



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

DETERMINACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE *Epicoccum nigrum* TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:
PQFB. LIDIA ALEJANDRA ZARAGOZA CAMACHO

ASESOR:
DC. en Biología Experimental: Bioquímica. MAURO MANUEL MARTÍNEZ PACHECO

CO-ASEROR:
Médico Oftalmólogo. ROSA ELISA MARTÍNEZ MUÑOZ

JULIO DEL 2014; MORELIA MICHOACÁN.

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT	1
I RESUMEN	2
II INTRODUCCIÓN	3
III ANTECEDENTES	4
3.1 Control biológico	4
3.2 Definición de compuesto orgánico volátil	5
3.3 Generalidades de compuestos orgánicos volátiles	5
3.4 Obtención e identificación de compuestos orgánicos volátiles	8
3.5 Aplicaciones de compuestos orgánicos volátiles	8
3.5.1 Señalización química de compuestos orgánicos volátiles	10
3.5.2 Control biológico planta-microorganismo	10
3.5.3 Micofumigación y efectos antibióticos	11
3.6 <i>Epicoccum nigrum</i>	11
3.7 Aplicaciones de <i>E.nigrum</i>	13
IV JUSTIFICACIÓN	15
V HIPÓTESIS	16
VI OBJETIVOS	16
VII MATERIALES Y MÉTODOS	17
7.1 Material biológico	17
7.2 Preparación del medio de cultivo	17

7.3 Cultivo del hongo para su almacenamiento	17
7.4 Descripción de la elaboración de la cámara para obtención de COV's	17
7.5 Esterilización de la cámara para la obtención de COV's	21
7.6 Obtención de compuestos orgánicos volátiles de <i>E. nigrum</i>	21
7.7 Modificaciones de la cámara para obtención de COV's	23
7.8 Identificación de compuestos orgánicos volátiles de <i>E. nigrum</i>	24
X CONCLUSIÓN	25
XI BIBLIOGRAFÍA	

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Subdisciplinas beneficiadas con los COV's fúngicos	9
Fig. 2. Morfología de <i>Epicoccum nigrum</i>	10
Fig. 3 Imágenes representativas del antagonismo de <i>E.nigrum</i>	13
Fig. 4 Procedimiento de perforaciones	18
Fig. 5 Procedimiento del ajuste de la cámara hermética	19
Fig. 6 Procedimiento de ajustes de piezas, para la cámara hermética	20
Fig. 7 Diseño final de la cámara para obtención de COV's	21
Fig. 8 Procedimiento del crecimiento de <i>E.nigrum</i> y obtención de COV's	22
Fig. 9 Imágenes de la obtención de los COV's emitidos por <i>E.nigrum</i>	22
Fig. 10 Fotografía representativa del montaje final de las modificaciones	23
Fig. 11 cromatógrafo de gases	24

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Nombre, estructura, olor y función de COV's fúngicos	7
Cuadro 2. Pigmentos no carotenoides emitidos por <i>E.nigrum</i>	14
Cuadro 3. Materiales para la elaboración de la cámara hermética	18
Cuadro 4. Materiales para acoplar el compartimento de las cajas de petri	19
Cuadro 5. Materiales para el diseño de la trampa de COV's	20

ABSTRACT

Volatile organic compounds (VOCs) are low molecular weight easily evaporate at room temperature, are an alternative for the biological control. A mixture of 250 fungal VOCs have been obtained and characterized, we find chemical groups such as heterocycles, alcohols, ketones, aldehydes, phenols, esters. *Epicoccum nigrum* is a fungus which has antagonist activity against phytopathogenic microorganisms also produce compounds with antibiotic activity. The objective of this project is to chemically determine volatile organic compounds *E. nigrum* grown in potato dextrose agar (PDA). VOCs are obtained in a chamber designed for this project, its main characteristics are constant flow of sterile air, seal and two traps containing methylene chloride to capture them. For identification technique gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS) is used.

Keywords: VOCs, biological control, *Epicoccum nigrum*, antagonist, GC/MS.

I RESUMEN

Los compuestos orgánicos volátiles (COV's) son de bajo peso molecular y se evaporan fácilmente a temperatura ambiente, son una alternativa para el control biológico. Una mezcla de 250 COV's fúngicos se han obtenido y caracterizado, donde encontramos familias químicas tales como: heterociclos, alcoholes, cetonas, aldehídos, fenoles, ésteres. *Epicoccum nigrum* es un hongo que presenta actividad antagonista contra microorganismos fitopatógenos y también produce compuestos con actividad antibiótica. El objetivo de este proyecto es determinar químicamente los compuestos orgánicos volátiles de *E. nigrum* crecido en medio agar papa dextrosa (PDA). Los COV's se obtienen en una cámara diseñada en este proyecto, sus principales características son flujo constante de aire estéril, cierre hermético y dos trampas que contienen cloruro de metileno para capturarlos. Para la identificación se emplea la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

Palabras clave: COV's, control biológico, *Epicoccum nigrum*, antagonist, GC/MS.

II INTRODUCCIÓN

En el planeta un factor que limita la producción agrícola son las enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos. Por décadas el método utilizado para contrarrestar estos efectos dañinos en la producción de frutas hortalizas y cereales es la aplicación de funguicidas químicos, a los cuales se les atribuye efectos nocivos para el humano, así como al medio ambiente. Debido a este problema es necesario la búsqueda novedosas estrategias antimicrobianas.

Una estrategia para el control de plagas, es el uso de microorganismos antagonistas capaces de utilizar uno o más mecanismos de inhibición microbiana, entre estos mecanismos encontramos a los COV's microbianos. En particular los COV's fúngicos que son producto del metabolismo primario y secundario, se evaporan fácilmente, por lo general son moléculas pequeñas de bajo peso, su esqueleto químico se caracteriza por ser de enlaces carbono-carbono unidos a un solo grupo funcional que pueden ser aminas, ésteres, alcoholes, aldehídos, fenoles, cetonas. (Morath *et al.*, 2012).

Epicoccum nigrum es un hongo antagonista que se utiliza como agente de control biológico debido a que inhibe a diferentes microorganismos fitopatógenos tanto hongos como oomicetos (Mateo Heredia 2010; Li *et al.*, 2013).

En este proyecto se estudia los COV's con la finalidad de conocer las diferentes áreas de aplicación, en donde destaca la micofumigación para el control de plagas en el sector agrícola, así como la posible actividad biológica de los COV's emitidos por *E. nigrum*.

III ANTECEDENTES

3.1 Control biológico

El control biológico o biocontrol, utiliza un enemigo natural conocido como “antagonista” que suprime la severidad o la prevalencia de la enfermedad causada por un patógeno (Cunniffe y Gilliga, 2011). Los primeros productos para el control biológico fueron introducidos al mercado en 1976 y 1989, Francia por BINAP T y Estados Unidos por la Agencia de Protección Ambiental (EPA), respectivamente. En 2005, 26 productos microbianos se comercializan en Estados Unidos, mientras que en el 2008 en Europa se registraron 14 productos microbianos para el control de enfermedades producidas por fitopatógenos (Köhl *et al.*, 2011).

El desarrollo de nuevos productos para el control biológico contra las enfermedades de plantas es una alternativa para sustituir a los fungicidas químicos utilizados en el sector agrícola. Ya que estos presentan efecto negativo hacia organismos del entorno, así como contaminación ambiental y de alimentos. Además, un efecto nocivo para el ser humano se les atribuye, es por ello que en las últimas décadas el control biológico parece ser una estrategia confiable debido a sus propiedades seguras y amigables para el medio ambiente ya que está sustentado en las siguientes interacciones: planta, patógeno, agente de biocontrol y la comunidad microbiana del hábitat. El microorganismo antagónico debe ser eficiente contra patógenos específicos de plantas tanto *in vitro* como *in vivo* y tener costos accesibles para la producción. Sin embargo, la selección de estos antagonistas para el uso comercial puede ser limitada debido a la naturaleza del microorganismo ya que puede producir insuficiente biomasa y corta vida útil de los inóculos producidos. Otra limitación es un mercado reducido para permitir la implementación de un nuevo producto para el control biológico (Fernando *et al.*, 2005; Köhl *et al.*, 2011).

3.2 Definición de compuesto orgánico volátil

Los compuestos orgánicos volátiles son sólidos y líquidos que tienen como base la estructura al carbono, que se vaporizan a una presión de vapor de 0.01 kPa a una temperatura de 20°C. Debido a que son pequeños, son capaces de difundirse través de atmósfera y suelo. La mayoría son solubles en lípidos y por lo tanto tienen una baja solubilidad en agua (Pagans *et al.*, 2006; Morath *et al.*, 2012).

3.3 Generalidades de compuestos orgánicos volátiles

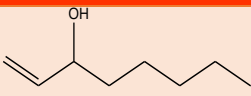
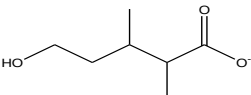
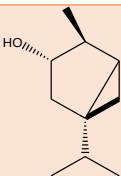
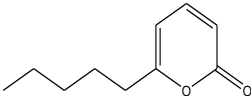
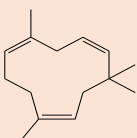
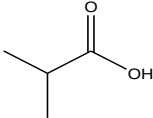
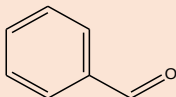
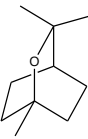
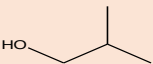
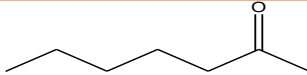
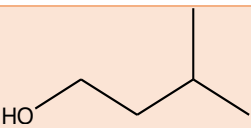
Los compuestos volátiles más conocidos son solventes químicos y otros compuestos industriales asociados a la vida moderna, tales como pinturas, productos de limpieza, combustibles derivados del petróleo, adhesivos, soluciones fotográficas, etc. Las plantas y los microorganismos emiten numerosos compuestos volátiles, alcanos, alquenos, carbonilos, alcoholes, ésteres, terpenoides y otras moléculas pequeñas, los isoprenoides producidos por las plantas son quizás los más conocidos, en particular, los monoterpenos tales como limoneno ("cítrico"), mentol ("menta") y pineno ("resinosa") que tienen olores característicos. Otros microorganismos productores de compuestos volátiles son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, que influyen en el crecimiento vegetal mediante la reducción de los niveles de la enfermedad por medio de antibiosis o competencia con los patógenos, estimulan el crecimiento y biofertilización; en algunas ocasiones las bacterias producen compuestos que estimulan directamente el crecimiento de la planta (Bennett *et al.*, 2012). Por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *B. amyloliquefaciens* y *Enterobacter cloacae* promueven el crecimiento de plantas por la liberación de compuestos volátiles, acetoína y 2,3-butanodiol (Ryu *et al.*, 2003 y 2005). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGRP) también los producen y tienen un impacto positivo en el crecimiento de la planta (Vespermann *et al.*, 2007).

La primera revisión de compuestos volátiles producidos por hongos fue realizada por Hutchinson 1973; tras años de investigación y con algunas limitaciones técnicas y metodológicas, Morath *et al.*, 2012 reportan la identificación de aproximadamente 250 COV's fúngicos, entre sus mezclas se encuentran hidrocarburos simples, heterociclos, aldehídos, cetonas, alcoholes, fenoles, tioalcoholes, tioésteres y

derivados del benceno y ciclohexanos, algunos de estos compuestos tienen olor característico y éste puede ser percibido por el humano (Cuadro 1). No todos los COV's tienen olores que los humanos pueden detectar. Sin embargo, el olfato humano es capaz de detectar geosmina, que tiene un olor característico a tierra, en un intervalo de 150-200 ng/m³, el olor de 1-octen-3-ol compuesto más abundante emitido por macro hongos (setas) se reconoce a los 10 µg/m³, siendo este último compuesto importante en el *quorum-sensing* fúngico para comunicarse y coordinar su comportamiento mediado por el uso de moléculas de señalización (semioquímicos) (Bennett *et al.*, 2012).

El olor de hongos macroscópicos de importancia alimentaria, tales como trufas y setas, emiten compuestos orgánicos volátiles donde se encuentran alcoholes, aldehídos, compuestos aromáticos, terpenos y tioles. Otros volátiles con olor son las mezclas que contienen azufre, son un grupo reconocible de compuestos orgánicos volátiles, son las plantas del género *Allium* (cebollino, ajo y cebolla), donde son valoradas por sus sabores en la cocina y para su aplicación en la medicina tradicional. Por otra parte, los COV's 1-octen-3-ol y el 3-octanona con olor a humedad producidos por hongos microscópicos y se reconoce fácilmente en los edificios húmedos, relacionados con efectos negativos para la salud humana, este fenómeno se conoce como el "síndrome del edificio enfermo" (Morath *et al.*, 2012). El olor y la liberación de COV's de una especie o cepa varían por diversos factores tales como el sustrato, la duración de la incubación, el tipo de nutrientes, temperatura, la asociación con otros organismos, tipos de ecosistema y diferentes climas. Además, varían considerablemente entre las especies (Bennett *et al.*, 2012). Algunas de estas sustancias volátiles son comunes en muchos hongos, mientras que otras parecen ser únicos para una especie (Strobel *et al.*, 2001). Los COV's son producto del metabolismo primario y secundario (Korpi *et al.*, 2009)

Cuadro 1. Nombre, estructura, olor y función de COV's fúngicos (Morath et al., 2012).

Nombre	Estructura	Olor	Función
1-octen-3-ol		Tierra húmeda	Semioquímico
1-butanol-3-metil acetato		Plátano	Antifúngico
Sabinenol		Pimienta	Antifúngico
6-pentil-α-pirena		Coco	Antibiótico
B-cariofileno		Almendra	Promotor del crecimiento vegetal
Ácido Isobutírico		Queso rancio	Antifúngico
Benzaldehído		Almendras	Antimicrobiano
1,8-cineol		Alcanfor	Antifúngico
2-metil-1-propanol		Alcohol	Atrayente
2-heptanona		Queso	Desconocida
3-metil butanol		Trufa	Desconocida

3.4 Obtención e identificación de compuestos orgánicos volátiles

La obtención de COV's fúngicos durante la década de 1970, fue generalmente por destilación con vapor, extracción líquido-líquido y la concentración del extracto orgánico (Bennett *et al.*, 2012). Hoy en día, las técnicas de obtención de COV's biológicos son principalmente la extracción líquido-líquido (ELL), la destilación de vapor (DV), la extracción por destilación simultánea (SDE), trampa y purga (T&P), extracción de fluido supercrítico (EFS), la más común es la microextracción en fase sólida (MEFS). Las ventajas de la (MEFS): Es simple, sensible y amigable con el medio ambiente en la preparación de muestras, además integra la extracción, concentración y la introducción en un solo paso y no necesita invertir mucho tiempo para llevar a cabo los experimentos (Zhang *et al.*, 2010). Jelén (2003) reporta de manera precisa y clara las desventajas de esta técnica, describe que el perfil de COV's es dependiente de la fibra utilizada, ya que en cuatro fibras evaluadas (polidimetilsiloxano, poliacrilato, carboxen y divinilbenceno) se obtiene diferentes COV's fúngicos, esto debido a que los compuestos tienen afinidad a algún tipo de fibra.

La separación e identificación de COV's en la actualidad se lleva a cabo mediante el método de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas (GC/MS), debido a su potente separación y capacidad de detección y sensibilidad, es el método principal para la detección de compuestos orgánicos volátiles por hongos (Matysik *et al.*, 2009). Después de la separación, los componentes individuales de las mezclas complejas son identificados por espectrometría de masas, la confirmación de la identidad de los compuestos se obtiene mediante la comparación de los espectros de masas obtenidos con los espectros de biblioteca y se corroboran mediante la determinación de los índices de retención (Stoppacher *et al.*, 2010).

3.5 Aplicaciones de compuestos orgánicos volátiles

Las aplicaciones de los COV's fúngicos son interesantes, versátiles y se han estudiado por sus propiedades en diferentes subdisciplinas por su potencial biológico. Los COV's se utilizan como indicadores para detectar la presencia de

hongos ya que muchos ocupantes de los espacios interiores húmedos se quejan de irritación en los ojos y en las membranas mucosas, presentan molestias respiratorias, dolores de cabeza, trastornos digestivos debido al “síndrome del edificio enfermo”. En los últimos años, los COV’s de hongos endófitos son de interés debido a que presentan actividad antibiótica, mientras que otros tienen potencial para su posible uso como compuestos de combustible o “biodiesel”. Otro sector beneficiado es la agricultura ya que los COV’s se utilizan en la estrategia para el control biológico y así evitar el crecimiento de fitopatógenos, también se utiliza la “micofumigación” para evitar el crecimiento de microorganismos post-cosecha. Los ecologistas reportan que muchos volátiles actúan como “semioquímicos” ya que funcionan como atrayentes y disuasivos para los insectos, otros COV’s se investigan por su actividad insecticida (Morath *et al.*, 2012; Bennett *et al.*, 2012). (Figura 1).

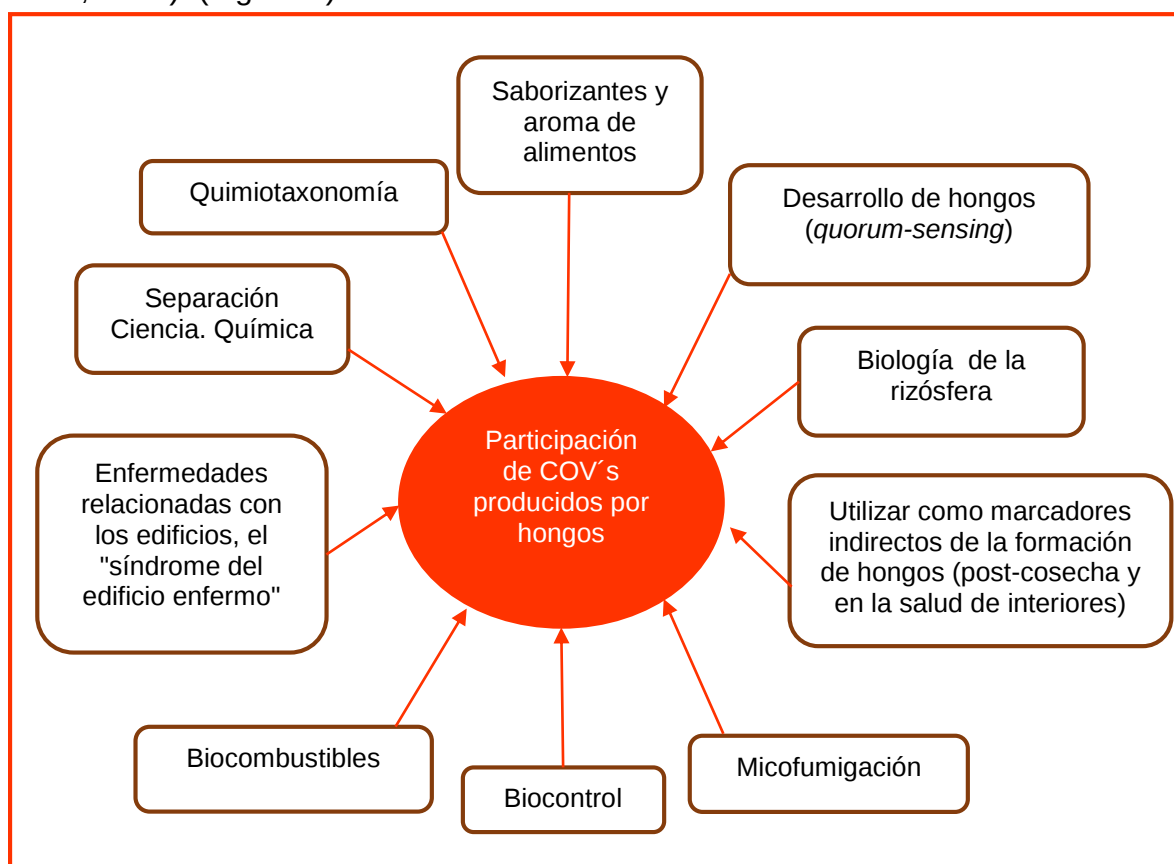


Figura 1. Subdisciplinas beneficiadas con los COV's fúngicos (Morath *et al.*, 2012).

3.5.1 Señalización química de compuestos orgánicos volátiles

Los COV's son productos químicos que transmite información mediante una interacción entre dos individuos, que provoca una respuesta de comportamiento o fisiológica que es adaptable a cualquiera de los dos interactuantes o a ambos; estas moléculas químicas de señalización son llamadas "infoquímicos" o "semioquímicos". La comunicación entre la química de la biósfera y los químicos volátiles en la señalización biológica es importante para la comunicación de la célula a diferentes intervalos de distancia, funcionan como atrayentes y disuasivos principalmente contra insectos y otros invertebrados.

3.5.2 Control biológico planta-microorganismo

Los compuestos volátiles son importantes en el funcionamiento de dos interacciones en el ecosistema "sobre el suelo" y "bajo tierra" (Morath *et al.*, 2012).

1. Interacción bajo tierra: Los suelos fungistáticos contienen compuestos orgánicos volátiles, tales como trimetilamina, 3-metil-2-pentanona, disulfuro de dimetilo, metil pirazina, 2,5-dimetil-pirazina, N-dimetil-octilamina y nonadecano. Mientras que los suelos carentes de estos compuestos no muestran efecto fungistático. Estos compuestos volátiles inhiben tres especies de hongos, *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydospora*, y *Clonostachys rosea* (Xu *et al.*, 2004).

Los COV's tienen la característica de difundirse en la atmósfera en función de las condiciones del hábitat, es por esto que son útiles en las estrategias para el control biológico. Un ejemplo, los volátiles de *Fusarium oxysporum* tipo silvestre y un consorcio bacteriano inhiben el crecimiento de la cepa fitopatógena *F. oxysporum* (Minerdi *et al.*, 2009).

2. Interacciones sobre el suelo: En los últimos años se estudia los metabolitos bioactivos emitidos por hongos endófitos. Estos producen una mezcla de numerosos volátiles, de interés ecológico por sus propiedades ya que pueden beneficiar a la planta huésped defendiéndola de los patógenos. Un claro ejemplo,

es *M. albus* que produce COV's que inhiben y son letales contra hongos y bacterias patógenas de plantas (Strobel *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2012).

3.5.3 Micofumigación y efectos antibióticos

Los hongos productores de volátiles antifúngicos tienen el potencial de ser utilizados como micofumigantes. La micofumigación es el uso de compuestos volátiles producidos por los hongos para el control de otros organismos. Por ejemplo, los compuestos orgánicos volátiles de *Muscodor albus* son efectivos para controlar las enfermedades producidas por los patógenos *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea* y *Monilinia fructicola*. Además, los COV's de *Oxyporus latemarginatus* cepa EF069, un hongo endófito inhibe el crecimiento micelial de varios patógenos de plantas tales como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum f. sp., lycopersici* y *Rhizoctonia solani* (Lee *et al.*, 2009).

Los compuestos orgánicos volátiles de *M. crispans* tiene efecto antibacteriano letal contra varios patógenos humanos, tales como *Yersinia pestis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella choleraesuis* (Mitchell *et al.*, 2010).

3.6 *Epicoccum nigrum*

El género *Epicoccum* fue establecido originalmente por Link 1816, a partir de observaciones realizadas en esporodoquios en tallos secos de las plantas. Posteriormente se describen muchas especies adicionales; sin embargo, después de varias décadas de investigación se reporta que no hay ningún argumento para que existan otras especies, por ello se reducen todas las especies a una solo especie variable de nombre *nigrum*, es decir *Epicoccum nigrum* también conocido como *Epicoccum purpurascens* (Kilpatrick *et al.*, 1981). (Figura 2). Es un hongo saprófito, se encuentra comúnmente en la filósfera, es un componente común de la microflora, se reporta que en España se encuentra como residente en ramas y flores de durazno. Es antagonista de varios patógenos aéreos, tales como *Colletotrichum gloeosporioides*, *B. cinerea* y *Monilinia laxa*, en este último patógeno el micelio y esporas de *E. nigrum* cultivado en PDA y en caldo papa dextrosa poseen efecto

significativo para reducir la severidad la enfermedad producida por este patógeno (Larena *et al.*, 2005). Sin embargo, el rendimiento de *E. nigrum* varía dependiendo de las condiciones climáticas, ya que requiere de humedad, porque es una especie sensible a la baja disponibilidad de agua ($aw=0.86-0.90$), por lo cual, es uno de los factores ambientales para el crecimiento microbiano en la filósfera (Pascual *et al.*, 2002). También, produce flavipin una sustancia ligeramente fungitóxica de color amarillo capaz de inhibir la germinación de los conidios de *Botrytis allii* a un pH = 3,5 (Mallea *et al.*, 1991). Madrigal *et al.*, 1991, reportan las condiciones para la obtención de este compuesto; a los 10 días de ser cultivado en PDA el cual presenta actividad antagónica contra hongos patógenos de plantas y bacterias. Además, se han identificado otras sustancias con actividad biológica como epirodins es un antibiótico pigmentado que tiene la capacidad de inhibir la bacteria *Bacillus megaterium*; y epicorazines otro antibiótico no pigmentado que inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (Baute *et al.*, 1978; Li *et al.*, 2013).

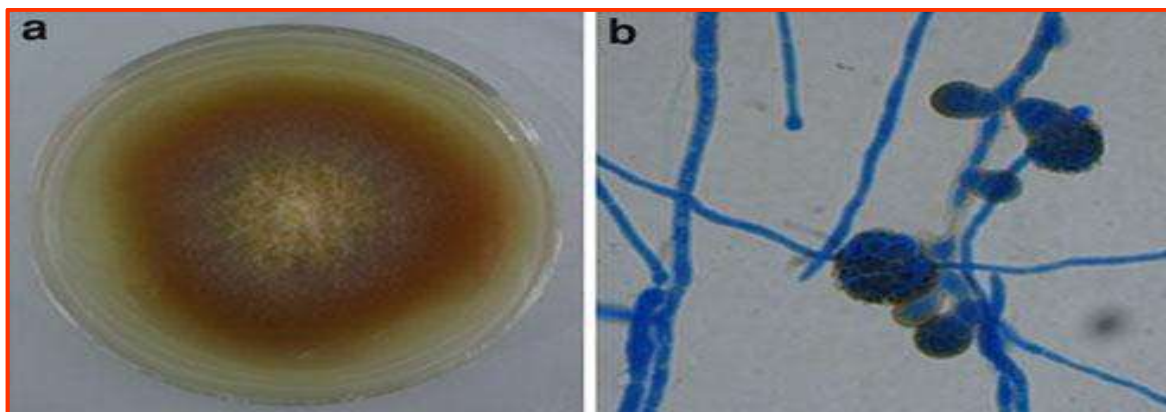


Figura 2. Morfología de *Epicoccum nigrum*. a) macroscópica en medio PDA. b) microscópica vista a 400x (Qian *et al.*, 2013).

En nuestro grupo de trabajo Mateo Heredia (2010) reporta que *E. nigrum* es un hongo que presenta lento crecimiento comparado con los otros microorganismos ensayados (hongos y oomicetos) crecidos en caja de petri, tales como *Phytophthora cinnamomi*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Colletotrichum acutatum* 21, *Phytophthora cactorum*, *Colletotrichum acutatum* 25 a excepción de *Colletotrichum acutatum* 10. El hongo inhibe en mayor proporción al género *Phytophthora*, seguido del género *Colletotrichum* donde también hay presencia de inhibición, después *Rhizoctonia* sp. y por último el género *Fusarium* donde se observa menor zona de inhibición (Figura 3). Determina que el mecanismo de antagonismo de *E. nigrum* es a través del micoparasitismo, debido

a la producción de enzimas líticas degradadoras de la pared celular de hongos y oomicetos fitopatógenos, no descarta la antibiosis ni la competencia por espacio y nutrientes.

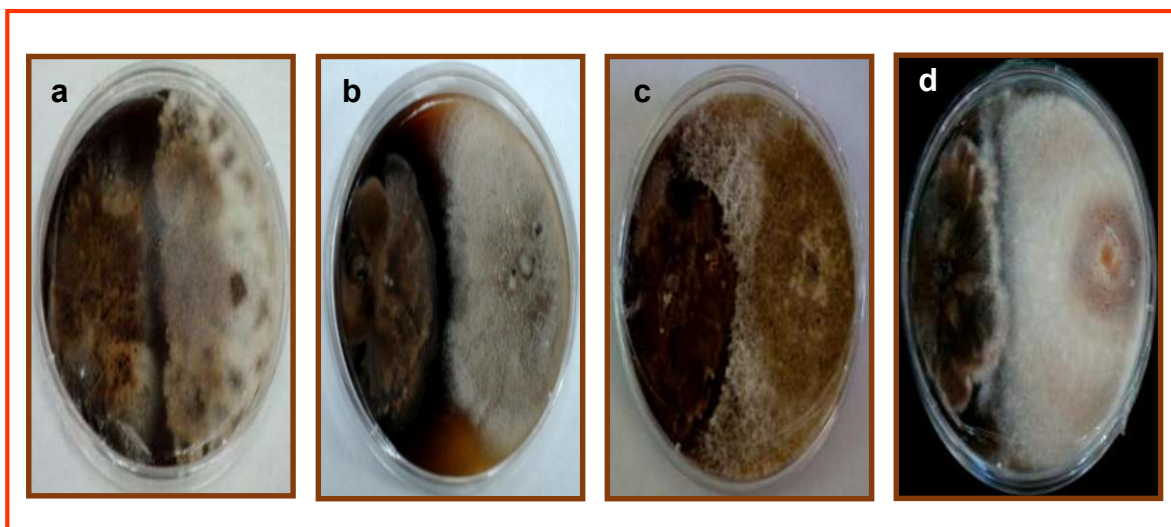


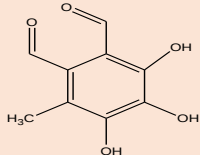
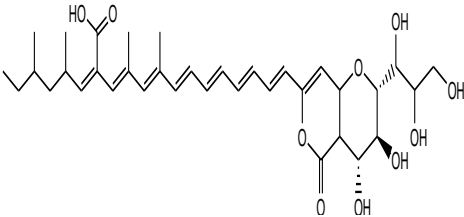
Figura 3. Imágenes representativas del antagonismo de *E. nigrum* contra hongos y oomicetos. a) *E. nigrum* y *Phytophthora cinnamomi*. b) *E. nigrum* y *Colletotrichum acutatum* 10. c) *E. nigrum* y *Rhizoctonia* sp. d) *E. nigrum* y *Fusarium solani*. Mateo Heredia (2010).

3.7 Aplicaciones de *E. nigrum*

Debido a su potencial antagonista, el sector más beneficiado e investigado es el agrícola donde se utiliza como agente para el control biológico de diversas enfermedades producidas por microorganismos fitopatógenos, tales como la podredumbre parda del melocotón (Larena *et al.*, 2005), el tizón tardío en papa producido por *Phytophthora infestans* (Li *et al.*, 2013), la podredumbre parda en frutas con hueso (Mari *et al.*, 2007; De Cal *et al.*, 2009), la podredumbre en la raíz de plántulas de algodón producida por *Pythium* (Hashem y Ali, 2004), la podredumbre en la cabeza del girasol producida por *Sclerotinia* (Pieckenstain *et al.*, 2001) así como el moho blanco en la habichuela (Zhou *et al.*, 1991). Otras investigaciones reportan que es un candidato para la producción de biodisel (Kouth y Morsy, 2011), y en la producción de nanopartículas de Ag (Qian *et al.*, 2013). En la industria alimentaria específicamente en el área de los colorantes el género *Epicoccum* produce metabolitos secundarios (Cuadro 2). También, produce otro

compuesto no identificado de color amarillo, que presenta las mismas características que los otros dos compuestos ya mencionados (Mapari *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Pigmentos no carotenoides emitidos por *E. nigrum* (Mapari *et al.*, 2005).

Nombre del Pigmento	Color	Estructura	Características
Orevactaeno	Naranja		Soluble en agua, antioxidante, alto poder de coloración, estimula la producción de astaxantina en la levadura
Flavipin	Amarillo		

IV JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se utilizan nuevas estrategias seguras para el hombre y amigables con el medio ambiente, una alternativa son los microorganismos productores de COV's para el control biológico. *E. nigrum* es antagonista de hongos y oomicetos, por ello es candidato idóneo para el estudio de COV's.

V HIPÓTESIS

El hongo *E. nigrum* emite compuestos orgánicos volátiles.

VI OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Determinar los compuestos orgánicos volátiles de *E. nigrum*

6.2 Objetivos específicos

- Diseñar un instrumento para la obtención de COV's.
- Identificar la mezcla de COV's emitidos por *E. nigrum*.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

El hongo *E. nigrum* forma parte del cepario de Laboratorio de Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones de Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

7.2 Preparación del medio de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA) marca BD Bioxon. 39 g de PDA, se disuelven en 1 L de agua destilada, la mezcla se somete a ebullición hasta homogeneizar, posteriormente se esteriliza en autoclave a 121°C (15 libras de presión) durante 15 min, después de la esterilización se adiciona 25 ml de agar en cada caja de petri y se deja solidificar.

7.3 Cultivo del hongo para su almacenamiento

Con la ayuda de una cuadrícula se corta un propágulo de micelio del hongo de 5 mm de diámetro, se coloca en cajas de petri con medio de cultivo PDA y se conserva a temperatura ambiente para su crecimiento, una vez crecido se almacena en refrigeración a 4°C.

7.4 Descripción de la elaboración de la cámara para obtención de COV's

Se diseña un instrumento que se ajuste a las necesidades de la parte experimental de este proyecto, al que llamaremos “cámara para obtención de COV's” y que está constituida por tres partes que se describen a continuación:

1. Cámara hermética

2. Compartimento para cajas de petri

3. Trampa de COV's

1. Cámara hermética

Cuadro 3. Materiales para la elaboración de la cámara hermética.

Material	Características
Recipiente	Trasparentes, dos piezas (tapa y base), de plástico y 22 cm de altura
Varilla de cristal	8 cm de diámetro
Tapón de goma	1.8 cm de diámetro
Bomba de aire Dolphin®	120V/60Hz 1.2W
Filtro Millex® GP	0.22 µm
Manguera de plástico transparente	6 mm de diámetro
Llave de paso	Una entrada de aire y una o dos salidas de aire
Parafilm®	4 IN. X 250 FT

En la tapa de la cámara hermética se hacen dos orificios con un sacabocados del número 8 en donde se encajan los tapones de goma que previamente fueron perforados en los cuales se introdujeron las varillas de cristal; una de 19 cm de largo que es para la entrada de aire estéril y la otra de 5 cm que se utiliza para la salida de los COV's (Figura 4).

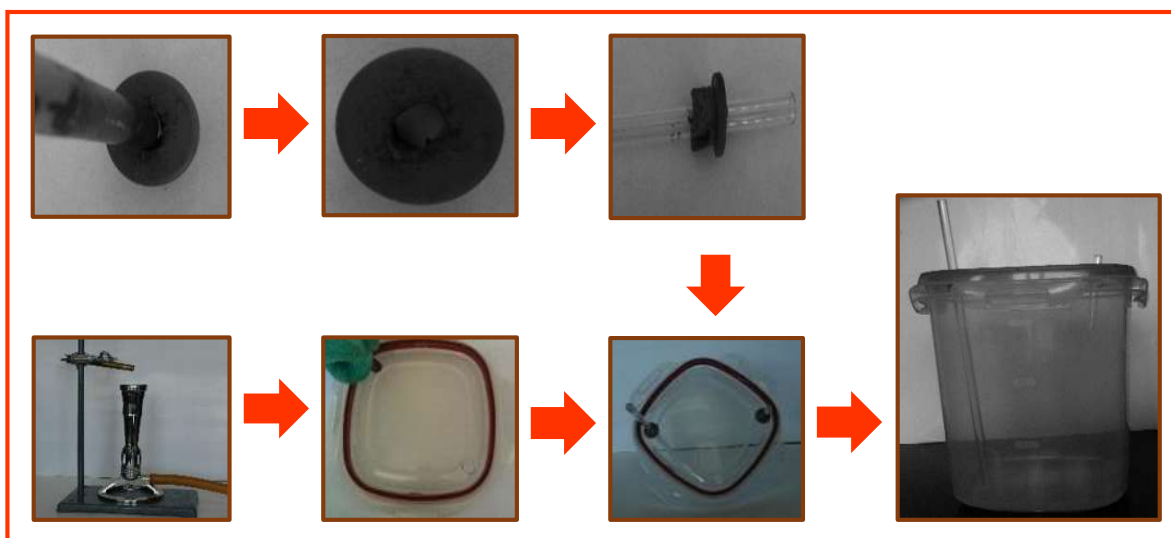


Figura 4. Procedimiento de perforaciones, para a cámara hermética.

También se usa una bomba de aire en la cual se introduce una manguera transparente y en la otra punta se introduce un filtro para esterilizar el aire, en el otro extremo del filtro se introduce otra manguera que se conecta a una llave de paso que esta introducida a la varilla de vidrio de la tapa de la cámara hermética, de igual forma en la varilla donde es la salida de COV's tiene una llave de paso para regular el flujo de COV's (Figura 5).



Figura 5. Procedimiento del ajuste de la cámara hermética.

2. Compartimento para cajas de petri

Cuadro 4. Materiales para acoplar el compartimento de las cajas de petri.

Material	Características
Varilla de alambre galvanizado	3 mm de diámetro y 21 cm de largo
Tapa de plástico	12 cm de diámetro
Alambre de cobre	0.5 mm de diámetro y 2 cm de largo

En siete tapas se realizan 3 orificios a 7 cm de distancia entre ellos, para mayor exactitud se mide con transportador de 0-90° y de 90-180° donde 0° corresponde al orificio 1, 90° al orificio 2 y 180° al último orificio. Con el sobrante de la varilla galvanizada se hacen los orificios con el propósito de que el ajuste varilla-tapa sea preciso, la varilla se somete a fuego directo y se procede a perforar las tapas. A las tres varillas de alambre galvanizado se les hacen 14 hendiduras realizadas con una

número 8, en estos orificios se introducen los tapones de goma en los cuales son insertados las varillas de cristal una de 5 cm y 3 cm. El primer frasco lo llamaremos trampa uno, este tiene una llave de paso se regula a flujo contante los COV's, esta trampa está conectada por una manguera a una segunda trampa. Para finalizar cada conexión se sella en parafilm para evitar la pérdida de COV's (Figura 7).



Figura 7. Diseño final de la cámara para obtención de COV's.

7.5 Esterilización de la cámara para obtención de COV's

La cámara hermética, el compartimento para cajas de petri y las llaves de paso se esterilizan en campana de flujo laminar (Mod: CFH -90) por luz UV durante 12 h, las mangueras y frascos ámbar se esterilizan en autoclave.

7.6 Obtención de compuestos orgánicos volátiles de *E. nigrum*

El siguiente procedimiento se realiza en la campana de flujo laminar, de un cultivo joven se coloca un propágulo del hongo de 5 mm de diámetro, en cada una de las siete cajas de petri con medio de cultivo PDA estas son colocadas sin la tapa, en las divisiones correspondientes del compartimento para cajas de petri, después la cámara hermética es cerrada y se conectan las mangueras y el filtro, en seguida las conexiones se sellan con parafilm, para evitar la pérdida de COV's. A continuación se vierten 150 ml de diclorometano (CH_2Cl_2) en cada uno de los dos frascos ámbar de inmediato son tapados y se conectan las mangueras restantes y se sellan con

parafilm. La cámara para la obtención de COV's se retira de la campana de flujo laminar y se coloca en un lugar seguro en donde se realizan los detalles finales. Los frascos ambar son colocados en baño de hielo para impedir la volatilización del solvente después con las llaves de paso se ajusta la entrada de aire estéril y la salida de COV's a un flujo constante de (una gota cada 20-30 segundos) el experimento se suspende hasta el crecimiento del hongo en toda la caja de petri (Figura 8).

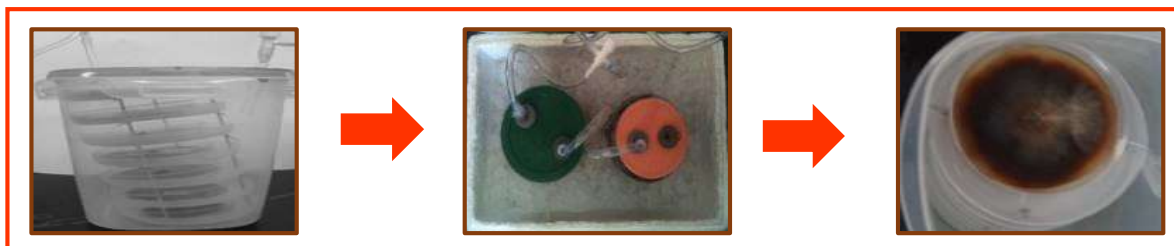


Figura 8. Procedimiento del crecimiento de *E.nigrum* y obtención de COV's. a) cámara hermética con *E.nigrum* b) trampas en hielo c) crecimiento del hongo en toda la caja de petri.

Para el muestreo se purga la cámara hermética durante 3 min. (abrir la llaves de paso para el aumento del flujo de aire estéril), luego el diclorometano con la muestra se vacía en un matraz balón y se concentra en un rotavapor (BÜCHI R-114) a 38°C. Una vez obtenida la muestra se coloca en un vial de cristal aislado de la luz para evitar la descomposición de sus componentes, el vial es etiquetado y almacenado en refrigeración hasta el análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) para evitar la volatilización de los COV's (Figura 9). Para el control se utiliza el procedimiento anterior con la excepción que no se inocula el hongo en el medio de cultivo (PDA).

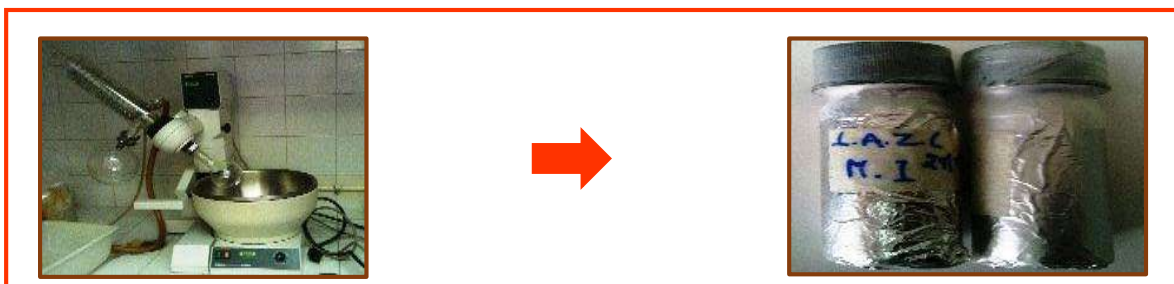


Figura 9. Procedimiento para la obtención de COV's. a) concentración en rotavapor b) almacenamiento de las muestras.

7.7 Modificaciones de la cámara para obtención de COV's

Este procedimiento se realiza como el método anteriormente descrito a excepción de algunos cambios que se describen en seguida:

1. El número de cámaras incrementa de una a cinco.
2. Los propagulos de micelio del hongo ahora son cuatro por cada caja de petri utilizada.
3. El control (PDA sin inocular con *E. nigrum*) se somete a las mismas condiciones establecidas para este experimento.
4. Las conexiones son ajustadas con dos tubos de cloruro de polivinilo (PVC) en el cual se realizan seis orificios para insertar llaves de plástico, el primer tubo tiene la finalidad de distribuir de manera homogénea el aire estéril ajustando con las llaves. El segundo tubo también tiene seis llaves y estas regulan la salida constante de COV's que posteriormente son atrapados en el diclorometano (Figura 10).

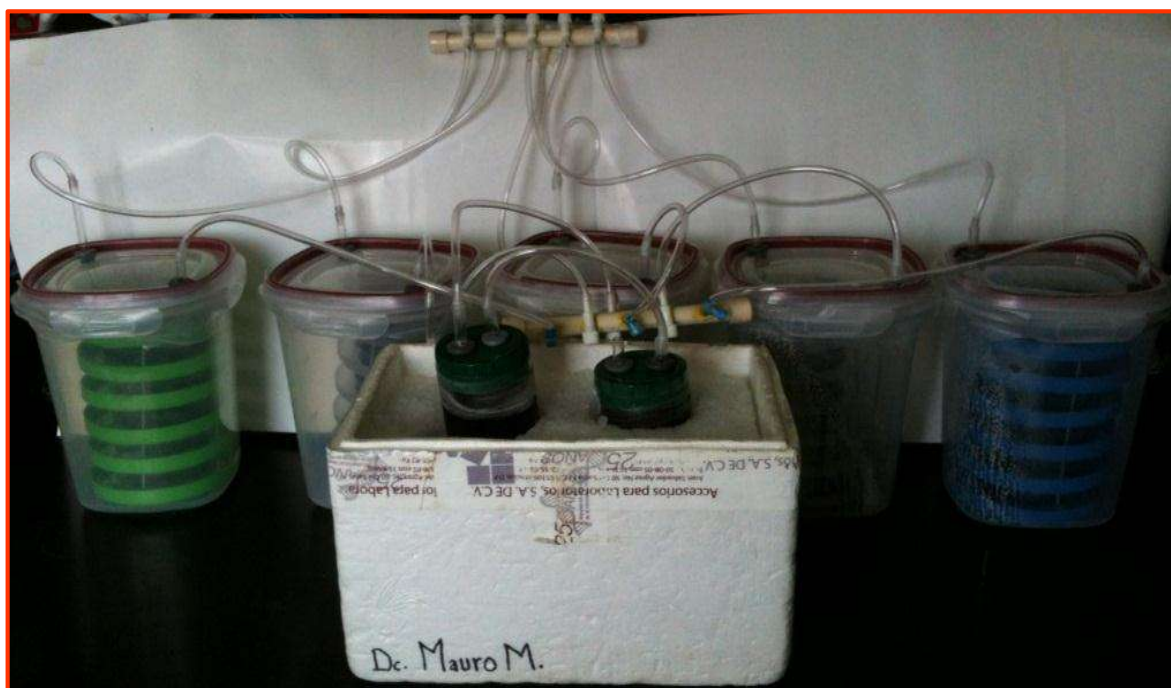


Figura 10. Fotografía representativa del montaje final de las modificaciones de la cámara.

7.8 Identificación de compuestos orgánicos volátiles de *E. nigrum*

1µl de la muestra resuspendida en diclorometano se inyecta al cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973) donde se obtienen los espectros de masas y cromatogramas de gases.

El cromatógrafo se opera usando Helio como gas acarreador con un flujo sin división (splitless) de 1ml/min a una temperatura de 180°C, en una columna capilar no polar HP5MS (25m x 25mm x 25µm), usando el siguiente programa de temperatura en el horno: una temperatura inicial de 50°C, durante dos min., seguida de una rampa de 5°C/min para llegar a una temperatura de 200°C, y por otra rampa de 20°C/min para llegar a una temperatura final de 250°C, durante 2 min.

El espectrómetro de masas se opera a una velocidad de flujo de 1ml/min, con un voltaje de ionización a 70eV, a una temperatura de la interfase de 280°C, en modo SCAN y en un rango de masas de 40-300m/z (Figura 11). Los resultados obtenidos son comparados con la base de datos NIST05. Además de manera manual se corrobora la identificación de cada una de las moléculas presentes en la mezcla, se lleva a cabo de manera general una serie de pasos para elucidar cada tipo de molécula (Duarte L. G.).



Figura 11. Cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973).

X CONCLUSIÓN

El hongo *Epicoccum nigrum* emite compuestos orgánicos volátiles.

XI BIBLIOGRAFÍA

Arrebola E., Sivakumar D., Korsten L. 2010. **Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus.** Biological Control. 53:122-128.

Baute M. A., Deffieux G., Baute R., Neveu A. 1978. **New antibiotics from the fungus *Epicoccum nigrum*.** The journal of antibiotics. 31:1099-1101.

Bennett J. W., Hung R., Lee S., Padhi S. 2012. **Fungal and bacterial volatile organic compounds: An overview and their role as ecological signaling agents.** Fungal associations the mycota. 9:373-393.

Cunniffe N. J., Gilliga C. A. 2011. **A theoretical framework for biological control of soil-borne plant pathogens: Identifying effective strategies.** Journal of theoretical biology. 278:32-43.

De Cal A., Larena I., Liñán M., Torres R., Lamarca N., Usall J., Domenichini P., Bellini A., de Eribe X.O., Melgarejo P. 2009. **Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit.** Journal applied microbiology. 106:592-605.

Duarte L.G. **Espectrometría de masas interpretación de espectros.** UNAM. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/4.2InterpretacionEspectrometriadeMasas_2463.pdf.

Fernando W. G. D., Ramarathnama R., Krishnamoorthy A. S., Savchuk S. C. 2005. **Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol.** Soil biology & biochemistry. 37:955-964.

Hashem M., Ali E. 2004. ***Epicoccum nigrum* as biocontrol agent of *Pythium damping-off* and root-rot of cotton seedlings.** Archives of phytopathology and plant protection. 37:283-297.

Hutchinson S.A. 1973. **Biological activities of volatile fungal metabolites.** Annual review phytopathology. 11:223-246.

Jelén HH. 2003. **Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites.** Letters in applied microbiology. 36:263-7.

Kilpatrick A., Chilvers G. A. 1981. **Variation in a natural population of *Epicoccum purpurascens*.** Transactions of the British mycological society. 77:497-508.

Köhl J., Postma J., Nicot P., Ruocco M., Blum B. 2011. **Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria.** Biological control. 57:1-12.

Korpi A., Järnberg J., Pasanen A. L. 2009. **Microbial volatile organic compounds.** Critical reviews toxicology. 39:139-93.

Koutb M., Morsy F. M. 2011. **A potent lipid producing isolate of *Epicoccum purpurascens* AUMC5615 and its promising use for biodiesel production.** Biomass and bioenergy. 35:3182-3187.

Larena I., Torres R., De Cal A., Liñán M., Melgarejo P., Domenichini P., Bellini A., Mandrin J.F., Lichou J., de Eribe X.O., Usall J. 2005. **Biological control of postharvest brown rot (*Monilinia spp.*) of peaches by field applications of *Epicoccum nigrum*.** Biological control. 32:305-310.

Lee S. O., Kim H. Y., Choi G. J., Lee H. B., Jang K. S., Choi Y. H., Kim, J. C., 2009. **Mycofumigation with *Oxyporus latemarginatus* EF069 for control of postharvest apple decay and *Rhizoctonia* root rot on moth orchid.** Journal applied microbiology. 106:1213-1219.

Li y., Xia L., Q., Wang Y. N., Liu X. Y., Zhang C. H., Hu T. L., Cao K. Q. 2013. **The inhibitory effect of *Epicoccum nigrum* strain XF₁ against *Phytophthora Infestans*.** Biological control. 67:462-468.

Lin Y-L., Wu C-S., Lin S-W., Huang J-L., Sun Y-S., Yang D-Y. 2002. **SAR Studies of 3-Cyclopropanecarbonyloxy-2-cyclohexen-1-one.** Bioorganic & medicinal chemistry. 10: 685–690.

Luo H., Cai Y., Peng Z., Liu T., Yang S. 2014. **Chemical composition and *in vitro* evaluation of the cytotoxic and antioxidant activities of supercritical carbon dioxide extracts of pitaya (dragon fruit) peel.** Chemistry central journal. 8:1.

Madrigal C., Tadeo J. L., Melgarejo P. 1991. **Relationship between flavipin production by *Epicoccum nigrum* and antagonism against *Monilinia laxa*.** Mycological Research. 95:1375-1381.

Mallea M., Pesando D., Bernard P., Khoualene B. 1991. **Comparison between antifungal and antibacterial activities of several strains of *Epicoccum purpurascens* from the Mediterranean area.** Mycopathologia. 115:83-88.

Mapari S. A. S., Nielsen K. F., Larsen T. O., Frisvad J. C., Meyer A. S., Thrane U. 2005. **Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants.** Current opinion in biotechnology. 16:231-238.

Mari M., Torres R., Casalini L., Lamarca N., Mandrin J. F., Lichou J., Inmaculada L., De Cal M. A., Melgarejo P., Usall J. 2007. **Control of post-harvest brown rot on nectarine by *Epicoecum nigrum* and physico-chemical treatments.** Journal of the science of food and agriculture. 87:1271-1277.

Mateo Heredia L. G. 210. **Caracterización de un extracto extracelular producido por un hongo antagonista del oomiceto fitopatógeno *Phytophthora spp.*** Tesis de licenciatura. UMSNH. Pág.36-52.

Matysik S., Herbarth O., Mueller A. 2009. **Determination of microbial volatile organic compounds (MVOCs) by passive sampling onto charcoal sorbents.** Chemosphere. 76:114-119.

Minerdi D., Bossi S., Gullino M. L., Garibaldi A. 2009. **Volatile organic compounds: A potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35.** Environmental microbiology. 11:844-854.

Mitchell A. M., Strobel G. A., Moore E., Robison, R., Sears J., 2010. **Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus.** Microbiology.156:270-277.

Morath S, U., Hung R., Bennett J, W. 2012. **Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential.** Fungal biology reviews. 26:73-83.

Pagans E., Font X., Sánchez A. 2006. **Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: Abatement by biofiltration.** Journal of hazardous materials. 131:79-186

Pascual S., Melgarejo P., Magan N. 2002. **Water availability affects the growth, accumulation of compatible solutes and the viability of the biocontrol agent *Epicoecum nigrum*.** Mycopathologia. 156:93-100.

Pieckenstain F. L., Bazzalo M. E., Roberts A. M. I., Ugalde R. A. 2001. ***Epicoecum purpurascens* for biocontrol of *Sclerotinia* head rot of sunflower.** Mycological Research.105:77-84.

- Qian Y., Yu H., He D., Yang H., Wang W., Wan X., Wang L. 2013. **Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi.** Bioprocess biosystems engineering. 36:1613-1619.
- Ryu C-M., Farag M. A., Hu C-H., Reddy M. S., Wei H-X., Paré P. W., Kloepper J. W. 2003. **Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*.** Plant biology. 100:4927-4932.
- Ryu C-M., Farag M. A., Hu C-H., Reddy M. S., Wei H-X., Paré P. W., Kloepper J. W. 2005. **Invisible signals from the underground: Bacterial volatiles elicit plant growth promotion and induce systemic resistance.** The plant pathology journal. 21:7-12.
- Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R., Schuhmacher R. 2010. **Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS.** Journal of microbiological methods. 81:187-19.
- Strobel G. A., Dirkse E., Sears J., Markworth C. 2001. **Volatile antimicrobials from *Muscador albus* a novel endophytic fungus.** Microbiology. 147:2943-2950.
- Uddin S. J., Grice D., Tiralongo E. 2012. **Evaluation of cytotoxic activity of patriscabratine, tetracosane and various flavonoids isolated from the Bangladeshi medicinal plant *Acrostichum aureum*.** Pharmaceutical biology. 50:1276-1280.
- Vespermann A., Kai Marco., Piechulla B. 2007. **Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*.** Applied and environmental microbiology. 73:5639-5641.
- Vicens Hansol. 1988. Feromonas de agregación. En: **Insecticidas biorracionales.** Xavier Bellés i Rios. Consejo superior de investigación científica. 332-333.
- Xu C., Mo M., Zhang L., Zhang K. 2004. **Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds.** Soil biology biochemistry. 36: 1997-2004.
- Zhang Z., Li G. 2010. **A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds.** Microchemical journal. 95:127-139.
- Zhou T., Reeleder R.D.1991. **Colonization of bean flowers by *Epicoccum purpurascens*.** Phytopathology. 81:774-778.