxic effects of acetogenins from *Annona montana* on *Spodoptera frugiperda*. *J Pest Sci.* 2010;83:307-10.
11. Dong JY, He HP, Shen YM, Zhang KQ. Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*. *J Nat Prod.* 2005;68:1510-3.

-
-
12. Gaich T, Mulzer J. Total synthesis of (-)-penifulvin A, an insecticide with a dioxafenestrane skeleton. *J Am Chem Soc.* 2009;131:452-3.
 13. Gamboa-Angulo M, De la Rosa-García SC, Heredia-Abarca G, Medina-Baizabal IL. Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. *Afr J Microbiol Res.* 2012;6:2305-12.
 14. Gamboa-Angulo M, Molina-Salinas GM, Chan-Bacab M, Peraza-Sánchez SR, Heredia G, De la Rosa-Garcia SC, Reyes-Estebanez M. Antimycobacterial and antileishmanial effects of microfungi isolated from tropical regions in Mexico. *Parasitol Res.* 2013;112:559-66.
 15. García M, Gonzalez-Coloma A, Donadel OJ, Ardanaz CE, Tonn CE, Sosa ME. Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Biochem Syst Ecol.* 2007;35:181-7.
 16. Hernández-Carlos B, González-Coloma A, Orozco-Valencia AU, Ramírez-Mares MV, Andrés-Yeves MF, Joseph-Natan P. Bioactive saponins from *Microsechium helleri* and *Sicyos bulbosus*. *Phytochemistry.* 2011;72:743-51.
 17. Juvalé K, Stefan K, Wiese M. Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *Eur J Med Chem.* 2013;67:115-26.
 18. Kannathasan K, Senthilkumar A, Venkatesalu V, Chandrasekaran M. Larvicidal activity of fatty acid methyl esters of *Vitex* species against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitol Res.* 2008;103:999-1001.
 19. Kiyuna, T, An KD, Kigawa R, Sano C, Miura S, Sugiyama J. Molecular assessment of fungi in “black spots” that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp.nov. and *Acremonium felinum* comb. nov. *Mycoscience.* 2011;52:1-17.
 20. Li GH, Zhang KQ, Xu JP, Dong JY, Liu YJ. Nematicidal substances from fungi. *Recent Pat Biotechnol.* 2007;1:212-33.
 21. Li J, Yang J, Huang X, Zhang KQ. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochem.* 2006;41:925-9.

-
-
22. Moo-Koh FA, Alejo JC, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM, Sandoval-Luna R, Ramírez-Pool JA. *In vitro* activity of an aqueous extract of *Bonellia flammaea* against phytopathogenic fungi. *Agrociencia*. 2014;48:833-45.
 23. Oda Y, Yajima Y, Kinoshita M, Ohnishi M. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiol*. 2003;20:371-5.
 24. Oleinikova GK, Slinkina NN, Afiyatullof Sh Sh. Nonpolar compounds and free fatty acids from marine fungi *Aspergillus ustus*. *Chem Nat Compd*. 2011;47:806-7.
 25. Pérez-Gutiérrez S, Zavala-Sánchez MA, González-Chávez MM, Cárdenas-Ortega NC, Ramos-Lopez MA. Bioactivity of *Carica papaya* (Caricaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecules*. 2011;16:7502-9.
 26. Poitout S, Bues R. Elevage de plusieurs espèces de Lépidoptères Noctuidae sur milieu artificiel riche et sur milieu artificiel simplifié. *Ann Zool Ecol Anim*. 1970;2:79-91.
 27. Ramos-Lopez MA, González-Chávez MM, Cárdenas-Ortega NC, M. A. Zavala- Sánchez MA, Pérez S. Activity of the main fatty acids components of the hexane leaf extract of *Ricinus communis* against *Spodoptera frugiperda*. *Afr J Biotechnol*. 2012;11:4274-8.
 28. Reyes Estebanez M, Heredia Abarca G, Gamboa Angulo MM. Perfil biológico de hongos anamórficos del sureste de México. *Rev Mex Micol*. 2008;28:49-56.
 29. Reyes-Estebanez M, Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Heredia-Abarca G, Canto-Canché B, Medina-Baizabal I, Gamboa-Angulo M. Antimicrobial and nematicidal screening of anamorphic fungi isolated from plant debris of tropical areas in Mexico. *Afr J Microbiol Res*. 2011;5:1083-9.
 30. Rhee YH, Jeong SJ, Lee HJ, Lee HJ, Koh W, Jung JH , Kim SH, Kim SH. Inhibition of STAT3 signaling and induction of SHP1 mediate antiangiogenic and antitumor activities of ergosterol peroxide in U266 multiple myeloma cells. *BMC Cancer*. 2012;12:28-38.
 31. Ruess L. Häggblom MM, García Zapata EJ, Dighton, J. Fatty acids of fungi and nematodes-possible biomarkers in the soil food chain?. *Soil Biol Biochem*. 2002;34:745-56.
 32. Santana O, Reina M, Fraga BM, Sanz J, González-Coloma A. Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from *Echium wildpretii*. *Chem Biodivers*. 2012;9:567-76.
 33. Sharma A, Sharma S, Dalela M. Nematicidal activity of *Paecilomyces lilacinus* 6029 cultured on Karanja cake medium. *Microb Pathog*. 2014;75:16-20.
-

34. Viccini G, Mannich M, Capalbo DMF, Valdebenito-Sanhueza R, Mitchell DA. Spore production in solid-state fermentation of rice by *Clonostachys rosea*, a biopesticide for gray mold of strawberries. *Process Biochem.* 2007;42:275-8.
35. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego, CA, Academic Press 1990, p. 315-22.
36. Yang ZS, Li GH, Zhao PJ, Zheng X., Luo SL, Li L, Niu XM, Zhang KQ. Nematicidal activity of *Trichoderma* spp. and isolation of an active compound. *World J Microbiol Biotechnol.* 2010;26:2297-302.
37. Yang ZS, Yu Z, Lei L, Xia Z, Shao L, Zhang KQ, Li GH. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *J Asia-Pacif Entomol.* 2012;15:647-50.

Table 1. List of Mexican microfungi tested (organic extracts) on insect deterrent and nematostatic activities.

Fungal strains	Key	Orden	Site
<i>Cladosporium cladosporioides</i> (Fresen.) G.A. de Vries	XH1E	Capnodiales	1
<i>Clonostachys rosea</i> (Link) Schroers, Samuels, Seifert & W. Gams	TH27	Hypocreales	1
<i>Corynespora cassiicola</i> (Berk. & M.A. Curtis) C.T. Wei	MR01	Pleosporales	1
<i>Cylindrium elongatum</i> Bonord	MR45	Hypocreales	2
<i>Cylindrocarpon congoense</i> J.A. Mey	XH8A	Hypocreales	1
<i>Fusarium</i> sp.	TA54	Hypocreales	1
<i>Gliomastix maseei</i> (Sacc. & Totter) Matsush*	CICY029	Hypocreales	1
<i>Perelegomyces parviechinulatus</i> W.B. Kendr. & R.F. Castañeda	GH25	<i>Incerta sedis</i>	3
<i>Phialophora verrucosa</i> Medlar	MR54	Magnaporthales	1
<i>Spadicoides</i> sp.	MR52	Sordariales	1

<i>Verticillium</i> sp.	TH28	Hypocreales	1
<i>Volutella</i> sp.	TH22	Hypocreales	1

Site: 1: Yucatán 2: Veracruz 3: Tabasco

* Previously reported as *Gliomastix murorum* MR26²⁸

Table 2. *In vitro* evaluation of the organic extracts from microfungi on *Meloidogyne javanica* (100 µg/ml), *Myzus persicae*, *Rhopalosiphum padi*, and *Spodoptera littoralis* (100 µg/cm²).

Fungal strains	Type of extract	<i>M. j.</i> %IM ^a	<i>S. l.</i> % FR ^b	<i>Myzus persicae</i>			<i>Rhopalosiphum padi</i>		
				% C	% T	% SI ^c	% C	% T	% SI ^c
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	EA	9.1 ± 2.1	20.2 ± 16.2	64.9 ± 4.0	35.1 ± 4.0	45.1 ± 7.0	77.5 ± 2.7	22.5 ± 2.7	67.5 ± 5.3
	ME	0.7 ± 0.6	47.3 ± 17	83.9 ± 3.0	16.2 ± 3.0	77.4 ± 4.9	81.6 ± 3.3	18.4 ± 3.3	73.5 ± 5.2
<i>Clonostachys rosea</i>	EA	9.8 ± 2.7	5.8 ± 3.7	83.5 ± 2.5	16.5 ± 2.5	78.2 ± 3.7	69.4 ± 3.4	30.6 ± 3.4	51.4 ± 6.9
	ME ^d	13.3 ± 1.6	47.5 ± 17	94.4 ± 1.2	5.7 ± 1.2	93.3 ± 1.4	86.6 ± 2.0	13.4 ± 2.0	81.5 ± 3.3
<i>Corynespora cassiicola</i>	EA	8.5 ± 1.0	28.4 ± 16	76.5 ± 2.8	23.5 ± 2.8	65.7 ± 5.3	68.8 ± 3.1	31.3 ± 3.1	50.4 ± 6.7
	ME	3.8 ± 0.1	33.8 ± 15	92.2 ± 1.7	7.8 ± 1.7	90.8 ± 2.0	79.6 ± 2.5	20.5 ± 2.5	72.0 ± 3.9
<i>Cylindrium elongatum</i>	EA	2.7 ± 0.6	43.8 ± 17	76.7 ± 4.5	23.3 ± 4.5	65.0 ± 7.7	66.1 ± 4.0	33.9 ± 4.1	44.5 ± 7.7
	ME	7.3 ± 0.6	12.3 ± 8	73.2 ± 3.1	26.8 ± 3.1	58.1 ± 6.6	75.8 ± 3.5	24.2 ± 3.5	62.6 ± 6.1
<i>Cylindrocarpon congoense</i>	EA	5.6 ± 0.1	41.9 ± 19.4	74.1 ± 4.2	25.9 ± 4.2	56.2 ± 8.3	76.6 ± 2.7	23.4 ± 2.7	66.3 ± 4.9
	ME	2.6 ± 1.1	53.2 ± 16.8	84.6 ± 2.5	15.4 ± 2.5	77.5 ± 4.2	83.1 ± 4.0	16.9 ± 4.0	76.0 ± 6.3
<i>Fusarium</i> sp.	EA	12.4 ± 1.5	13.1 ± 8.3	71.3 ± 2.9	28.7 ± 2.9	55.3 ± 6.0	75.1 ± 3.7	24.9 ± 3.7	61.6 ± 7.2

	ME	33.4 ± 3.8	16.1 ± 8.6	80.3 ± 2.3	19.7 ± 2.3	73.4 ± 3.9	77.0 ± 2.7	23.0 ± 2.7	63.2 ± 4.9
<i>Glomastix masseei</i>	EA ^d	8.2 ± 0.7	20.6 ± 10	93.7 ± 1.7	6.3 ± 1.7	91.7 ± 2.5	93.3 ± 1.3	6.7 ± 1.3	91.9 ± 1.7
	ME	0.3 ± 0.7	23.4 ± 10.6	76.8 ± 2.7	23.2 ± 2.7	66.9 ± 4.5	84.5 ± 4.0	15.5 ± 4.0	74.4 ± 6.6
<i>Perelegomyces parviechinulatus</i>	EA	8.1 ± 1.8	18.1 ± 9.4	87.3 ± 3.0	12.7 ± 3.0	82.3 ± 4.9	81.3 ± 3.4	18.7 ± 3.4	72.5 ± 5.8
	ME	3.9 ± 1.5	13.9 ± 6.4	77.4 ± 3.4	22.6 ± 3.4	65.2 ± 6.8	86.1 ± 5.2	13.9 ± 5.2	77.7 ± 8.8
<i>Phialophora verrucosa</i>	EA	4.4 ± 0.7	21 ± 8.1	66.8 ± 4.7	33.2 ± 4.7	49.1 ± 7.6	67.4 ± 3.4	32.6 ± 3.4	48.3 ± 6.9
	ME	0.7 ± 0.3	7.6 ± 4.8	90.7 ± 1.8	9.3 ± 1.8	88.9 ± 2.3	68.0 ± 4.3	32.0 ± 4.3	48.7 ± 7.8
<i>Spadicoides</i> sp.	EA	20.0 ± 1.6	19.2 ± 8.8	77.3 ± 4.9	22.7 ± 4.9	64.7 ± 8.6	71.6 ± 5.8	21.1 ± 2.4	64.1 ± 6.7
	ME	3.2 ± 0.3	0	90.1 ± 2.7	10.0 ± 2.7	87.5 ± 3.9	82.4 ± 4.5	17.6 ± 4.5	72.5 ± 8.1
<i>Verticillium</i> sp.	EA ^d	3.2 ± 0.7	25.3 ± 12.6	95.0 ± 1.1	5.0 ± 1.1	93.7 ± 1.3	81.0 ± 3.8	19.0 ± 3.8	71.9 ± 6.8
	ME	3.0 ± 1.2	61.3 ± 11.3	83.9 ± 4.6	16.1 ± 4.6	75.0 ± 8.0	66.4 ± 5.6	33.6 ± 5.6	47.7 ± 9.0
<i>Volutella</i> sp.	EA	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt	nt
	ME	14.4 ± 2.1	19.2 ± 13	83.6 ± 3.9	16.4 ± 3.9	74.4 ± 7.6	68.5 ± 4.4	31.5 ± 4.4	49.3 ± 7.8
Fermented rice (blank)	EA	15.0 ± 1.2	27.1 ± 9.7	63.6 ± 5.14	36.4 ± 5.1	43.0 ± 8.2	68.8 ± 3.2	31.2 ± 3.2	48.4 ± 7.3
	ME	-0.5 ± 0.5	13.8 ± 6.4	64.8 ± 3.6	35.2 ± 3.6	46.5 ± 5.8	54.7 ± 1.9	45.3 ± 1.9	18.5 ± 4.7

EA: Ethyl acetate extract ME: Methanol extract *M. j.*: *Meloidogyne javanica* *S.l.*: *Spodopera littoralis* nt: Not tested

^a % IM: percent inhibition of mobility; $n = 100-150$ for *Meloidogyne javanica*

^bPercentage of feeding reduction (FR) = $[1 - (T/C)] \times 100$; where T and C are the consumption of treated and control leaf discs, respectively; $n = 5$.

^cSettling inhibition in percentage (SI) = $[1 - \%T/\%C] \times 100$; aphids settled on treated leaf disc (%T) and control leaf disc (%C) after 24 hours. $n = 20$ replicates for aphids (d: $n = 40$ replicates)

Table 3. Dose-response evaluation of active fungal extracts from *Clonostachys rosea* and *Gliomastix masseei* on settling inhibition of *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi*.

Fungal strain/solvent	Concentration $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	<i>Myzus persicae</i>				<i>Rhopalosiphum padi</i>			
		%C	%T	%SI ^a	EC ₅₀ (CL) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	%C	%T	%SI ^a	EC ₅₀ (CL) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$
<i>Clonostachys rosea</i> MeOH extract	200	96.7 ± 2.1	3.3 ± 2.1	95.1 ± 3.4	8 (6, 10)	87.9 ± 2.1	12.1 ± 2.1	84.6 ± 2.9	38 (25, 48)
	100 ^b	94.4 ± 1.2	5.7 ± 1.2	93.3 ± 1.4		86.6 ± 2.0	13.4 ± 2.0	81.5 ± 3.3	
	50	88.0 ± 3.5	12.0 ± 3.5	83.8 ± 5.4		72.2 ± 4.0	27.8 ± 4.0	54.3 ± 7.9	
	20	79.5 ± 3.8	20.5 ± 3.8	70.0 ± 6.5					
	4	57.7 ± 4.6	42.3 ± 4.6	33.7 ± 7.2					
<i>Gliomastix masseei</i> Ethyl acetate extract	200	96.8 ± 1.6	3.2 ± 1.6	96.0 ± 2.0	15 (13, 18)	92.6 ± 2.0	7.4 ± 2.0	91.0 ± 2.5	19 (16, 23)
	100 ^b	93.7 ± 1.7	6.3 ± 1.7	91.7 ± 2.5		93.3 ± 1.3	6.7 ± 1.3	91.9 ± 1.7	
	50	82.0 ± 2.9	18.0 ± 2.9	74.6 ± 5.3		77.3 ± 3.7	22.7 ± 3.7	66.6 ± 6.5	
	20	68.3 ± 4.5	31.7 ± 4.5	50.9 ± 7.7		60.7 ± 2.7	39.3 ± 2.7	34.3 ± 5.6	
	4	49.2 ± 6.2	50.8 ± 6.2	22.6 ± 8.7		57.5 ± 2.2	42.5 ± 2.2	26.5 ± 5.2	

ARGM-1A	50	90.6 ± 2.5	9.4 ± 2.5	87.7 ± 3.8	78.9 ± 2.6	21.1 ± 2.6	70.8 ± 4.6
ARGM-1B	50	93.9 ± 2.0	6.1 ± 2.0	92.5 ± 2.5	83.3 ± 3.1	16.7 ± 3.1	76.5 ± 5.3

^aSI: Settling inhibition in percentage ± standard error; $SI = [1 - \%T/\%C] \times 100$; where %T and %C are the percentage of aphids settled on the treated and control leaf pieces, respectively, after 24 hours; $n = 20$ replicates, 40 replicates.

EC₅₀ (CL): effective concentration (confidence limits) for settling inhibition. EC₅₀ values are considered significantly different if confidence limits do not overlap.

nt = not treated

Fraction ARGM-1A: Hexane fraction after partition of EA extract

Fraction ARGM-1B: Acetonitrile fraction after partition of EA extract

Table 4. Analysis of the chemical constituents of *Gliomastix masseei* hexane fraction (ARGM-1A) and its methylated derivative (ARGM-4) by GC-MS techniques.

Compound assignment	Retention time (min)	% Relative abundance
Fraction ARGM-1A		
Methyl hexadecanoate	9.88	15.0
Ethyl hexadecanoate	10.88	3.0
Methyl 9,12-octadecadienoate	11.82	17.8
Methyl 9-octadecenoate	11.91	9.3
Ethyl 9,12-octadecadienoate	12.46	5.4
ARGM-4		
Methyl hexadecanoate	9.58	75.0
Methyl 9,12-octadecadienoate	11.49	3.0
Methyl 9-octadecenoate	11.59	16.8
Methyl octadecanoate	11.86	4.0

Table 5. Effects of methylated fraction (ARGM-4) from *Gliomastix masseei*, and methyl esters from commercial fatty acids on settling of *Myzus persicae* and *Rhopalosiphum padi* and dose-response evaluation of the most active methyl esters.

Sample	Concentration $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	<i>Myzus persicae</i>					<i>Rhopalosiphum padi</i>				
		%C	%T	%SI ^a	EC ₅₀ (CL) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	X ²	%C	%T	%SI ^a	EC ₅₀ (CL) $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	X ²
ARGM-4	50	82.8 ± 2.6	17.2 ± 2.6	76.7 ± 4.0			87.6 ± 2.3	12.4 ± 2.3	84.1 ± 3.3		
Methyl hexadecanoate	50	Nt	nt	nt			73.8 ± 2.5	26.2 ± 2.5	61.8 ± 4.4		
Methyl 9-octadecenoate	50	87.3 ± 2.6	12.6 ± 2.6	83.5 ± 3.7	16	2.0	79.4 ± 2.7	20.5 ± 2.7	71.4 ± 4.4	35	2.13
	25	73.9 ± 7.0	26.0 ± 7.0	66.9 ± 8.6	(15, 17)		59.0 ± 3.8	40.9 ± 3.8	34.0 ± 6.5	(29, 41)	
	12.5	54.6 ± 7.3	45.3 ± 7.3	38.8 ± 9.0			53.5 ± 4.3	46.4 ± 4.3	23.4 ± 6.7		
Methyl 9,12-octadecadienoate	50	82.0 ± 2.3	18 ± 2.3	76.2 ± 3.4	20	1.6	nt	nt	nt		
	25	68.7 ± 5.6	31.3 ± 5.6	52.7 ± 9.0	(18, 22)						
	12.5	62.2 ± 6.3	37.7 ± 6.3	41.0 ± 9.0							
Artificial mixture*	50	77.5 ± 4.2	19.7 ± 3.3	71.2 ± 5.8			70.6 ± 2.8	29.4 ± 2.8	54.5 ± 5.5		
Ergosterol	50	68.6 ± 3.0	31.4 ± 3.0	51.8 ± 6.5			69.3 ± 3.2	30.7 ± 3.2	51.5 ± 6.9		

Ergosterol endoperoxide	50	74.6 ± 3.0	25.4 ± 3.0	64.4 ± 5.6	64.1 ± 3.6	35.9 ± 3.6	38.6 ± 8.2
----------------------------	----	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------	----------------

REFERENCIAS

- Abdel-Lateff, A., G.M. König, K.M. Fisco, U. Höller, P.G. Jones y A.D. Wright (2002). New antioxidant hydroquinone derivatives from the algicolous marine fungus *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products*, 65, 1605-1611.
- Adebowale, KO. y CO. Adedire (2005). Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil. *African Journal of Biotechnology*, 5, 901-906.
- Agatsuma, T., T. Akama, S. Nara, S. Matsumiya, R. Nakai, H. Ogawa, S. otaki, S. Ikeda, Y. Saitoh y Y. Kanda (2002). UCS1025A and B, new antitumor antibiotics from the fungus *Acremonium* species. *Organic Letters*, 4, 4387-4390.
- Aguilar-Medel, S., J. C. Rodríguez-Maciel y C. Santillan-Ortega (2007). Susceptibilidad a insecticidas en dos poblaciones de *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homóptera:Aleyrodidae) biotipo B colectadas en Baja California y Sinaloa, México. *Interciencia*, 32, 266-269.
- Aly AH, A. Debbad y P. Proksch (2011). Fifty year of fungal drugs. *Fungal Diversity*, 50, 3-19.
- Anaya, R. S., G. H. Mejía y N. J. Romero (1999). Diagnósis comparativa de las mosquitas blancas *Bemisia tabaci* Genn. y *B. argentifolii* B. y P. (Homóptera: Aleyrodidae) en: hortalizas plagas y enfermedades, Editado por Anaya, R. S., y Romero, N. J. editorial trilla México D. F. 141 p.
- Arcos, A. P. (2005). Estudio de poblaciones de *Bemisia tabaci* Genn (Homóptero:Aleyrodidae) en malezas asociadas al cultivo de *Capsicum chinense* Jacq. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Instituto Tecnológico Agropecuario # 2. Conkal Yuc. pp. 1-4, 7, 9.
- Arnone, A., G. Assante, A. Bava, S. Dallavalle y G.Nasini (2009). Acremines H-N, novel prenylated polyketide metabolites produced by a strain of *Acremonium byssoides*. *Tetrahedron* 65, 786-791.

-
- Arnone, A., G. Nasini, W. Panzeri, O. Vajna de Pava y L. Malpezzi (2008). Acremine G, dimeric metabolite from cultures of *Acremonium byssoides* A20. *Journal of Natural Products*, 71, 146-149.
- Asaff, A., C. Cerda-García-Rojas y M. de la Torre (2005). Isolation of dipicolinic acid as an insecticidal toxin from *Paecilomyces fumosoroseus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68, 542-547.
- Attique, M. R., M. Rafiq, A. Ghaffar, Z. Ahmad y A. I. Mohyuddin (2003). Hosts of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae) in cotton areas of Punjab, Pakistan. *Crop Protection*, 22, 715-720.
- Bahena-Juárez, F., J. J. Velázquez-García y A. Baez-Pérez (2012). Manejo agroecológico de plagas en trigo para una agricultura de conservación en el Valle Morelia-Querendura, Michoacán, SAGARPA-INIFAP. Folleto Técnico No. 30, Uruapan, Michoacán, México, pp.20-59.
- Baldrick, P., D. Hyde y J.H. Anstee (1988). Microelectrode studies on Malpighian tubule cells of *Locusta migratoria*. Effects of external ions and inhibitors. *J. Insect Physiol.* 34, 963-976.
- Belofsky, G.N., J.B. Gloer, D.T. Wicklow y P.F. Dowd (1995). Antiinsectan alkaloids, shearinines A-C and a new paxilline derivative from the ascostromata of *Eupenicillium shearii*. *Tetrahedron Letters*, 51, 3959-3968.
- Belofsky, G.N., J.B. Gloer, D.T. Wicklow y P.F. Dowd (1998). Shearamide A: a new cyclic peptide from the ascostromata of *Eupenicillium shearii*. *Tetrahedron Letters*, 39, 5497-5500.
- Blackman R.L. y V.F. Eastop, 2000. *Aphids on the World's Crops: An identification and information guide*. 2nd edition. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK.
- Boot, C. M., K. Tenney, F.A. Valeriotte y P. Crews (2006). Highly N-methylated linear peptides produced by an atypical sponge-derived *Acremonium* sp. *Journal of Natural Products*, 69, 83-92.
- Bugni, TS.; Ireland, CM. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat Prod Rep.* 2004, 21, 143-163.
-

-
- Cai, X., P. Li, T. Shan, L. Xu, Y. Xu y L. Zhou (2010). Antibacterial compounds from the endophytic fungal isolate Dzf13 associated with *Dioscorea zingiberensis*. *Natural Products Research and Development*, 22, 274–276.
- Cantrell CL, FE Dayan y SO Duke (2012). Natural products as sources for new pesticides. *Journal Natural Products*, 75, 1231-1242.
- Castillo L, M. Díaz, A. González-Coloma, A. González, E. Alonso-Paz, MJB Bassagoda, C. Rossini (2010) *Clytostoma callistegioides* (Bignoniaceae) wax extract with activity on aphid settling. *Phytochemistry*, 71, 2052–2057.
- Cieniecka-Rostonkiewicz, A., A. Sasa, E. Przybysza, B. Morytza, A. Sygudab y J. Pernak (2007). Ionic liquids for the production of insecticidal and microbicidal extracts of the fungus *Cantharellus cibarius*. *Chemistry and Biodiversity*, 4, 218-224.
- Coast Geoffrey, M. (2012) Intracellular Na⁺, K⁺ and Cl⁻ activities in *Acheta domesticus* Malpighian tubules and the response to a diuretic kinin neuropeptide. *The Journal of Experimental Biology*, 215, 2774-2785.
- Coast Geoffrey, M., R.J. Nachman y D.A Schooley (2007). An antidiuretic peptide (Tenmo-ADFB) with kinin-like diuretic activity on Malpighian tubules of the house cricket, *Acheta domesticus* (L.). *The Journal of Experimental Biology*, 210, 3979-3989.
- Cruz-Estrada, A. E. (2014). Estudio integral de *Eugenia winzerlingii* como potencial agente natural en el control de insectos plaga. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México. 85 p.
- Cruz-Estrada, A., M. Gamboa-Angulo, R. Borges-Argáez y E. Ruiz-Sánchez (2013). Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 1-9.
- Dayan, FE. ChL. Cantrell y SO. Duke (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 4022-4034.
- De la Rosa, G. S. (2007). Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la Península de Yucatán. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 184 p.
-

-
- Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41, 185–201.
- Demain, A. L. y S. Sánchez (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62, 5-16.
- Desbois, AP. y V.J. Smith (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl Microbiol Biotechnol.* 85, 1629–1642.
- Díaz, P. R. y J. L. Ramírez (1993). Biotecnología y control integrado de la mosquita blanca *Bemisia tabaci* Genn. (Homóptera: Aleyrodidae), SARH., pp. 3-7.
- Dixon, R. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Domsch, K. H., W. Gams y T. H. Anderson (2007). *Acremonium*, p. 30-38. *In* Compendium of soil fungi, vol. 2. IHW-Verlag, Eching, Germany.
- Duke, S. O., Ch. L. Cantrell, K. M. Meepagala, D. E. Wedge, N. Tabanca y K. K. Schrader (2010). Natural toxins for use in pest management. *Toxins*, 2, 1943–1962.
- Dumas, C., M. Ravallec, V. Matha, A. Vey (1996) Comparative study of the cytological aspects of the mode of action of destruxins and other peptidic fungal metabolites on target epithelial cells. *Journal of Invertebrate Pathology*, 67, 137-146.
- Escalante Rejón, E.A. (2013). Efecto de extractos fúngicos en mosquita blanca (*Bemisia tabaci*). Tesis de Licenciatura en Biología. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán, México. 87p.
- Evans, L., N. H. John, D. Brayford, M. Stavri , E. Smith, G. O'Donnell, A. I. Gray, G.W. Griffith y S. Gibbons (2006). An antibacterial hydroxy fusidic acid analogue from *Acremonium crotonigenum*. *Phytochemistry*, 67, 2110-2114.
- Gaich T. y J. Mulzer (2009). Total synthesis of (-)-penifulvin A, an insecticide with a dioxafenestrane skeleton. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 452-453.
- Gamboa-Angulo, M.; SC. De la Rosa-Garcia, G. Heredia-Abarca, IL. Medina-Baizabal (2012). Antimicrobial screening of tropical microfungi isolated from sinkholes located in the Yucatan peninsula, Mexico. *African Journal Microbiology Research*, 6, 2305-2312.

-
- Georges, K., B. Jayaprakasam, S. Dalavoy y M. Nair (2008). Pest-managing activities of plant extracts and anthraquinones from *Cassia nigricans* from Burkina Faso. *Bioresource Technology*, 99, 2037-2045.
- Gómez-López, A., A. Aberkane, E. Petrikou, E. Mellado, J.L. Rodríguez Tudela y M. Cuenca Estrella (2005). Analysis of the influence of tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 4, 1251-1255.
- González-Coloma, A., C. Gutiérrez, J.M. del Corral, M. Gordaliza, M. L. de la Puente y A. San Feliciano (2000). Structure and species-dependent insecticidal effects of neoclerodane diterpenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3677-3681.
- Gupta, S., C. Montllor y Y.S. Hwang (1995). Isolation of novel beauvericin analogs from the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Natural Products*, 58, 733-738.
- Gupta, S., C. Montllor y Y.S. Hwang (1995). Isolation of novel beauvericin analogs from the fungus *Beauveria bassiana*. *Journal of Natural Products*, 58, 733-738.
- Gupta, S., S.B. Krasnoff, D.W. Roberts, J.A.A. Renwick, L.S. Brinen y J. Clardy (1991). Structures of the efrapeptins: potent inhibitors of mitochondrial ATPase from the fungus *Tolypocladium niveum*. *Journal of the American Chemical Society*, 113, 707-709.
- Gutiérrez-Olivares, M., J. C. Rodríguez-Maciel, C. Llanderal-Cázares, A. P. Terán-Vargas, Á. Lagunes-Tejeda y O. Díaz-Gómez (2007). Stability of resistance to neonicotinoids in *Bemisia tabaci* (Gennadius) B biotype, from San Luis Potosí, México. *Agrociencia*, 41, 913-920.
- Haiyin, H., Y. H. Y. Yang, R. Bigelis, E. H. Solum, M. Greenstein y G. T. Carter (2002). Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus. *Tetrahedron Letters*, 43, 1633-1636.
- Hammerschmidt, L., A. Debbab, T. Duong Ngoc, V. Wray, C. Pérez Hemphil, W. H. Lin, H. Broetz-Oesterhelt, M. U. Kassack, P. Proksch, A. H. Aly (2014). Polyketides from the mangrove-derived endophytic fungus *Acremonium strictum*. *Tetrahedron Letters*, 55, 3463-3468.
-

-
- Hernández-Carlos, B. y M. M. Gamboa-Angulo (2011). Metabolites from freshwater aquatic microalgae and fungi as potential natural pesticides. *Phytochemistry Reviews*, 10, 261-286.
- Höller, U., A.D. Wright, G.F. Mattheé, G.M. König, S. Draeger, H-J. Aust y B. Schulz (2000). Fungi from marine sponges: diversity, biological activity and secondary metabolites. *Mycological Research*, 104, 1354-1365.
- Hong J-H, Jang S, Mok Heo Y, Min M, Lee H, Min Lee Y, Hanbyul L, Kim J-J. (2015). Investigation of Marine-Derived Fungal Diversity and Their Exploitable Biological Activities. *Marine Drugs*, 13, 4137-4155.
- Hu, Q.B., X.C. An, F.L. Jin, S. Freed y S.X. Ren (2009). Toxicities of destruxins against *Bemisia tabaci* and its natural enemy, *Serangium Japonicum*. *Toxicon*, 53, 115-121.
- Hudlicky, T., D. A. Entwistle, K. K. Pitzer, A .J. Thorpe (1996). Modern methods of monosaccharide synthesis from non-carbohydrate sources. *Chemical Reviews*, 96, 1195-1220.
- Hurtado-Cantillo, D. G. (2015). Identificación taxonómica y perfil cromatográfico de cuatro cepas fúngicas de Yucatán con potencial biotecnológico. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Veterinaria. Yucatán, México. 72p.
- Ianowski, J.P. y M.J., O'Donnell (2001). Transepithelial potential in Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*: lumen-negative voltages and the triphasic response to serotonin. *Journal Insect Physiology*, 47, 411-421.
- Isaka, M, S. Palasarn, P. Auncharoen, S. Komwijit y E. B. Gareth Jones (2009). Acremoxanthonones A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium* sp. BCC 31806. *Tetrahedron Letters*, 50, 284-287.
- Islam, MT.; Ren, SX. Effect of sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) infestation on eggplant (*Solanum melongena* L.) leaf. *Journal Pest Science*, 2009, 82, 211-215.

-
- Jang, J-H, K. Kanoh, K. Adachi y Y. Shizuri (2006). Awajanomycin, a cytotoxic γ -lactone- δ -lactam metabolite from marine-derived *Acremonium* sp. AWA16-1. *Journal Antibiotic*, 59, 428-431.
- Jiménez-Martínez, E.S., N.A. Bosque Pérez, H. Berger Philip, R.S. Zemetra, D.Hongjian y D. Eigenbrode Sanford (2004). Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: aphididae) to barley yellow dwarf virus-infected transgenic and untransformed wheat. *Environmental Entomology*, 33, 1207-1216.
- Jing, Y., J. Huang, R. Ma y J. Han (2003). Host plant preferences of *Bemisia tabaci* Gennadius. *Entomologia Sinica*, 10, 109-114.
- Julianti, E., H. Oh, K. H. Jang, J. K. Lee, S. K. Lee, D-Ch. Oh, K-B. Oh y J. Shin (2011). Acremostrictin, a highly oxygenated metabolite from the marine fungus *Acremonium strictum*. *Journal Natural Products*, 74, 2592-2594.
- Juvale, K., K. Stefan y M. Wiese (2013). Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 57, 5843-5852.
- Kannathasan, K., A Senthilkumar, V Venkatesalu y M. Chandrasekaran (2008). Larvicidal activity of fatty acid methyl ester of *Vitex* species against *Culex quinquefasciatus*. *Parasitology Research*, 103, 999-1001.
- Khambay Bhupinder P.S, J.M. Bourne, S. Cameron, R. Kerry Brian y M. Javed Zaki (2000). Communication to the Editor: A nematicidal metabolite from *Verticillium chlamydosporium*. *Pest Management Science*, 56, 1098-1099.
- Kiyuna, T., K-D An, R. Kigawa, C. Sano, S. Miura y J. Sugiyama (2011). Molecular assessment of fungi in “black spots” that deface murals in the Takamatsuzuka and Kitora Tumuli in Japan: *Acremonium* sect. *Gliomastix* including *Acremonium tumulicola* sp.nov. and *Acremonium felinum* comb. nov. *Mycoscience*, 52, 1-17.
- Kubo I. (1991). Screening techniques for plant-insect Interactions. En: *Methods in Plant Biochemistry, Assays for Bioactivity* (K. Hostettman, ed.) Academic Press, New York, vol. 6. Pp. 179-193.
- Lan W-J., Liu W., Liang W-L., Xu Z., Le X., Xu J., Lam C-K., Yang D-P., Li H-J., Wang L-Y. (2014) Pseudaboydins A and B: Novel Isobenzofuranone Derivatives from Marine

-
- Fungus *Pseudallescheria boydii* Associated with Starfish *Acanthaster planci*. *Marine Drugs*, 12, 4188-4199.
- Li, Y., YC. Song, JY. Liu, YM. Ma y RX. Tan (2005). Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 21, 553-558.
- Liu, B.L. y Y.M. Tzeng (2012). Development and applications of destruxins: A review. *Biotechnology Advances*. 30, 1242-1254.
- Mansaray, M. O. (2000). Herbal remedies food or medicine? *Chemistry and Industry*, 20, 677-8.
- Margaritopoulos, J.T., K. Tsamandani, O.M. Kanavaki, N.I. Katis y J.A. Tsitsipis (2010). Efficacy of pymetrozine against *Myzus persicae* and in reducing potato virus Y transmission on tobacco plants. *Journal of Applied Entomology*, 134, 323-332.
- Medina-García, G. y J. Mena-Covarrubias (2007). Reporte agrometeorológico. INIFAP. Folleto informativo No. 34. Campo experimental Zacatecas, México. 37p.
- Mikhaleva, L., V. Ivanov y Y. Ovchinnikov (1971). The synthesis and some properties of beavericin. *Tetrahedron Letters*, 2, 159-162.
- Nakai, R., H. Ogawa, A. Asai, K. Ando, T. Agatsuma, S. Matsumiya, S. Akinaga, Y. Yamashita y T. Mizukami (2000). UCS1025A, a Novel Antibiotic Produced by *Acremonium* sp. *The Journal of Antibiotics*, 53, 294-296.
- Nerio, LS.; Olivero-Verbel, J.; Stashenko, E. Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 372-378.
- Ninkovic, V., E. Ahmed, R. Glinwood y J. Pettersson (2003). Effects of two types of semiochemical on population development of the bird cherry oat aphid *Rhopalosiphum padi* in barley crop. *Agricultural and Forest Entomology*, 5, 27-33.
- Oda, Y., Y. Yajima, M. Kinoshita y M. Ohnishi (2003). Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. *Food Microbiology*, 20, 371-375.
- Oleinikova, GK., NN. Slinkina y Sh Sh. Afiyatullof (2011). Nonpolar compounds and free fatty acids from marine fungi *Aspergillus ustus*. *Chemistry of Natural Compounds*, 47, 806-807.
-

-
- Ottaway, P.B. (2001). The roots of a healthy diet. *Chemistry and Industry*. 22, 42-44.
- Pedras, S.M.C., L.I. Zaharia y D.E. Ward (2002). The destruxins: synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity. *Phytochemistry*, 59, 579-596.
- Pérez-Gutiérrez, S., MA. Zavala-Sánchez, MM. González-Chávez, NC. Cárdenas-Ortega y MA. Ramos-Lopez (2011). Bioactivity of *Carica papaya* (Caricaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Molecules*, 16, 7502-7509.
- Phasomkusolsil, S. y M. Soonwera (2012). The effects of herbal essential oils on the oviposition deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Tropical Biomedicine*, 29, 138-150.
- Poling, S. M., D. T. Wicklow, K. D. Rogers y J. B. Gloer (2008). *Acremonium zeae*, a protective endophyte of maize, produces dihydroresorcylic acid and 7-hydroxydihydroresorcylic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3006-3009.
- Polston, J.E.; Sherwood, T. Pymetrozine interferes with transmission of tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci*. *Phytoparasitica* 2003, 31, 490-498.
- Prapagdee, B., C. Kuekulvong y S. Mongkolsuk (2008). Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Sciences*, 4, 330-337.
- Rattan, R.S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop Protection*, 29, 913-920.
- Raymond-Delpech, V., M. Kazuhiko Matsuda, B. M. Sattelle, J. J. Rauh, D. B. Sattelle (2005). Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides. *Invertebrate Neuroscience*, 5, 119-133.
- Reyes-Estebanez, M.M. J (2009). Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, México. 171 p.

-
- Ruess, L., MM. Häggblom, E.J. García Zapata y J. Dighton (2003). Fatty acids of fungi and nematodes-possible biomarkers in the soil food chain?. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 745-756.
- Ruiz-Jiménez, A.L. (2011). Evaluación de extractos fúngicos en modelos insecticidas y antifúngicos. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., México. pp. 79-95.
- Ruiz-Jimenez, AL.; Gamboa-Angulo M.; González-Coloma, A.; Fé Andrés, M.; Heredia, G.; Peraza-Sánchez, S.R.; Medina-Baizabal, I.L; Ruiz-Sánchez, E.; Reyes-Estebanez, M. Insecticidal and nematotoxic effects of tropical fungal extracts and deterrent activity of *Gliomastix maseei* on aphids. Unpublished.
- Ruiz-Sanchez E. y M. J.O'Donnell (2012). Effects of the microbial metabolite destruxin A on ion transport by the gut and renal epithelia of *Drosophila melanogaster*. *Archives of insect biochemistry and physiology*. 80, 109-122.
- Ruiz-Sanchez E., I. Orchard y B. Lange Angela (2010). Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). *Toxicon*, 55, 1162–1170.
- Ruiz-Sanchez E., I. Orchard y B. Lange Angela (2010a). Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stal). *Toxicon*, 55, 1162-1170.
- Ruiz-Sanchez, E., A. B. Lange y I. Orchard (2010b). Effects of the mycotoxin destruxin A on *Locusta migratoria* visceral muscles. *Toxicon*, 56, 1043-1051.
- Samuels, R.I., S.E. Reynolds, A.K. Charnley (1988). Calcium channel activation of insect muscle by destruxin, insecticidal compounds produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90C, 403-412.
- Santana, O., M. Reina, MB. Fraga, J. Sanz J y A. González-Coloma (2012). Antifeedant activity of fatty acid esters and phytosterols from *Echium wildpretii*. *Chemistry and Biodiversity*, 9, 567–576.
- Sasamura, S., Sakamoto, K., Takagaki, S., Yamada, T., Takase, S., Mori, H., Fujii, T., Hino M., Hashimoto, M. AS1387392, a novel immunosuppressive cyclic tetrapeptide
-

-
- compound with inhibitory activity against mammalian histone deacetylase. *The Journal of Antibiotics*. 2010, 63, 633–636.
- Sassa, T., T. Ooi, H. Kinoshita y K. Okada (2004). Absolute stereochemistry of Acremolactone A, a novel herbicidal epoxydihydropyranyl γ -Lactone from *Acremonium roseum* I4267. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 68, 2201-2204.
- Schuster, D.J.; S. Thompson, L.D. Ortega y J.E. Polston (2009). Laboratory evaluation of products to reduce settling of sweetpotato whitefly adults. *Journal Economic Entomology*, 102, 1482-1489.
- Schuster, D.J.; Thompson, S.; Ortega, L.D.; Polston, J.E. Laboratory evaluation of products to reduce settling of sweetpotato whitefly adults. *J Econ Entomol.* 2009, 102, 1482-1489.
- Scott Brett, N., M-J Yu, LW. Lee y W. Beyenbach Klaus (2004) Mechanisms of K⁺ transport across basolateral membranes of principal cells in Malpighian tubules of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 1655-1663.
- Sims, S R., R. R. Balusu, E. N. Ngumbi y A.G. Apple (2014). Topical and Vapor Toxicity of Saturated Fatty Acids to the German Cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology*, 107, 758-763.
- Soman, A.G, J.B. Gloer, C.R. Angawi, D.T. Wicklow y D.F. Dowd (2001). Vertilecanin: new phenopicolinic acid analogues from *Verticillium lecanii*. *Journal of Natural Products*, 64, 189-192.
- Souza, A. y J Vendramim (2001). Atividade inseticida de extratos aquosos de Meliáceas sobre a mosca branca *Bemisia tabaco* (Genn.) biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) *Neotropical Entomology*, 3, 133-137.
- Sowjanya, S.K. y V. Padmaja (2008). Oxidative stress induced by destruxin from *Metarhizium anisopliae* (Metch.) involves changes in glutathione and ascorbate metabolism and instigates ultrastructural changes in the salivary glands of *Spodoptera litura* (Fab.) larvae. *Toxicon*, 51, 1140-1150.
-

-
- Strasser, H.; A. Vey y T.M. Butt (2010). Are there any risks in using entomopathogenic fungi for pest control, with particular reference to the bioactive metabolites of *Metarhizium*, *Tolypocladium* and *Beauveria* species? *Biocontrol Science and Technology*, 10, 717-735.
- Summerbell, R.C., C. Gueidan, H-J. Schroers, G.S. de Hoog, M. Starink, Y. Arocha Rosete, J. Guarro y J.A. Scott (2011). *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology*, 68, 139–162.
- Tanaka M., Nara F., Yamasato Y., Ono Y., Ogita T. F-I1334s, New Inhibitors of Membrane-bound Neutral Sphingomyelinase. *The Journal of Antibiotics*. 1999, 52, 827 – 830.
- Tanaka, M., F. Nara, Y. Yamasato, Y. Ono y T. Ogita (1999). F-I1334s, New inhibitors of membrane-bound neutral sphingomyelinase. *The Journal of Antibiotics*, 52, 827-830.
- Tarman K, Lindequist U, Wende K, Porzel A, Arnold N, Wessjohann LA (2011). Isolation of a new natural product and cytotoxic and antimicrobial activities of extracts from fungi of indonesian marine habitats. *Marine Drugs*, 9, 294-306.
- Trigos, A., S. Reyna y L. Cervantes (1995). Three diketopiperazines from the cultivated fungus *Fusarium oxysporum*, *Natural Product Letters*, 6, 241-246
- Uchida, R., YP Kim, I. Namatame, H. Tomoda y S. Omura (2006). Suspendole, a new inhibitor of lipid droplet synthesis in macrophages, produced by *Pseudobotrytis terrestris* FKA-25. *Journal Antibiotics*, 59, 93-97.
- Vázquez-Luna, A., L. Pérez-Flores y R. Díaz-Sobac (2007). Biomoléculas con actividad insecticida: una alternativa para mejorar la seguridad alimentaria. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5, 306-313.
- Vey, A., R. Hoagland y T.M Butt (2001). Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En: Butt, T.M., Jackson, C.W., Magan, N. (Eds.), *Fungi as biocontrol agents*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 311-345.

-
- Wicklow, D. T. y S. M. Poling (2009). Antimicrobial activity of pyrrocidines from *Acremonium zeae* against endophytes and pathogens of Maize. *Phytopathology*, 99, 109-115.
- Wieczorek, H., G. Grüber, WR. Harvey, M. Huss, H. Merzendorfer y W. Zeiske (2000). Structure and regulation of insect plasma membrane H⁺ V-ATPase. *The Journal of Experimental Biology*, 203, 127-135.
- Wiehart, U. I., G. Klein, P. Steels, S. W. Nicolson y E. Van Kerkhove (2003). K⁺ transport in Malpighian tubules of *Tenebrio molitor* L: is a K (ATP) channel involved? *The Journal of Experimental Biology*, 206, 959-965.
- Wink, M. (2000). Interference of alkaloids with neuroreceptors and ion channels". In *Bioactive Natural Products*, (ed), Elsevier, Atta-Ur-Rahman. pp. 3-129.
- Wink, M. (2003). Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*, 64, 3-1
- Yamaguchi Y., R. Masuma, YP. Kim, R. Uchida, H. Tomoda, S. Omura (2004). Taxonomy and secondary metabolites of *Pseudobotrytis* sp. FKA-25 *Mycoscience*, 45, 9-16.
- Zhang, P., B. Bao, H. The Dang, J. Hong, H. Ja Lee, E. S. Yoo, K. S. Bae y J. H. Jung (2009). Anti-inflammatory sesquiterpenoids from a sponge-derived fungus *Acremonium* sp. *Journal Natural Products*, 72, 270-275.
- Zhao, J., L. Xu, Y. Zhang, Y. Huang, Z. Ma, X. Liu y L. Zhou (2009b). Antibacterial activity of the extracts from endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Natural Products Research and Development*, 21, 34-39.
- Zhao, J., T. Shan, Y. Huang, X. Liu, X. Gao, M. Wang, W. Jiang y L. Zhou (2009a). Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the volatile oils from *Gliomastix murorum* and *Pichia guilliermondii*, two endophytic fungi in *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Natural Product Communications*, 4, 1491-1496.
- Zhao, J., W. Sun, T. Shan, Y. Mou, J. Lou, Y. Li, M. Wang y L. Zhou (2012). Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Gliomastix murorum* Ppf8 associated with the medicinal plant *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6, 2100-2104.
-