



Universidad
Nacional
de Córdoba

Tesina de grado para optar por el Título de Bióloga

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS POR BIOTRANSFORMACIÓN DE (-) α Y (-) β PINENO MEDIANTE ACCIÓN ENZIMÁTICA DEL MICELIO DE *Pleurotus sapidus*

Realización: MAGALÍ BEATO

Dirección: Biól. VIRGINA LARA USSEGLIO



Cátedra de Química Orgánica, Escuela de Biología, FCFyN, UNC
CONICET - Área de Aromas y Pigmentos (ICTA-FCFyN-UNC)



**CARRERA DE CIENCIAS
BIOLÓGICAS**



**FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS, FÍSICAS Y
NATURALES**



**UNIVERSIDAD NACIONAL
DE CÓRDOBA**

TESINA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE BIÓLOGA

**OBTENCIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS POR
BIOTRANSFORMACIÓN DE (-) α Y (-) β PINENO
MEDIANTE ACCIÓN ENZIMÁTICA DEL MICELIO DE
*Pleurotus sapidus***

Alumna: Beato, Magalí.

Firma:.....

Directora: Biól. Usseglio, Virginia Lara.

Firma:.....

Cátedra de Química Orgánica, Escuela de Biología, FCEFYN, UNC

CONICET - Área de Aromas y Pigmentos (ICTA-FCEFYN-UNC)

**OBTENCIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS POR
BIOTRANSFORMACIÓN DE (-) α Y (-) β PINENO MEDIANTE
ACCIÓN ENZIMÁTICA DEL MICELIO DE *Pleurotus sapidus***

Tribunal Examinador:

Dra. LABUCKAS, Diana.

Firma:.....

Dr. LÓPEZ, Abel Gerardo.

Firma:.....

Dra. TURINA, Anahí del Valle.

Firma:.....

Fecha:.....

Calificación:.....

AGRADECIMIENTOS

A Alejandra Omarini, por incluir este trabajo en el Programa de Cooperación Argentina-Alemania (MOPSACI-MINCYT-BMBF Bioeconomy, 2017–2019) y hacer posible así la realización de mi tesina.

A mi familia, por apoyarme en todo sentido para estudiar la carrera que me apasiona y a mis abuelos por estar todo el tiempo brindándome su apoyo. A mi hermano Francisco por todos los momentos compartidos, por seguir creciendo juntos.

A Julio Zygodlo y a Paula Zunino, por invitarme a ser parte del grupo y por volver a despertar el interés, el amor por la química y la investigación en el laboratorio, por abrirme todas las puertas, por la confianza, por su dedicación. A Diana, Abel y Anahí, por aceptar ser mi tribunal evaluador y por el tiempo invertido en ello.

A Virginia, por confiar en mí y por acompañarme en este desafío guiándome aun cuando no era mi directora. Por mostrar una predisposición constante para el trabajo en el laboratorio, por su responsabilidad, por enseñarme todo lo que estuvo a su alcance. Por dejar todo en el equipo y por alentarme cuando las cosas no salían como las esperábamos (una y otra vez). Por aceptar ser mi directora, lo cual me enorgullece.

A mis compañeros de laboratorio y a todo el equipo de química orgánica, a Fer, Vane, Andrés, Yesi, Seba, y Romi quienes me hicieron sentir totalmente cómoda y apropiada del espacio, por compartir mates, anécdotas. Por ayudarme en el proceso de escritura y por alentarme cuando fue necesario.

A todas/os mis amigas/os de la vida y de la facultad, porque sin ellas/ellos esto no hubiese sido un camino de disfrute. Por compartir las victorias y bancar los tropiezos.

A todas las personas con las que compartí un techo, convivencias llenas de charlas, estudios, comidas, viajes y celebraciones en el transcurso de la carrera.

A mis compañeras y compañeros de militancia, sobre todo de La Varsavsky, por lo aprendido y construido, por la visión de ciencia, de universidad, de país y de latinoamérica, por apostar al trabajo colectivo, brindándonos la posibilidad de crear y ocupar lugares nuevos de construcción.

A Karen por las horas de estudio, por darnos fuerza y contención, por la amistad construida. A Aldana, con quien compartí el 100% de la carrera, desde el primer día de clases hasta el último momento de la tesina, eternas gracias por tu amistad.

A Iván, por todo lo aprendido en la militancia, por su apoyo académico, por su apoyo emocional. Por elegirnos en el camino de esta vida.

A todas las personas que valoran y defienden la Universidad pública, laica, inclusiva, gratuita y de calidad en nuestro país.

OBTENCIÓN DE PRODUCTOS BIOACTIVOS POR BIOTRANSFORMACIÓN DE (-) α Y (-) β PINENO MEDIANTE ACCIÓN ENZIMÁTICA DEL MICELIO DE *Pleurotus sapidus*

Palabras claves: Bioconversión, *Pleurotus sapidus*, isómeros de pinenos, *Sitophilus zeamais*, *Fusarium verticillioides*, Bioplaguicidas.

RESUMEN

Pleurotus sapidus es un hongo comestible cuya fracción vegetativa se considera un desecho industrial por no destinarse a la alimentación humana. Pese a ello, el micelio posee relevancia biotecnológica ya que sus enzimas pueden aplicarse a la síntesis orgánica. En su sistema catalítico destacamos las enzimas que producen oxidaciones selectivas del grupo alilo (LOX) las cuales son atractivas por generar productos con un amplio espectro de aplicación y un alto impacto en la cadena de valor químico. Hemos partido de α y β pineno como sustrato para estas reacciones, dos compuestos que pueden obtenerse del aceite esencial de *Pinus sp.* derivado secundariamente de la industria forestal.

La provincia de Córdoba es una de las principales productoras de maíz en el país. Este, durante el almacenamiento es afectado por la presencia de *Sitophilus zeamais*, un coleóptero que deteriora por acción directa el grano de maíz. Además, actúa como transporte de conidias de *Fusarium verticillioides*, un hongo que es el principal causante de la descomposición de la espiga de maíz en Argentina y es uno de los principales productores de micotoxinas. Tradicionalmente, el control de estas plagas se realiza mediante la aplicación de plaguicidas químicos los cuales generan daños en la salud y el ambiente. Por todo ello hemos buscado obtener nuevos productos volátiles a partir de dos monoterpenos puros, (-) α y (-) β pineno, como resultado de la acción enzimática del micelio de *P. sapidus* y ensayar la posible utilización de los compuestos resultantes sobre *S. zeamais* y *F. verticillioides*.

Se demostró la acción de las enzimas LOX sobre los isómeros (-) α y (-) β pineno produciendo compuestos oxigenados. Estos nuevos compuestos biotransformados mostraron repelencia sobre *S. zeamais* mientras que no presentaron

efectos letales. Por otra parte, frente a *F. verticillioides*, ambos productos de biotransformación no presentaron efectos negativos sobre el crecimiento del hongo. En este trabajo se han demostrado diferentes comportamientos para los isómeros de estos terpenos, abriendo nuevos interrogantes que presentan precedentes importantes para posteriores investigaciones de la actividad diferencial frente a las enzimas y a los mecanismos que afectan a *S. zeamais* y *F. verticillioides*, plagas del maíz.

INDICE

INTRODUCCIÓN	6
Hipótesis y Objetivos.....	12
Material biológico	13
PARTE I: Evaluación de la bioconversión de dos hidrocarburos monoterpénicos puros, (-) α y (-) β pineno. Estudio del perfil de compuestos volátiles del producto de bioconversión.....	14
Metodología de Trabajo	14
Resultados	16
PARTE II: Cuantificación de la actividad lipoxigenasa del micelio de <i>Pleurotus sapidus</i> en contacto con los hidrocarburos monoterpénicos puros.....	18
Metodología de Trabajo	18
Resultados	19
PARTE III: Evaluación del efecto de los productos de bioconversión en el insecto <i>Sitophilus zeamais</i> :	20
a. Evaluación del efecto insecticida	
Metodología de Trabajo	20
Resultados	23
b. Evaluación de la conducta del insecto	
Metodología de Trabajo.....	20
Resultados	23
PARTE IV: Evaluar la actividad antifúngica de los productos bioconvertidos sobre <i>Fusarium verticillioides</i>	28
Metodología de Trabajo	28
Resultados	28
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIÓN	42
BIBLIOGRAFÍA	43
ANEXOS	48

INTRODUCCIÓN

El cultivo de hongos del género *Pleurotus* ha aumentado considerablemente en todo el mundo durante las últimas décadas y constituye la segunda variedad más importante de hongos producidos en el mundo. Su popularidad ha ido en aumento debido a su facilidad de cultivo en diversos sustratos, algunos de ellos residuos de las industrias agropecuarias, su elevado potencial para la producción de biomasa, y su alto valor nutricional (Mshandete, 2011).

El cultivo de estos hongos comestibles tuvo sus inicios en Alemania, alrededor de 1917, empleando micelio silvestre para la inoculación de troncos. Sin embargo, el primer cultivo a gran escala empleando troncos como sustrato no fue posible hasta 1969 en Hungría. A partir de entonces, el cultivo de *Pleurotus* sp. a pequeña y gran escala se ha desarrollado rápidamente en diversas partes del mundo, siendo Colombia y México importantes productores en Latinoamérica (Sánchez Palacios, 2015). Las especies de este género presentan gran versatilidad dada la diversidad existente de carácter comestible, lo que permite el aprovechamiento económico de diferentes regiones, utilizando sustratos de diferentes medios. Las setas pueden ser cultivadas de manera sencilla y comercializada en fresco o procesadas (deshidratadas, en salmuera, en aceite, extractos en sal, congelados, fermentados). Estas poseen un alto valor nutritivo por la calidad de su proteína, presencia de vitaminas y otros macro y micro elementos, que los constituyen en alimentos saludables (Sánchez Palacios, 2015).

Pleurotus sapidus (Schulzer) Sacc. es un hongo de gran importancia a nivel internacional debido a que su estructura de reproducción sexual es ampliamente utilizada como alimento, destacándose su agradable sabor y su alto valor nutricional (Linke y col., 2005). *P. sapidus* pertenece a un género de hongos degradadores de madera que habita climas templados y tropicales a lo largo del mundo. El micelio de este hongo no es destinado para la alimentación humana, ya que solo es utilizado su cuerpo de fructificación. Sin embargo, es de relevancia biotecnológica ya que posee enzimas de gran importancia para la síntesis orgánica. Actualmente, el uso de sistemas biológicos como maquinaria enzimática para la producción de nuevos compuestos ha cobrado gran interés debido a que las condiciones de síntesis son menos severas que

las requeridas en la síntesis orgánica (pH extremo, temperaturas elevadas, uso de catalizadores, etc.) (Weidmann y col., 2015). La biocatálisis está comenzando a cumplir su promesa de ser una herramienta clave para la producción de pequeñas moléculas orgánicas (principalmente para la industria farmacéutica y el sector agroquímico), en parte debido a la alta estereo especificidad y la selectividad inherente a las reacciones enzimáticas. Además, el uso de catalizadores microbianos (células enteras que contienen estas enzimas) está ganando considerable interés industrial. Esto ofrece posibilidades de biocatálisis que no siempre pueden cumplirse con el uso de las enzimas aisladas. Es el entorno celular el que protege a la proteína y conduce a una mejor estabilidad del catalizador (Woodley, 2006).

Entre las enzimas que pueden encontrarse como integrantes del sistema catalítico de *P. sapidus* se destacan las lipoxigenasas (LOX). Estas enzimas producen oxidaciones selectivas del grupo alilo (C=C-C) las cuales toman gran importancia al generar productos con un amplio espectro de aplicación y un alto impacto en la cadena de valor químico industrial (Vespermann y col., 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que las enzimas LOX del micelio de *P. sapidus* son responsables de la oxidación alílica del valenceno, componente responsable del aroma de la naranja de Valencia, en notkatona (Plagemann y col., 2013), y de limoneno en *cis/trans* carveol y carvona (Onken y Berger, 1999), todos compuestos reportados como buenos bioplaguicidas (Bharadwaj y col., 2014; Herrera y col., 2015; Mejdoub y col., 2019; Peschiutta y col., 2019). Sin embargo, dado que el micelio liofilizado contiene una mezcla de enzimas, no se pueden descartar vías de oxidación alternativas para otros sustratos (Fig. 5). En conjunto, todas estas reacciones son de gran importancia para la búsqueda de compuestos bioactivos ya que en base a reactivos de baja o escasa actividad o desechos de diferentes industrias se pueden conseguir nuevas moléculas que presentan grupos funcionales oxigenados como alcoholes, aldehídos, cetonas o ácidos orgánicos que pueden luego evaluarse como bioplaguicidas de bajo impacto ambiental (Herrera y col., 2015; Brito y col., 2019; Peschiutta y col., 2019).

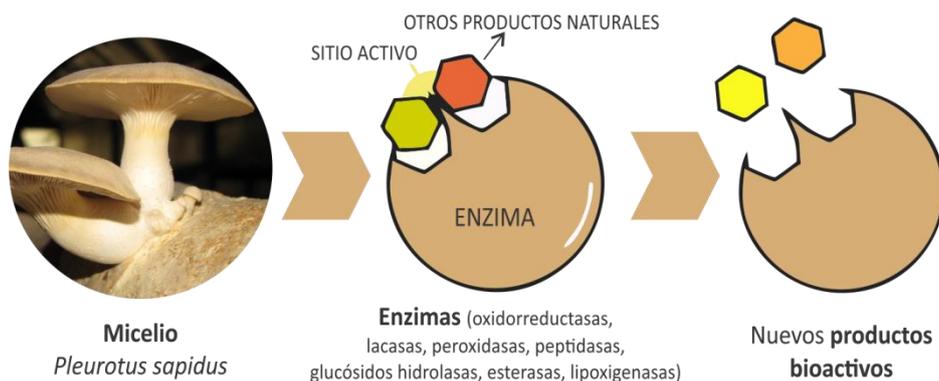


Fig. 1: Esquema de la acción enzimática del micelio de *Pleurotus sapidus* sobre otros productos naturales.

En la industria forestal, las tecnologías de eliminación de residuos sólidos han recibido poca atención, tal vez debido a una percepción de que estos son menos dañinos para el medio ambiente que los líquidos. Sin embargo, la cantidad de desechos sólidos de la industria forestal presenta gran magnitud (Duff y col., 1996). Hoy en día, muchos de los desechos se incineran o, en el mejor de los casos, se busca otro uso de mayor valor. Por este motivo, es importante idear diferentes aplicaciones para los productos secundarios de las industrias, teniendo en cuenta los factores ambientales y económicos de estos tratamientos de desechos. Es la combinación de conciencia ambiental, rentabilidad económica y de políticas globales la que proporciona los incentivos para la recuperación de componentes de desechos orgánicos de las industrias y de su utilización secundaria. Además muchos empresarios creen que la implementación de estos programas puede llevar a una mejor imagen de sus empresas y generar una ventaja competitiva (Väisänen y col., 2016).

Argentina cuenta con 26.589.000 hectáreas de tierras forestales de diversos climas y 1.120.411 hectáreas de bosques cultivados, predominando las forestaciones de pinos (*Pinus sp.*), eucaliptos (*Eucalyptus sp.*), sauces (*Salix sp.*) y álamos (*Populus sp.*). El 80% de las mismas se concentra en la Mesopotamia (provincias de Misiones, Corrientes y Entre Ríos) y el delta del río Paraná (Bercovich, 2000). El aceite esencial de Pino (*Pinus sp.*) es un derivado secundario de la industria forestal. El mismo posee como componentes principales α pineno (50-70%) y β pineno (15-30%) (Ioannou y col., 2014; Dambolena y col., 2016a). Ambos isómeros tienen enantiómeros conocidos en la naturaleza como (-) α pineno, (+) α pineno, (-) β pineno y (+) β pineno (Fig. 1). Además

pueden obtenerse como subproducto de la industria del papel y la lignocelulosa en forma de trementina, conocida popularmente como aguarrás, una fuente económica y abundante de α y β pineno para el estudio de bioconversión (Lindmark-Henriksson, 2003).

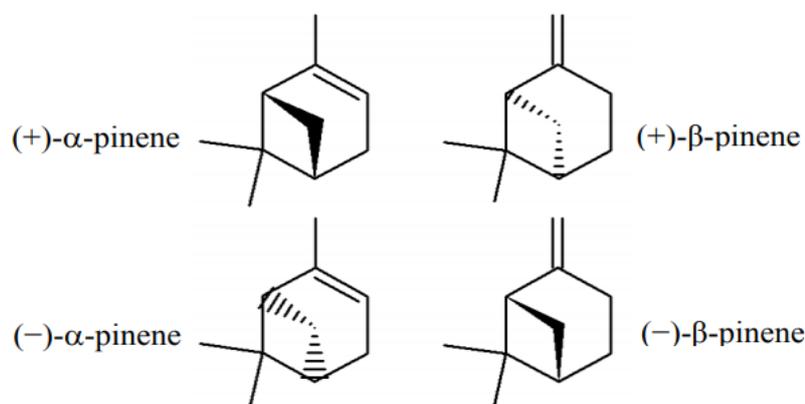


Fig. 2. Fórmulas estructurales de los enantiómeros de α pineno y β pineno.

Los pinenos muestran actividad fungicida y se han utilizado durante siglos para producir sabores y fragancias. Otras actividades biológicas están asociadas con estos terpenos, incluido el uso como insecticida natural (Silva y col., 2012). Estos compuestos presentan propiedades insecticidas disímiles dependiendo del insecto que se intenta controlar. En diferentes especies dentro del género *Sitophilus* (Coleóptera: Curculionidae) se observa que presentan efectos nocivos y repelentes, como lo es para *S. granarius* (Plata-Rueda y col., 2018), mientras que para *S. zeamais* y *S. oryzae* su actividad es baja ($DL_{50} > 100 \mu\text{L/L}$ aire) (Saad y Abdelgaleil, 2018; Villa-Ruano y col., 2018). Además, se reporta un efecto antifúngico en los aceites esenciales que poseen pinenos en su composición. Sin embargo, son escasos aquellos donde prueban el efecto de estos hidrocarburos monoterpénicos puros (Dambolena y col, 2016b; Gakuubi y col., 2017; Negrea y col., 2018).

La provincia de Córdoba es una de las principales productoras de maíz en el país, representando el 39,4% de la producción nacional en la campaña 2016/2017 (Bolsa de Comercio de Rosario, 2017). Estos granos durante el almacenamiento son afectados por la presencia de insectos quienes los deterioran por acción directa o indirecta al proceder como medio de transporte de microorganismos y toxinas,

incrementado la contaminación del alimento (Lamboni y col., 2009; Nesci y col., 2011; Ferreira-Castro y col., 2012).

Sitophilus zeamais es uno de los principales insectos que ataca al maíz almacenado. En cuanto al ciclo de vida de *S. zeamais*, los huevos se caracterizan por ser ovoides, de color blanco opaco y medir 0,7 x 0,3 milímetros (mm), mientras que las larvas ápodas, barrenadoras, presentan cuerpo blanco y grueso y cabeza pequeña y de color marrón claro. El estadio de pupa se caracteriza por poseer un cocón (2,75-3 mm) de color blanco pálido los primeros días de realizado y de color marrón claro hacia el final; presenta una probóscide larga hacia el interior y patas dobladas hacia el cuerpo. Por último, los adultos miden entre 2,5 y 4 mm de largo y son de color marrón-rojizo cuando jóvenes y marrón oscuro cuando maduros (Dell'Orto y Arias, 1985; Pérez, 1988; Usseglio, 2016). El ciclo de vida de estos insectos está íntimamente relacionado con el grano de maíz ya que se desarrolla por completo en su interior (Fig. 2). Con su aparato bucal la hembra perfora los granos de maíz y ovipone (1 huevo por postura, pudiendo llegar a poner entre 210 y 530 huevos en toda su vida) y luego cubre la perforación con un mucílago a modo de protección. Al cabo de 3 a 7 días emerge la larva, que luego pasará por 4 estadios hasta comenzar a construir el cocón, con desechos y secreciones, y pasar al estadio de pupa (Pérez, 1988). Al cabo de 3 a 6 días el adulto emerge del cocón pero permanece dentro del grano por varios días hasta que su cutícula se endurece. Una vez que emergen del grano las hembras se desplazan a la superficie del acopio de granos y segregan feromonas sexuales para atraer a los machos (Mason, 2003).

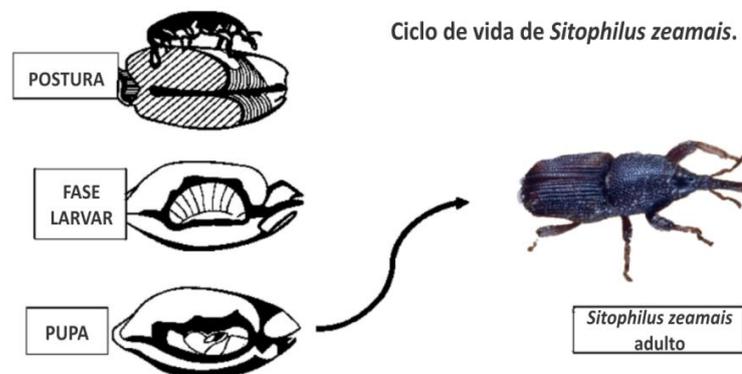


Fig. 3. Ciclo de vida de *Sitophilus zeamais*. Fuente: Agronegocios (2015)

Fusarium verticillioides es un hongo filamentoso que es el principal causante de la descomposición de la espiga de maíz en Argentina (Bashyal y col., 2014) y es uno de los principales productores de las micotoxinas denominadas fumonisinas (FBs), lo que representa un problema de consideración debido a sus implicancias toxicológicas en seres humanos y en animales de granja (Pizzolitto y col., 2013). Se piensa que *F. verticillioides* existe comúnmente de manera sistémica y asintóticamente en la mayoría del maíz de campo (en las raíces, los tejidos del tallo y los granos) y se transmite a la progenie por medio de semillas infectadas (Duncan y Howard, 2010). Además, la pudrición a menudo se asocia con tejidos del huésped dañados; por ejemplo, por la alimentación de insectos que pueden transportar los conidios. Es el principal patógeno del cultivo de maíz y limitante de la productividad porque ocasiona pérdidas importantes que varían año a año. Se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que tiene de causar la muerte del tejido hospedero y, luego, sobrevive como saprofito en el rastrojo (De la Torre-Hernández y col., 2014).

En vista de los problemas con los actuales agentes plaguicidas, hay un interés mundial en el desarrollo de estrategias alternativas para controlar la calidad de los granos almacenados que incluyen el desarrollo o la búsqueda de nuevas sustancias químicas amigables con el ambiente. Con los plaguicidas sintéticos se ha logrado controlar parcialmente a los insectos, pero su aplicación intensiva y continua generó el surgimiento de resistencia en los mismos (Haddi y col., 2018). En este sentido la bioconversión cobra gran importancia pudiendo utilizarse para producir nuevos compuestos capaces de combatir las plagas.

HIPOTESIS

Las enzimas lipoxigenasas fúngicas presentes en el micelio liofilizado de *P. sapidus* bioconvierten diferencialmente los isómeros estructurales α y β pineno, dando como resultado compuestos volátiles con mayor actividad bioplaguicida sobre *S. zeamais* y *F. verticillioides* que estos terpenos en su estado puro.

OBJETIVO GENERAL

Obtener nuevos productos volátiles a partir de dos monoterpenos puros, (-) α y (-) β pineno, como resultado de la acción enzimática del micelio de *P. sapidus* y ensayar la posible utilización de los compuestos resultantes sobre *S. zeamais* y *F. verticillioides*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Evaluar la bioconversión de dos hidrocarburos monoterpénicos puros, (-) α y (-) β pineno:**
 - a. Estudiar el perfil de compuestos volátiles del producto de bioconversión.
- 2. Cuantificar la actividad lipoxigenasa en el micelio de *Pleurotus sapidus*.**
- 3. Evaluar el efecto de los productos de bioconversión en el insecto *Sitophilus zeamais*:**
 - a. Evaluar el efecto insecticida.
 - b. Determinar el efecto en la conducta del insecto.
- 4. Evaluar la actividad antifúngica de los productos bioconvertidos sobre *Fusarium verticillioides*.**

MATERIALES BIOLÓGICOS

- ***P. sapidus***: La cepa de *P. sapidus* (PSA69), obtenida por fermentación líquida, fue donada por la Dra. Alejandra Omarini de la colección de cultivos del Instituto de Química de los Alimentos de Leibniz Universität Hannover (Hannover, Alemania). El micelio liofilizado se conservó a -20 °C hasta su utilización.
- **Insectos**: Se utilizaron adultos de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleóptera: Curculionidae). No se realizó diferencias por sexo. Fueron criados a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y a $70 \pm 5\%$ de humedad relativa (HR) y en continua oscuridad en contenedores de plástico. La dieta de cría para *S. zeamais* fue granos de maíz libres de insecticida.
- ***F. verticillioides***: Los inóculos fúngicos fueron preparados con la cepa toxicogénica *F. verticillioides* M 3125 obtenida desde el departamento de Agricultura de Illinois, Estados Unidos (Agricultural Research Service, National Center for Agricultural Utilization Research, Peoria, IL, USA).

PARTE I: EVALUACIÓN DE LA BIOCONVERSIÓN DE (-) α Y (-) β PINENO. ESTUDIO DEL PERFIL DE VOLÁTILES DEL PRODUCTO DE BIOCONVERSIÓN

MÉTODOLÓGÍA DE TRABAJO:

Esquema experimental del proceso de biotransformación:

El micelio liofilizado de *P. sapidus* (PSA69) se molió en mortero para facilitar la ruptura celular y la liberación de enzimas intracelulares, de acuerdo al protocolo de establecido por Omarini y col. (2014). Se procedió al armado de viales que contenían 50 mg de micelio pulverizado, 1,5 ml de buffer Tris-HCl (20 mM, pH 7,5) y tres esferas de vidrio, desinfectadas previamente con alcohol 70% (v/v), que facilitaron el agitado de la suspensión en el agitador orbital. Se incorporó 1,5 μ l (4,5 mM) de un inhibidor de proteasas (PMSF). Finalmente se añadieron 15 μ l (62 mM) del sustrato que constaban por un lado de (-) α pineno, por otro lado de (-) β pineno, y además se probó una mezcla de pinenos al 50% (v/v) de cada uno, en el mismo volumen final de sustrato para evaluar cuál proporción y tratamiento presentó mejor rendimiento. Se procedió al sellado con parafilm y fijado en agitador orbital en forma horizontal. El proceso fue realizado a 24 °C durante 20 h en ausencia de luz con una agitación de 150 rpm. El producto de bioconversión fue extraído con 1 ml de n-hexano y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

Análisis de la composición química del producto de bioconversión

El análisis de la composición de las muestras derivadas del proceso de bioconversión se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Al producto de bioconversión se le incorporó (+) *trans p-menth-2-ene* (Sigma Aldrich) como estándar interno (0,18 mM) para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos presentes y el rendimiento del proceso.

El cromatógrafo gaseoso (Perkin Elmer SQ8) estaba equipado con una columna apolar DB-5 (25 m \times 0,25 mm \times 0,25 μ m de espesor). La temperatura del horno fue programada a 50°C durante 2 min y luego a 3°C/min hasta alcanzar los 200°C. El inyector y detector presentaron temperaturas fijas de 200 y 270°C, respectivamente. El gas portador fue Helio a un flujo constante de 0,9 ml/min; y la

fuelle del detector se fijó en 70 eV. Los compuestos volátiles se identificaron comparando sus índices de retención (determinado sobre la base de *n*-alcanos homólogos en las mismas condiciones), espectros de masas con aquellos de estándares auténticos cuando fue posible y con bases comerciales de datos espectrales de masas (NIST 98 MS Rev. D. 01.00; HP, Ringoes, NJ, EE. UU.) (Dambolena y col., 2016a).

RESULTADOS:

Los perfiles de volátiles de los productos de biotransformación se observan en la Tabla 1. Los isómeros de los pinenos presentan varios productos de bioconversión con diferencias de composición entre ellos. Para (-) α pineno se obtuvo una reducción del 99,9% en relación a la cantidad inicial del terpeno puro, mientras que en el caso de (-) β pineno la reducción fue de un 99,5%, siendo posible que una proporción de estos se hayan volatilizado en el proceso.

Tabla 1 Cuantificación del perfil de volátiles de los productos de biotransformación obtenidos a partir de pinenos mediante acción enzimática de *P. sapidus*.

Tiempo de retención (min)	Compuestos	Cantidad en el biotransformado de (-) α pineno (ng/mL)	Cantidad en el biotransformado de (-) β pineno (ng/mL)
6,49	cumeno	0,08 \pm 0,06	0,09 \pm 0,05
6,84	α pineno	8,43 \pm 0,81	-
7,70	octen-3-ona	0,15 \pm 0,11	0,15 \pm 0,07
7,90	octen-2-ol	-	0,17 \pm 0,08
8,38	β pineno	-	36,11 \pm 3,16
8,88	mesitileno	0,10 \pm 0,04	0,31 \pm 0,06
9,91	compuesto no identificado	0,15 \pm 0,07	0,33 \pm 0,02
10,13	Limoneno	0,07 \pm 0,07	0,22 \pm 0,02
10,27	metil ciclohexilcarboxilato	0,09 \pm 0,05	0,24 \pm 0,06
10,34	n-octanol	0,04 \pm 0,02	-
10,85	fenil propanal	0,03 \pm 0,01	0,11 \pm 0,07
12,92	isopinocarveol	<i>tr</i>	-
13,82	pinocarveol	-	0,82 \pm 0,41
14,09	verbenol	<i>tr</i>	-
14,48	pinocarvona	<i>tr</i>	1,03 \pm 0,4
15,50	mirtenal	-	0,60 \pm 0,25
15,86	verbenona	(15 \pm 0,18) $\times 10^{-2}$	-

tr= traza (compuestos <0,01 ng/ml); (-) compuestos no encontrados en los cromatogramas.

En la composición química de ambos productos biotransformados se identificaron 17 nuevos compuestos, 13 pertenecientes al producto de la biotransformación del (-) α pineno y 12 del (-) β pineno. Además se encontraron otros compuestos que también estaban presentes en el control (micelio sin pinenos) aunque en otras proporciones y que en su mayoría fueron hidrocarburos lineales (nonano, decano, undecano, undecino, dodecano, tridecano). Como compuestos derivados únicamente de la biotransformación del (-) α pineno se destacan *n*-octanol,

isopinocarveol, *cis*-verbenol y verbenona, mientras que el octen-2-ol, pinocarveol, mirtenal sólo están presentes en el biotransformado obtenido a partir del (-) β pineno.

Entre los grupos funcionales que encontramos en la biotransformación del (-) α pineno (Fig. 4, a) observamos una diversidad de hidrocarburos no aromáticos (2,4%), hidrocarburos aromáticos (1,96%), cetonas (1,65%), ésteres (0,98%), alcoholes (0,54%) y aldehídos (0,32%). Mientras que en el biotransformado del (-) β pineno encontramos cetonas (2,93%), alcoholes (2,46%), aldehídos (1,76%), hidrocarburos aromáticos (1,00%), no aromáticos (1,00%) y esterés (0,60%) (Fig. 4, b).

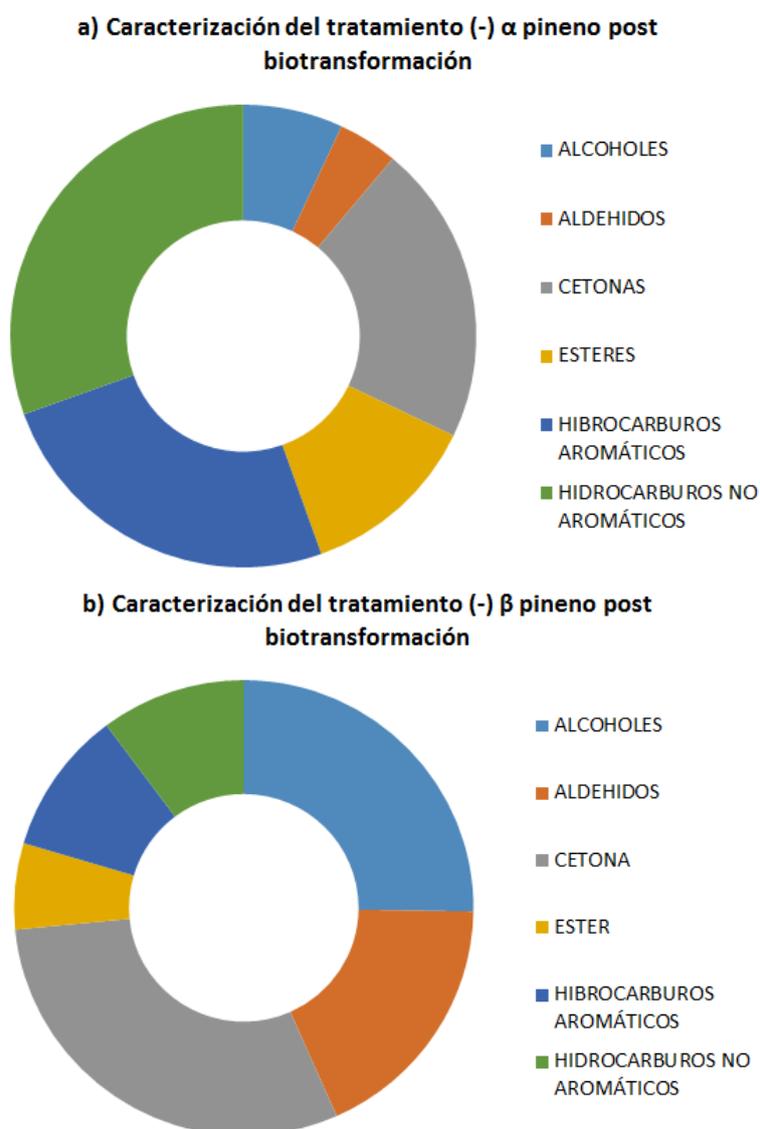


Fig. 4 Productos encontrados en las muestras bioconvertidas a partir de los isómeros de pineno mediante acción enzimática de *P. sapidus*.

Los cromatogramas del control se encuentran en el Anexo I, los del biotransformado de (-) α y (-) β pineno en Anexo II y III respectivamente.

PARTE II: CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD LIPOXIGENASA EN EL MICELIO DE *Pleurotus sapidus*

MÉTODOLÓGÍA DE TRABAJO:

La actividad enzimática de la LOX se determinó espectrofotométricamente monitoreando el incremento en la absorbancia a 234 nm producida en base al producto, hidroperóxido de dieno conjugado, siendo el ácido linoleico el sustrato. Una unidad enzimática fue definida como el incremento de la absorbancia de 0,001/min, bajo las condiciones ensayadas (Malekian y col., 2000).

El ensayo se llevó a cabo en una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía 40 µl de solución sustrato (compuesta por 18 mg de ácido linoleico, 22 mg de Tween 20, 4 mg de NaOH 1 M, y 4,86 ml de agua destilada), 5 µl de solución enzimática a medir y 175 µl de buffer TRIS-HCl pH 7,5 (en el caso del control) o 155 µl de buffer TRIS-HCL más 20 µl de terpeno (tratamiento). La absorbancia se registró a 234 nm cada 30 segundos (s) durante 20 minutos (min) usando un espectrofotómetro UV-vis para placas Thermofisher Multiskan Spectrum a 30°C. La actividad de la enzima fue calculada sobre la base del coeficiente de extinción molar de los hidroperóxidos de dieno conjugado a 234 nm ($\epsilon = 2,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Plagemann y col., 2013). Los blancos consistieron en 40 µL de buffer en lugar de solución de enzima.

La concentración de proteínas en los extractos enzimáticos se determinó por la técnica Bradford (1976). La misma fue determinada en placas 96 pocillos, 5 µL de *buffer* (control) o muestras y 250 µL de reactivo Bradford. Posteriormente, la placa fue agitada por 30 s y luego se efectuó un reposo a temperatura ambiente durante 20 min. La absorbancia fue determinada a 595 nm, y extrapolada en una curva de calibración previamente preparada con albúmina de suero bovina (0,1-1,4 mg/mL).

RESULTADOS:

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos para la actividad de las enzimas lipoxigenasas fúngicas presentes en el micelio liofilizado de *P. sapidus* calculada en base a la producción hidroperóxidos de dieno conjugados.

Tabla 2: Actividad LOX determinada mediante la formación de hidroperóxidos de dieno conjugados.

TRATAMIENTO	Actividad enzimática (mU/mL/mg proteína)
CONTROL	$(1,75 \pm 10,34) \times 10^{-3}$
(-) α PINENO	$(5,63 \pm 10,46) \times 10^{-5}$
(-) β PINENO	-

Como puede observarse, la actividad enzimática en presencia del terpeno puro (-) α pineno se vio disminuida con respecto al control traducido esto en una menor transformación del ácido linoleico en su producto (hidroperóxido de dieno conjugado). Por otro lado, la medición de la actividad en presencia del isómero (-) β pineno no pudo cuantificarse con la presente metodología ya que este compuesto presenta absorbancia a la longitud de onda utilizada para dicha medición.

La formación de hidroperóxidos mediante la actividad LOX en presencia del terpeno (-) α pineno se mostró reducida en un $98,17 \pm 0,34\%$. Las hipótesis sobre este resultado se describirán en la discusión.

**PARTE III: EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS PRODUCTOS DE BIOCONVERSIÓN
Y DE LOS COMPUESTOS PUROS EN EL INSECTO *Sitophilus zeamais***

A) DETERMINACIÓN DEL EFECTO INSECTICIDA FUMIGANTE

METODOLOGÍA DE TRABAJO:

Se realizó de acuerdo a Zunino y col. (2015) en donde un papel de filtro (Whatman) de 2 cm de diámetro fue impregnado con los productos de bioconversión, en una serie de concentraciones expresadas en μL de producto por litro de aire ($\mu\text{L}/\text{L}$) según el detalle de la tabla 3. Este papel de filtro impregnado se colocó en la parte interior de la tapa de una botella color caramelo de 30 ml a la cual se le agregó una red para evitar que el insecto entre en contacto con los mismos. En el interior de la botella se colocaron 10 insectos adultos. Este sistema se mantuvo cerrado durante 48 h y se contabilizó el número de insectos vivos, muertos y agonizantes a las 24 h y a las 48 h. Se realizaron 6 réplicas en 2 tiempos. Se repitió el mismo procedimiento para (-) α y (-) β pineno puros. Los controles se llevaron a cabo exponiendo a los insectos al solvente utilizado para la extracción de los compuestos volátiles (n-hexano).

Tabla 3: Detalle de los tratamientos puestos a prueba mediante la técnica de fumigación.

TRATAMIENTO PUESTO A PRUEBA	CONCENTRACIONES PROBADAS ($\mu\text{L}/\text{L}$)
(-) α pineno puro	500, 450, 150
(-) β pineno puro	500, 450, 150
Biotransformado a partir de (-) α pineno	500, 300, 450, 150
Biotransformado a partir de (-) β pineno	500, 300, 450, 150
Biotransformado a partir de la mezcla 1:1 de ambos pinenos	500, 300, 150

Análisis estadístico:

La dosis letal 50 (DL₅₀) de los ensayos de actividad insecticida fueron determinados usando análisis de Probit en el software Polo-Plus (LeOra Software, 2005). Los análisis de la varianza, *test-t* y pruebas de normalidad fueron realizados en el programa InfoStat (Di Rienzo y col., 2016).

B) DETERMINACIÓN DEL EFECTO SOBRE LA CONDUCTA DEL INSECTO

METODOLOGÍA DE TRABAJO:

Para determinar el efecto de atracción/repelencia de los compuestos sobre *S. zeamais* se utilizó el método en placa partida, similar al descrito por Wagan y col. (2018). El test se realizó en condiciones de laboratorio ($28 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 5\%$ humedad relativa (HR)), utilizando discos de papel de filtro de 9 cm de diámetro separados, mediante una marca, en dos mitades en el interior de una cápsula de petri. Una de las mitades fue impregnada con los tratamientos a ensayar en distintas concentraciones ($\mu\text{L/L}$) (ver tabla 4) y la mitad restante fue impregnada con n-hexano, correspondiéndose al control. Tras secado del papel del filtro se depositaron 10 individuos adultos en el interior de la cápsula de Petri y se colocó rápidamente la tapa y se selló con parafilm para evitar el escape de los compuestos volátiles. Los olfatómetros fueron llevados a la estufa oscura a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y $70 \pm 5\%$ HR. El número de insectos en cada mitad (Tratamiento vs Control) de la cápsula se cuantificó a los 15, 60, y 120 min. El experimento fue realizado por sextuplicado para cada tratamiento, en diferentes días. La posición de las cápsulas fue cambiada en cada réplica.

Tabla 4: Detalle de los tratamientos puestos a prueba mediante la técnica de atracción/repelencia en placa partida.

TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (μL/L)
Biotransformado a partir de (-) α pineno	500, 300, 100, 50, 5
Biotransformado a partir de (-) β pineno	500, 300, 100, 50, 5
Biotransformado a partir de la mezcla 1:1 de ambos pinenos	500, 300, 100, 50, 5
(-) α pineno puro	500, 100, 5
(-) β pineno puro	500, 100, 5
Mezcla 1:1 (-) α y (-) β pineno puro	500, 100, 5

Controles de Independencia (ambas partes con *n*-hexano): Concentración más alta por cada réplica

En base a la cantidad de insectos en cada extremo de la cápsula un índice de respuesta (IR) fue calculado usando la siguiente ecuación:

$$IR = \left[\frac{(T - C)}{Tot} \right] \times 100$$

Donde **T** es el número de insectos encontrados en la mitad de la placa con el compuesto a prueba, **C** es el número de insectos en la mitad de la placa control y **Tot** es el total de insectos liberados. Valores positivos del IR indican atracción, mientras que los negativos indican repelencia (Phillips, 1993).

Análisis estadístico:

La respuesta de los insectos fue sometida a *test-t* de Student's de muestras apareadas para determinar diferencias entre la cantidad de insectos en cada mitad de la placa. Los Índices de respuesta obtenidos para los tratamientos donde la respuesta del insecto fue estadísticamente significativa (*p* para *test-t* de Student's <0,05) estuvieron sujetos a un análisis de varianza de una vía (ANAVA) seguida de un test *LSD*

de Fisher, determinando las diferencias significativas entre valores medios de 0,05 de nivel de probabilidad. Los análisis de la varianza, *test-t* y pruebas de normalidad fueron realizados en el programa InfoStat.

RESULTADOS:

Para la determinación del efecto insecticida de los compuestos sobre *S. zeamais* se procedió a evaluar diferentes concentraciones (tabla 3). Al ensayar los compuestos biotransformados encontramos que a las 24 h de exposición ningún insecto había muerto en las sucesivas réplicas que se realizaron. A las 24 h se observaron algunos individuos moribundos pero el número no fue consistente en diferentes réplicas para poder someterlo a pruebas estadísticas.

En contraste, para los compuestos en su estado puro se obtuvieron niveles de letalidad (tabla 5), por lo que se procedió al cálculo de la dosis letal 50 (DL₅₀) y 95 (DL₉₅) para ambos terpenos, siendo un insecticida más eficiente el (-) α pineno puro (DL₅₀= 296,65 μ L/L).

Tabla 5: Detalle de las dosis letales 50 y 95 de (-) α pineno y (-) β pineno obtenidas mediante ensayo insecticida fumigante.

COMPUESTO	DOSIS LETAL 50 (μ L/L)	DOSIS LETAL 95 (μ L/L)	Z	χ^2
(-) α pineno puro	296,65 (263,50 - 332,69)	469,37 (416,50 – 562,53)	9,34	56,87
(-) β pineno puro	310,47 (264,42 – 332,69)	521,20 (448,94 – 664,56)	9,61	83,57
(-) α pineno biotransformado	>>300	-	-	-
(-) β pineno biotransformado	>>300	-	-	-

Por otra parte, para determinar la respuesta comportamental de *S. zeamais* frente a los productos de biotransformación se procedió a evaluar distintas

concentraciones y en diferentes tiempos de duración del ensayo. Además, se probaron las mismas concentraciones en los terpenos puros. En la Fig. 5 se observan los resultados que arrojaron diferencias estadísticamente significativas para el test de atracción/repelencia a los 15 min.

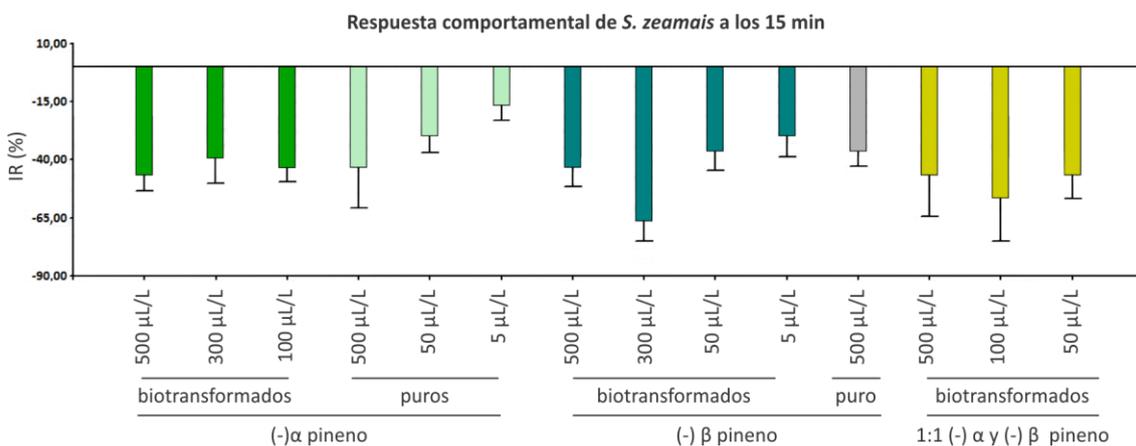


Fig. 5: Respuesta comportamental de *S. zeamais* adulto frente a los terpenos puros y los terpenos biotransformados. El Índice de Repelencia fue evaluado para los 15 min de exposición. Todos los tratamientos graficados presentan diferencias significativas, respecto al control, basadas en *test T-Student's* para comparaciones de a pares (p -valor $\leq 0,05$).

Podemos observar que a tiempos breves de exposición (15 min, fig. 5) ambos biotransformados a las dosis evaluadas presentaron efecto repelente, siendo el (-) β pineno biotransformado el que presenta mayor índice de repelencia a una concentración de 300 μl/L (IR = -66,67 ± 8,43), seguidos por el biotransformado obtenido de la mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno a una concentración de 100 μl/L (IR = -56,67 ± 18,20). Asimismo, se destaca el efecto a bajas concentraciones (5 μl/L) del biotransformado derivado del (-) β pineno (IR = -30,00 ± 8,56) y del terpeno puro (-) α pineno (IR = -16,67 ± 6,15). A 15 min, el biotransformado de (-) α pineno no presentó diferencias significativas con respecto al control para las concentraciones 50 μl/L y 5 μl/L. Para la mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno las concentraciones 300 μl/L y 5 μl/L no presentaron diferencias estadísticamente significativas para la elección del insecto. Lo mismo se observa para los compuestos puros testeados del (-) β pineno a

las concentraciones de 50 $\mu\text{l/L}$ y 5 $\mu\text{l/L}$ y de la mezcla pura 1:1 (V/V) ninguna concentración evaluada presentó diferencias significativas (500 $\mu\text{l/L}$, 50 $\mu\text{l/L}$ y 5 $\mu\text{l/L}$).

En la Fig. 6 se observan los resultados que arrojaron diferencias estadísticas para el test de atracción/repelencia a los 60 min.

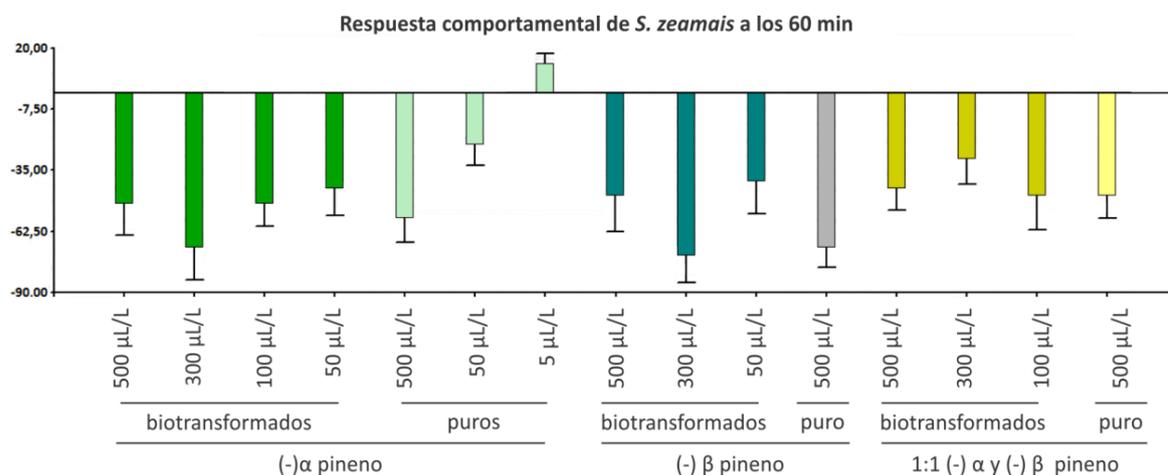


Fig. 6: Respuesta comportamental de *S. zeamais* adulto frente a los terpenos puros y los terpenos biotransformados. El Índice de Repelencia fue evaluado para los 60 min de exposición. Todos los tratamientos graficados presentan diferencias significativas, respecto al control, basadas en *test T-Student's* para comparaciones de a pares (p -valor $\leq 0,05$).

A tiempos medios de exposición (60 min, fig. 6) todos los productos de biotransformación mantuvieron su efecto repelente, agregándose a los tratamientos significativamente diferentes del control el biotransformado (-) α pineno (50 $\mu\text{l/L}$) y el biotransformado de la mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno (300 $\mu\text{l/L}$). Además (-) β pineno puro (500 $\mu\text{l/L}$) muestra repelencia significativamente superior al control, siendo aún mayor que a los 15 min. El (-) β pineno biotransformado es el que presenta mayor índice de repelencia a una concentración de 300 $\mu\text{l/L}$ (IR = -73,33 \pm 12,29), siendo aún mayor que a los 15 min, seguidos por el biotransformado obtenido del (-) α pineno (300 $\mu\text{l/L}$, IR = -70 \pm 14,38) y el terpeno puro (-) β pineno con el mismo valor de repelencia (300 $\mu\text{l/L}$, IR = -70,00 \pm 8,56). Se destaca que a este tiempo de exposición, a menor concentración (50 $\mu\text{l/L}$) del compuesto biotransformado (-) α pineno se obtienen efectos repelentes (IR = -43,33 \pm 12,02). Por otra parte, para el terpeno puro (-) α pineno se obtuvo una respuesta de atracción (IR= 13,33 \pm 4,22) para la

concentración de 5 μL . Los biotransformados de (-) α pineno (5 μL), de (-) β pineno (100 μL , 5 μL) y de la mezcla 1:1 (V/V) (5 μL , 50 μL) y los compuestos puros (-) β pineno (50 μL , 5 μL) y mezcla 1:1 (V/V) (500 μL , 50 μL , 5 μL) no presentaron diferencias estadísticamente significativas para la elección del insecto.

En la fig. 7 se observan los resultados que arrojaron diferencias estadísticas para el test de atracción/repelencia a los 120 min.

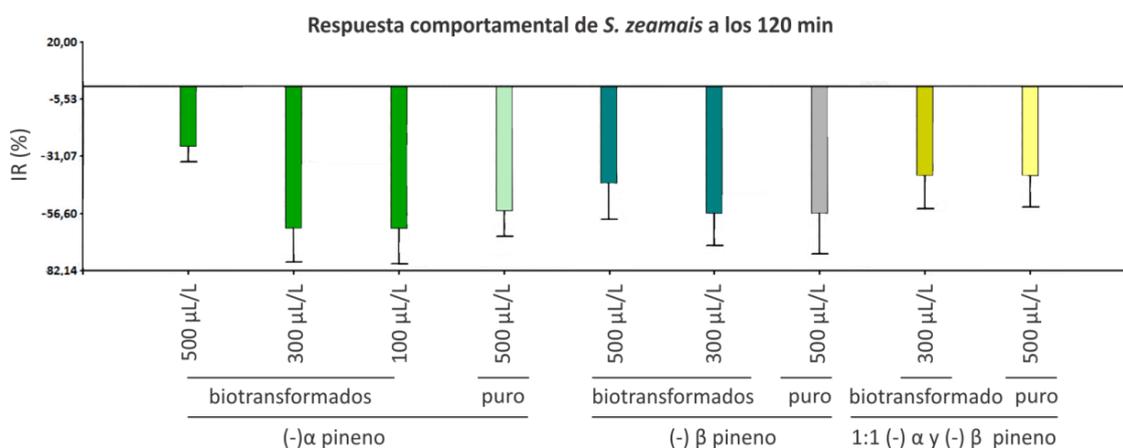


Fig. 7: Respuesta comportamental de *S. zeamais* adulto frente a los terpenos puros y los terpenos biotransformados. El Índice de Repelencia fue evaluado para los 120 min de exposición. Todos los tratamientos graficados presentan diferencias significativas, respecto al control, basadas en *test T-Student's* para comparaciones de a pares (p -valor $\leq 0,05$).

A largos tiempos exposición (120 min, fig. 7) las concentraciones más bajas dejan de presentar efecto sobre el comportamiento del insecto (50 μL y 5 μL de todos los tratamientos), arrojando los mayores índices de repelencia el biotransformado obtenido del (-) α pineno a una concentración de 100 μL ($\text{IR} = -63,33 \pm 15,84$) y 300 μL ($\text{IR} = -63,33 \pm 14,98$), seguidos por el biotransformado obtenido del (-) β pineno a una concentración de 300 μL ($\text{IR} = -56,67 \pm 14,06$) igualando a su terpeno en estado original para esa concentración ($\text{IR} = -56,67 \pm 14,06$). Este último solo obtuvo repelencia a la mayor concentración probada (500 μL), al igual que su isómero puro (-) α pineno. Cabe destacar que el producto de biotransformación obtenido a partir del (-) β pineno mantuvo su elevada repelencia a través del tiempo a 300 μL . Los biotransformados de (-) β pineno (100 μL) y de la mezcla 1:1(V/V)

(500 μ l/L, 100 μ l/L) no presentaron diferencias estadísticamente significativas para la elección del insecto.

El tratamiento biotransformado de (-) α pineno a 100 μ l/L fue el que mantuvo el efecto repelente a lo largo de todo el ensayo, determinando que sea el mejor tratamiento obtenido para esta bioactividad. En el caso del biotransformado del (-) β pineno el mayor valor de repelencia se encontró a 300 μ l/L, mientras que para (-) α pineno y (-) β pineno puro fue a 500 μ l/L, durante todos los tiempos ensayados. Por otra parte, en términos generales, a menores tiempos de exposición se obtiene una mayor sensibilidad en la respuesta comportamental de *S. zeamais*, siendo los 60 min el tiempo con mayores valores en el IR.

PARTE IV: EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Fusarium verticillioides*

METODOLOGÍA DE TRABAJO:

Para evaluar la actividad antifúngica, los productos de bioconversión ((-) α pineno, (-) β pineno y sus mezclas al 50%) y los compuestos puros ((-) α pineno, (-) β pineno y sus mezclas al 50%) fueron incorporados en el medio de cultivo PDA (agar papa glucosado) previo solidificación del mismo en diferentes concentraciones (5000, 500 y 100 ppm) en cápsulas de Petri. Luego, se procedió a la inoculación con 10 μ l de una suspensión de conidios de *F. verticillioides* (1×10^6 conidios/ml) e incubadas a $28 \pm 2^\circ\text{C}$. El crecimiento radial fue medido a diario hasta que los controles completaron el diámetro de la cápsula de Petri (Herrera y col., 2015).

Posteriormente, cuando el diámetro del micelio completó el de la cápsula, se procedió a la cuantificación de conidios. Para ello se procedió al vertido de 5 ml de agua destilada estéril sobre el micelio y posterior destrucción del mismo mediante espátula de Drigalski estéril. La suspensión fue diluida para la cuantificación de conidios en el microscopio óptico en la cámara de Neubauer.

Análisis estadístico:

Los datos obtenidos estuvieron sujetos a un análisis de varianza de una vía (ANAVA) seguida de un test *LSD de Fisher*, determinando las diferencias significativas entre valores medios de 0,05 de nivel de probabilidad. Los análisis de la varianza, *test-t* y pruebas de normalidad fueron realizados en el programa *InfoStat*.

RESULTADOS:

Los valores obtenidos para la inhibición fúngica de los terpenos puros y los productos de biotransformación se presentan en la Tabla 6. Se puede observar que a bajas concentraciones del producto biotransformado de (-) α pineno la inhibición es

leve pero aumenta cuando la dosis evaluada es mayor (efecto dosis-dependiente). Lo inverso ocurre en relación al terpeno puro, en donde la inhibición es fuerte a concentraciones menores y a mayores concentraciones se presentaría un efecto promotor sobre el crecimiento del micelio de *F. verticillioides*. La relación se muestra en la Fig. 8. Este patrón se repite para los ensayos realizados para (-) β pineno y sus productos biotransformados (Fig. 9) y para los ensayos realizados para las mezclas (1:1) de terpenos puros y sus respectivos biotransformados (Fig. 10).

Tabla 6: Inhibición del crecimiento de *F. verticillioides* de los compuestos puros y sus productos de biotransformación.

CONCENTRACIÓN	TRATAMIENTO	INHIBICIÓN FÚNGICA (%)
100 ppm	(-) α pineno puro	10,06 \pm 0,89 ^{*A}
	Biotransformado de (-) α pineno	0,77 \pm 0,59 ^{*B}
500 ppm	(-) α pineno puro	1,08 \pm 0,43 ^{*A}
	Biotransformado de (-) α pineno	2,87 \pm 0,50 ^{*B}
1000 ppm	Biotransformado de (-) α pineno	1,19 \pm 0,34 [*]
5000 ppm	(-) α pineno puro	-0,43 \pm 0,43 ^A
	Biotransformado de (-) α pineno	2,38 \pm 0,43 ^{*B}
100 ppm	(-) β pineno puro	8,23 \pm 1,15 ^{*A}
	Biotransformado de (-) β pineno	1,6 \pm 0,35 ^{*B}
500 ppm	(-) β pineno puro	0,65 \pm 0,37 ^{*A}
	Biotransformado de (-) β pineno	4,7 \pm 0,77 ^{*B}
1000 ppm	Biotransformado de (-) β pineno	3,43 \pm 0,12 [*]
5000 ppm	(-) β pineno puro	-1,52 \pm 0,57 ^{*A}
	Biotransformado de (-) β pineno	10,39 \pm 0,99 ^{*B}
100 ppm	Mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno puro	9,31 \pm 0,22 ^{*A}
	Biotransformado de mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno	0,06 \pm 0,37 ^B
500 ppm	Mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno puro	0 \pm 0,75
	Biotransformado de mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno	0,6 \pm 0,5
1000 ppm	Biotransformado de mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno	0,27 \pm 0,67 [*]
5000 ppm	Mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno puro	-2,6 \pm 0,0 ^{*A}
	Biotransformado de mezcla 1:1 (V/V) de (-) α y (-) β pineno	9,52 \pm 0,87 ^{*B}

*Indica diferencias significativas con el control ($p < 0,05$). Letras diferentes indican diferencias significativas, por concentración para cada par (compuesto puro vs biotransformado), para un ANOVA y test *LSD de Fisher* ($p < 0,05$)

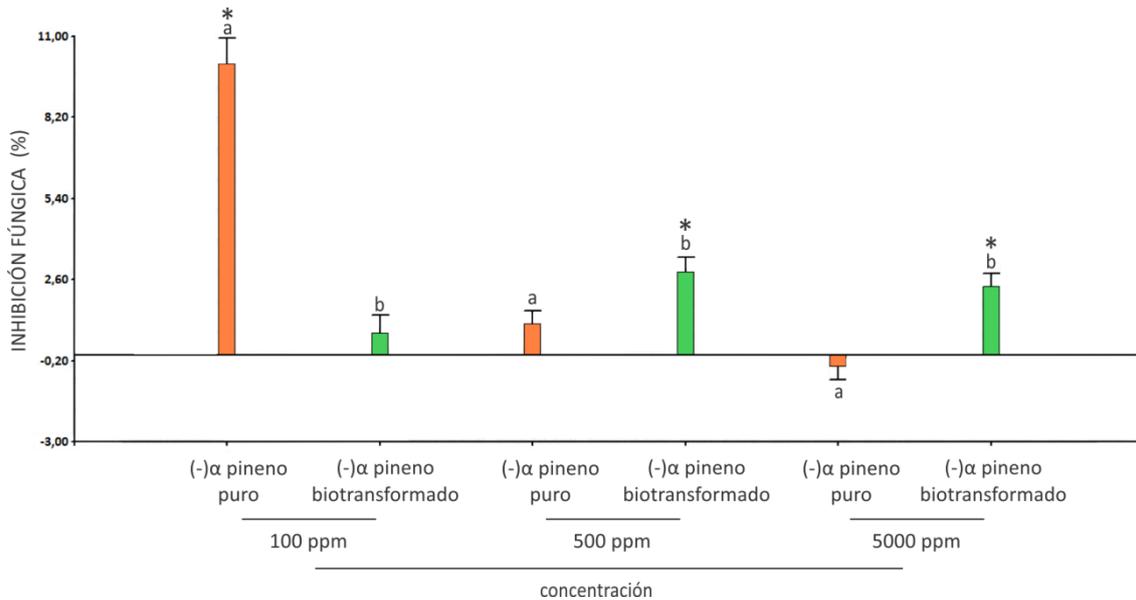


Fig. 8: Comparación entre las respuesta en el desarrollo de *F. verticillioides* crecido en contacto con (-) α pineno puros en comparación con los crecidos en el compuesto biotransformado a distintas concentraciones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre compuestos puros y biotransformados para un ANAVA ($p \leq 0,05$). Valores con asterisco (*) presentan diferencias significativas para un ANAVA con respecto al control ($p \leq 0,05$).

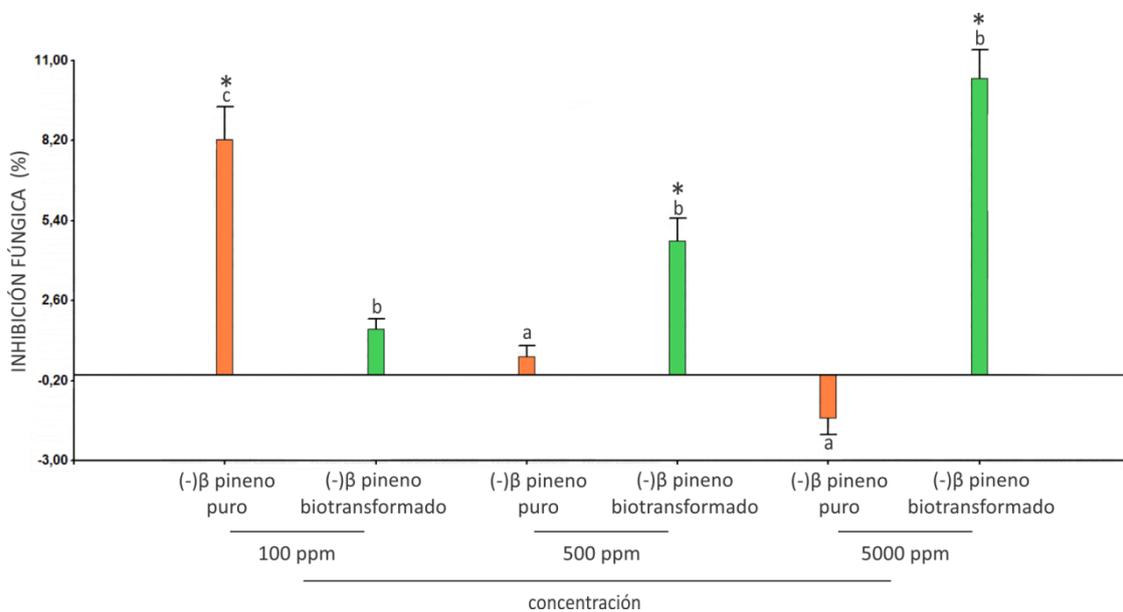


Fig. 9: Comparación entre las respuesta en el desarrollo de *F. verticillioides* crecido en contacto con (-) β pineno puros en comparación con los crecidos en el compuesto biotransformado a distintas concentraciones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre compuestos puros y biotransformados para un ANAVA ($p \leq 0,05$). Valores con asterisco (*) presentan diferencias significativas para un ANAVA con respecto al control ($p \leq 0,05$).

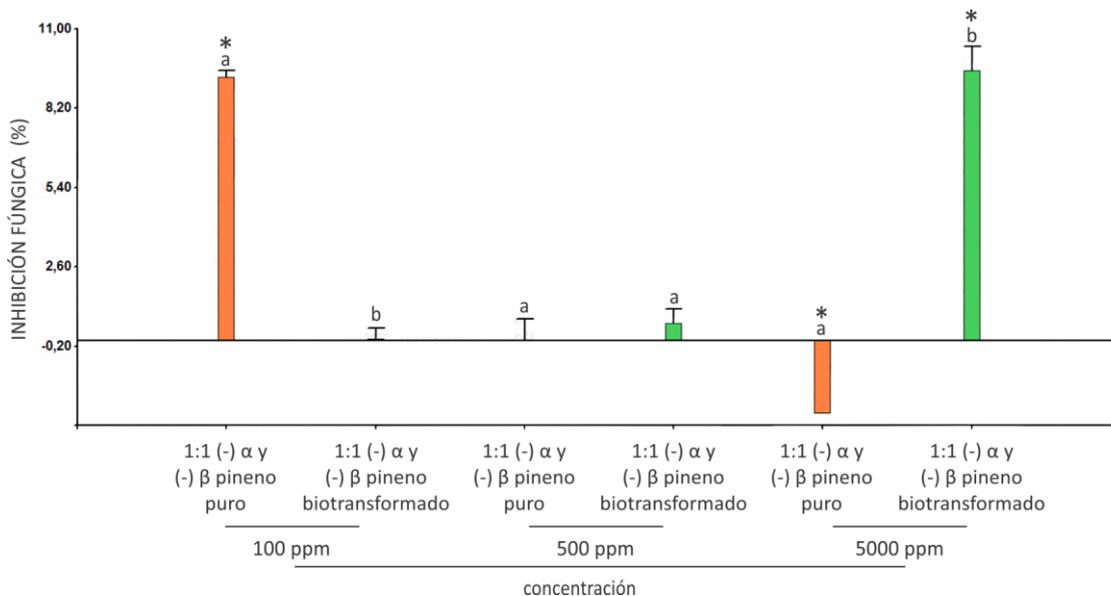


Fig. 10: Comparación entre las respuesta en el desarrollo de *F. verticillioides* crecido en contacto con la mezcla (1:1) de (-) α y (-) β pineno puros, en comparación con los crecidos en el compuesto biotransformado a distintas concentraciones. Letras diferentes indican diferencias significativas entre compuestos puros y biotransformados para un ANAVA ($p \leq 0,05$). Valores con asterisco (*) presentan diferencias significativas para un ANAVA con respecto al control ($p \leq 0,05$).

La Fig. 11 resume la magnitud de la inhibición de los productos biotransformados sobre *F. verticillioides*, mostrando que a menores concentraciones (100 ppm) no se obtienen diferencias entre los distintos biotransformados ni en relación al control. Al aumentar las concentraciones (500 y 1000 ppm) de los biotransformados en el medio de cultivo obtenemos efecto inhibitorio para los biotransformados de (-) α y (-) β pineno. Para la concentración de 5000 ppm los tres biotransformados ensayados presentan valores inhibitorios que superan al de los terpenos puros, siendo el biotransformado (-) β pineno el de mayor valor ($10,39 \pm 0,99\%$), aunque sin diferenciarse significativamente del biotransformado proveniente de la mezcla de (-) α y (-) β pineno ($9,52 \pm 0,87\%$).

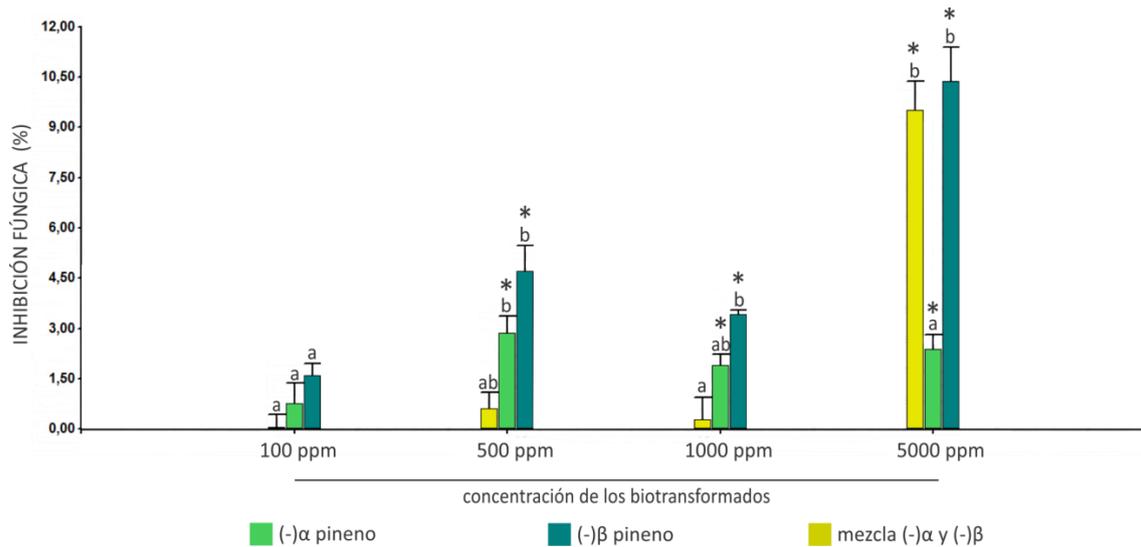


Fig. 11: Respuesta en el desarrollo de *F. verticillioides* crecido en contacto con los terpenos biotransformados. Letras diferentes indican diferencias significativas entre compuestos puros y biotransformados para un ANAVA ($p \leq 0,05$). Valores con asterisco (*) presentan diferencias significativas para un ANAVA con respecto al control ($p \leq 0,05$).

Posteriormente, se cuantificó la producción de conidios (estructuras reproductivas asexuales) que presentaban los diferentes tratamientos al finalizar los días de exposición a los compuestos. Estos resultados se visualizan en la Tabla 7, en donde el número de conidios obtenidos de los tratamientos biotransformados no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al control, a excepción de la concentración máxima que si las presentó (5000 ppm). Por otro lado los compuestos puros inhibieron la producción de estas estructuras disminuyéndolas en un orden de magnitud.

Para las concentraciones de 500 y 100 ppm los tratamientos biotransformados presentan diferencias significativas respecto a sus compuestos puros.

Tabla 7: Número de conidios producidos por *F. verticillioides* en contacto con los diferentes terpenos y sus biotransformados.

TERPENO	CONDICIÓN DEL TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (ppm)	NÚMERO DE CONIDIOS
(-) α pineno	biotransformado	5000	$(1,87 \pm 0,09) \times 10^9$ *
		1000	$(2,07 \pm 0,19) \times 10^{10}$
		500	$(2,77 \pm 0,22) \times 10^{10}$ P
		100	$(2,71 \pm 0,35) \times 10^{10}$ P
	puro	5000	$(1,68 \pm 0,12) \times 10^9$ *
		500	$(1,98 \pm 0,23) \times 10^9$ *P
100		$(1,66 \pm 0,09) \times 10^9$ *P	
(-) β pineno	biotransformado	5000	$(1,72 \pm 0,10) \times 10^9$ *
		1000	$(2,43 \pm 0,09) \times 10^{10}$
		500	$(2,59 \pm 0,14) \times 10^{10}$ P
		100	$(2,44 \pm 0,23) \times 10^{10}$ P
	puro	5000	$(1,72 \pm 0,04) \times 10^9$ *
		500	$(3,00 \pm 0,18) \times 10^9$ *P
100		$(2,82 \pm 0,45) \times 10^9$ *P	
mezcla 1:1 (-) α y (-) β pineno	biotransformado	5000	$(2,19 \pm 0,27) \times 10^9$ *
		1000	$(2,63 \pm 0,07) \times 10^{10}$
		500	$(2,77 \pm 0,15) \times 10^{10}$ P
		100	$(2,89 \pm 0,20) \times 10^{10}$ P
	puro	5000	$(1,59 \pm 0,26) \times 10^9$ *
		500	$(1,73 \pm 0,18) \times 10^9$ *P
100		$(2,37 \pm 0,24) \times 10^9$ *P	
Control con <i>n</i> - hexano	puro	1000	$(2,53 \pm 0,07) \times 10^{10}$
	puro	5000	$(3,71 \pm 0,04) \times 10^{10}$
control	sin adicionales	0	$(2,50 \pm 0,06) \times 10^{10}$

*Indica diferencias significativas con el control ($p < 0,05$). Valores con letra (P) indican diferencias significativas entre el compuesto puro y el biotransformado para la misma concentración.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se observó que las enzimas del micelio de *P. sapidus* son efectivas en la bioconversión tanto del α como el β pineno obteniendo nuevos productos volátiles luego de 22 horas de acción. Estos nuevos compuestos en conjunto presentaron efecto repelente frente a *S. zeamais* pero no presentaron toxicidad. En cuanto a *F. verticillioides* se observó un efecto dosis-dependiente en la inhibición del crecimiento del hongo.

En cuanto a la medición de la actividad LOX en presencia de (-) α pineno se obtuvo una reducción de un $98,17 \pm 0,34\%$ con respecto al control. Este resultado puede deberse a distintas razones que describiremos a modo de hipótesis. En un caso, este terpeno podría ser sustrato de las enzimas LOX con una afinidad mayor por el sitio activo que el sustrato utilizado en el ensayo (ácido linoleico). Esto implicaría que los productos de la reacción catalizada por la LOX cuando su sustrato es el α pineno no absorberían luz UV en la longitud de onda utilizada en este ensayo. En otro caso, el α pineno podría ser un inhibidor de las LOX y por eso disminuir su actividad enzimática. Si fuera así, la biotransformación de los productos obtenidos provendría de la catálisis de otras familias enzimáticas, como las peroxidasas o lacasas (Skoronski y col., 2014; Moreno-Bayona y col., 2019; Paz y col., 2019). Para clarificar este punto, sería interesante realizar estudios de cinética enzimática de las LOX caracterizando su comportamiento a través de curvas de actividad enzimática en función de la concentración de sustrato, en ausencia y en presencia de los pinenos. Además, si confirmáramos que α pineno es sustrato de las LOX, a través de estos estudios podríamos optimizar las condiciones experimentales de la biotransformación, ajustando variables como el tiempo de incubación, y la concentración de terpenos.

Cabe aclarar que no pudo ensayarse la actividad enzimática de LOX en presencia del isómero β pineno porque este compuesto absorbe en el rango UV en el cual se da la absorción del producto de la reacción. Por ello es necesario encontrar un protocolo acorde para la determinación de la capacidad del β pineno como sustrato o como inhibidor de las LOXs.

Numerosos estudios demuestran que la biotransformación de α y β pineno mediante el uso de la maquinaria enzimática de microorganismos es muy prometedora. Se ha estudiado en bacterias del género *Pseudomonas* (Zorn y col., 2004; Boontawan y Stuckey, 2006; Bicas y col., 2008; Linares y col. 2009) y en diversos hongos filamentosos del género *Aspergillus* (Toniazzi y col., 2005; Rozenbaum y col., 2006; Rottava y col., 2010a, Rottava y col., 2010b) entre otros organismos. En este trabajo hemos demostrado que es posible utilizar *P. sapidus* como un microorganismo capaz de producir compuestos de alto valor económico por medio de la biotransformación del α y β pineno. Como se ha mencionado con anterioridad, la capacidad bioconversora de las enzimas de *P. sapidus* ya había sido probada (Fraatz y col., 2009), sin embargo este es un antecedente sobre la conversión diferencial de isómeros ya que algunos compuestos solo se han encontrado tras la biotransformación del α pineno (isopinocarveol, cis verbenol, y verbenona) y otros sólo para el β pineno (pinocarveol y mirtenal). Este resultado demuestra que la estructura molecular de estos terpenos posibilita la acción diferencial de las enzimas, dando como resultado diferentes productos (Vespermann, 2017).

En nuestro trabajo se identificaron productos provenientes de la oxidación de los pinenos por acción de las LOX, tal y como lo esperábamos basándonos en el trabajo de Fraatz y col. (2009). Comparando la composición de los productos que obtuvimos con los de otros trabajos, encontramos similitudes con respecto a la biocatálisis de distintos microorganismos sobre el sustrato α y β pineno (Fig. 12).

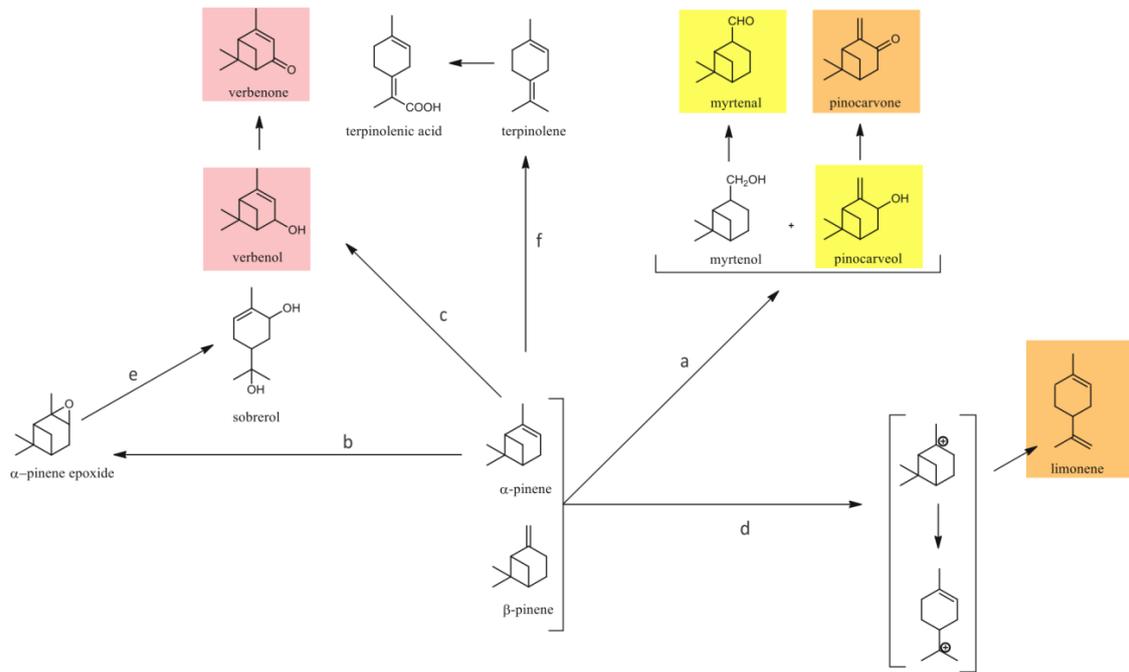


Fig. 12: Representación esquemática de las principales vías metabólicas del α y β pineno expuestas por (a) Savithiry (1998) (b) Linares y col. (2009) (c) Van Dyk y col. (1998) (d) Yoo y Day (2002) (e) Schrader (2007) (f) Narushima y col. (1982). Imagen modificada de Vespermann (2017). Compuestos en color rosa se corresponden con los encontrados solo en el biotransformado de α pineno, en amarillo aquellos encontrados en el biotransformado de β pineno y en naranja compuestos encontrados en ambos biotransformados.

Un ejemplo de vías de conversión, para el biotransformado de α pineno, la aparición de verbenol y verbenona. Estos compuestos se producen mediante la oxidación del doble enlace generando como intermediario un α epoxi-pineno y una posterior hidrogenación, posiblemente no enzimática (Fig. 13) (Prema y Bhattacharyya, 1962). Mediante el uso de otros organismos como *Aspergillus niger*, *Pseudomonas sp.*, *Hormonema sp.* y *Penicillium sp.* se han podido obtener estas mismas moléculas (Prema y Bhattacharyya, 1962; Van Dyk y col., 1998; Linares y col., 2009; Schrader, 2007).

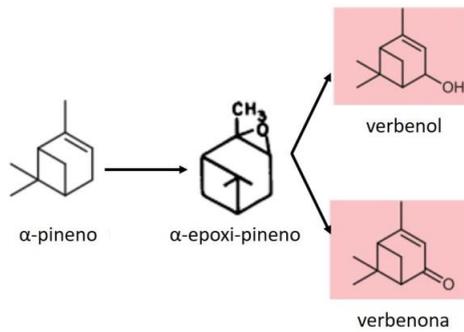


Fig. 13: Representación esquemática de la oxidación del α pineno a verbenona y verbenol. Imagen modificada de Prema y Bhattacharyya, (1962)

Otros compuestos encontrados en ambos productos de biotransformación son el limoneno junto con la pinocarvona, ambos obtenidos mediante la acción de *Pseudomonas* sp. (Yoo y Day (2002)) y *Bacillus* sp. La aparición de limoneno puede deberse a que esta molécula se forma como paso intermediario en las vías de transformación tanto del α como el β pineno, con el tiempo necesarios este hidrocarburo podría dar compuestos como el Ácido β -isopropenil pimelico (Yoo y Day (2002)). En la figura 14 se pueden observar una serie de isomerizaciones y sucesivas oxidaciones para dar lugar al limoneno, carveol, pinocarvona y mirtenal por ejemplo (Savithiry y col. (1998)).

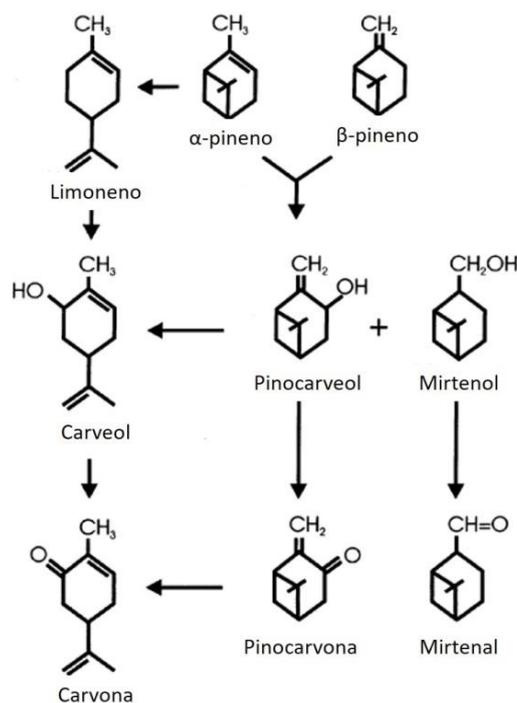


Fig. 14: Conversión de los pinenos. Imagen modificada de Savithiry y col. (1998)

La capacidad fumigante de los compuestos puros iniciales (α y β pineno) y de los biotransformados totales fue evaluada. Para los compuestos puros se obtuvieron valores elevados para las DL_{50} (α pineno= 296,65 μ L/L; β pineno= 310,47 μ L/L) y DL_{90} (α pineno= 469,37 μ L/L; β pineno= 521,20 μ L/L), pudiendo deberse este efecto a la capacidad que poseen este tipo de terpenos de inhibir la actividad de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), afectando la transmisión de impulsos entre neuronas (Zhang y col., 2015). Nuestros resultados difieren de aquellos trabajos llevados a cabo con insectos del mismo género pero de diferente especie, como es el caso de los expuestos por Lee y col. (2001) en donde las dosis letales obtenidas fueron mucho menores (DL_{50} α pineno= 54,9 μ L/L; β pineno= 78,9 μ L/L) (DL_{90} α pineno= 76,0 μ L/L; β pineno= 107 μ L/L) para *S. oryzae*. En nuestro grupo de investigación en *S. zeamais*, Herrera (2016) observó que los isómeros (-) β , (+) β y (-) α pineno no presentaron toxicidad a concentraciones elevadas (DL_{50} >>600 μ L/L). Sin embargo, cuando realizó pruebas con las mezclas de pinenos esta dosis se redujo (DL_{50} = 433,4 μ L/L), acercándose a las encontradas en nuestro trabajo. En el caso del presente trabajo esta última prueba no se realizó, sin embargo, sería un buen ensayo a futuro para contrastar los resultados. Estas diferencias encontradas con la bibliografía podrían deberse a la variabilidad en la generación, ya que la metodología aplicada fue la misma. De todos modos, cabe destacar que para las dosis encontradas los compuestos puros no prometen por si mismos ser buenos insecticidas fumigantes sobre *S. zeamais*.

Respecto al efecto insecticida de los compuestos biotransformados no se observó efecto letal (DL_{50} >>600 μ L/L). Este resultado puede deberse a que las concentraciones de pinenos son más bajas que el compuesto puro y que otros compuestos abundantes en el producto pertenecen a hidrocarburos no aromáticos que presentan escasa bioactividad. Un aumento en la cantidad de los compuestos obtenidos por biotransformación, o su purificación, podrían presentar efectos tóxicos sobre *S. zeamais* ya que muchos de sus componentes han sido reportados como buenos insecticidas. Este es el caso del limoneno, un compuesto activo registrado en 15 productos pesticidas utilizados como insecticidas y repelentes de insectos (Hebeish, 2008) y en nuestro grupo se obtuvo una DL_{50} de intermedia actividad (DL_{50} = 301,4 μ L/L) (Herrera, 2016). Además se encontró un alto efecto insecticida en el octanol

(DL₅₀= 43,2 µL/L) y un bajo efecto con el cumeno (DL₅₀>> 300 µL/L), ambos sobre *S. zeamais* (Herrera, 2016). En cuanto a la pinocarvona no se encontraron trabajos que prueben su toxicidad, pero se hipotetiza que tenga un efecto tóxico ya que las cetonas alfa-beta insaturadas son agentes alquilantes y muy tóxicos, un ejemplo de ello es la carvona (Herrera, 2016).

Cuando se analizaron los efectos sobre la conducta de *S. zeamais* se pudieron observar algunos resultados interesantes puesto que los biotransformados, tanto el α como el β pineno resultaron ser buenos repelentes a los tres tiempos evaluados (15 min, 60 min y 120 min). El biotransformado del (-) α pineno fue más efectivo que el biotransformado del (-) β pineno ya que la menor dosis a la cual el primero presentó repelencia fue 100 µL/L mientras que para el segundo fue 300 µL/L. A su vez, ambos tratamientos presentaron un mayor efecto repelente en relación con los compuestos puros que les dieron origen, siendo en ambos casos la dosis a la cual presentaron repelencia en los 3 tiempos evaluados 500 µL/L. Cabe destacar que el β pineno puro solo presentó repelencia a las concentraciones más altas para todos los tiempos (500 µL/L) mientras que α pineno llegó a valores de repelencia a bajas concentraciones (50 µL/L). Este resultado demuestra una mejora del efecto tras la biotransformación, ya sea porque los componentes del biotransformado proporcionen efectos repelentes sobre la conducta de *S. zeamais*, o bien que los distintos compuestos tengan efecto sinérgico. Por otra parte, en términos generales, a menores tiempos de exposición del insecto obtenemos mayor sensibilidad en la respuesta comportamental de *S. zeamais*, siendo el tiempo con mayores valores en el IR los 60 min. Asimismo, las concentraciones más bajas dejan de tener efecto con el tiempo, esto puede deberse a la volatilidad propia de los compuestos ensayados o a una saturación de toda la placa al ensayarse.

En cuanto al efecto sobre *F. verticillioides*, los biotransformados, tanto de α como β pineno presentaron bajos porcentajes de inhibición. El biotransformado de β pineno resultó ser aquel con mayor potencia fungicida (10,39 ± 0,99%) a altas concentraciones (5000 ppm). Sin embargo, la inhibición producida por el biotransformado del α pineno no superó el 2,87 ± 0,50% a esta misma concentración. El biotransformado de la mezcla de los pinenos (1:1) presentó un efecto intermedio,

menor al β pero mayor al α pineno, lo cual puede indicar que su efecto inhibitorio es por la presencia de los componentes del β pineno biotransformado. A modo general, cuando se utilizan los compuestos puros se observa una mayor inhibición a concentraciones menores, pudiendo deberse esto a una resistencia generada por este hongo a las altas concentraciones, fenómeno observado también en el trabajo de Moghaddam y col. (2018). Sin embargo, la tendencia observada es inversa para los compuestos biotransformados (dosis-dependencia), siendo esta una situación más ampliamente reportada (Necha y Barrera, 2008; Murillo y col., 2012; Plazas-Jiménez y Coy-Barrera, 2016).

Las actividades antifúngicas de los productos naturales se han estudiado durante mucho tiempo pero los efectos de los principales componentes puros como los terpenos han sido poco explorados (Dambolena y col., 2008). En cuanto a los aceites esenciales probados contra *F. verticillioides* tenemos numerosos ejemplos que presentan efecto inhibitor del crecimiento. Por ejemplo el aceite de orégano, *Origanum spp.*, que fue reportado en diversos trabajos para las diferentes especies del género (López y col., 2004; Velluti y col., 2004; Lavin y col., 2016). Del mismo modo, la actividad antifúngica del aceite de *Chenopodium ambrosioides* también se ha informado previamente (Kumar y col., 2007) y la propiedad antifúngica de *Tagetes riojana* también fue observada en nuestro grupo de trabajo (Pizzolitto y col., 2020). Muchos estudios han atribuido el efecto antifúngico de los aceites esenciales a sus componentes químicos principales y, han sugerido que existe una relación entre la actividad antifúngica y las estructuras químicas de estos componentes principales siguiendo la regla: fenoles>alcoholes>aldehídos>cetona>ésteres>hidrocarburos (Kurita y Koike, 1983; López y col., 2004). Aun así, estudios anteriores informaron que las cetonas son compuestos con gran bioactividad antifúngica (Dambolena y col., 2012; Herrera y col., 2015; Pizzolitto y col., 2015). En nuestros biotransformados esta familia de compuestos está representada por octen-3-ona, pinocarvona y verbenona. Entre los compuestos presentes en nuestros biotransformados, el limoneno fue reportado como un buen fungicida en *F. verticillioides* y su capacidad de inhibir la biosíntesis de toxinas a bajas concentraciones fue probada por Dambolena y col., (2008). Por otro lado Knobloch (1987) y Griffin (2000) demostraron que derivados de hidrocarburos de

terpenos no poseen propiedades antifúngicas importantes contra otras especies de hongos como *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Trichophyton* sp., y atribuyen estos efectos a la baja solubilidad en agua, que limita su difusión a través del medio condicionando la bioactividad del compuesto en ensayos.

Es posible relacionar la actividad fungicida con diversos componentes de los compuestos biotransformados que se encuentran a bajas concentraciones. Por ello un mejoramiento en la eficacia de la producción de los mismos o su aislamiento podrían presentar mejores efectos sobre *F. verticillioides*. Además, sería beneficioso complementar a la metodología de este trabajo alguna acción que contrarreste la formación de micelas por hidrofobicidad, proceso identificado en altas concentraciones de aceites probados.

Los terpenos puros disminuyeron la producción de conidios a diferentes concentraciones, mientras que en los compuestos biotransformados solo presentan efecto inhibitorio en la producción de estas estructuras en concentraciones muy altas (5000 $\mu\text{L/L}$). Si bien no encontramos trabajos que relacionen la producción de estas estructuras de reproducción asexual con la interacción de compuestos como los que obtuvimos en nuestros biotransformados, podemos inferir que el terpeno puro de (-) α y (-) β pineno es un compuesto que reduce la propagación por conidiación de *F. verticillioides*.

Aún deben superarse muchos desafíos como la alta volatilidad y las bajas concentraciones de producto encontrado. Por lo tanto, en investigaciones posteriores se pretende optimizar el proceso de biotransformación y evaluar la posibilidad de aumentar la escala de las reacciones que facilitan la producción de compuestos naturales a partir de sustratos tan versátiles y económicos como los pinenos.

CONCLUSIÓN

En este trabajo demostramos la capacidad que posee la maquinaria enzimática de *Pleurotus sapidus* para bioconvertir (-) α y (-) β pineno como sustrato y obtener nuevos productos con actividad biológica. Mostramos una eficaz herramienta para incursionar en nuevos productos naturales amigables con el medioambiente para el control de plagas y, a su vez, reutilizar dos productos de desecho de la industria alimentaria (*P. sapidus*) y forestal (terpenos de pineno). Mediante el mejoramiento del proceso de bioconversión y con una caracterización más fina de las enzimas involucradas en las vías de generación de los nuevos compuestos es posible obtener mejores resultados en la composición de los biotransformados y, por ende, en las pruebas de bioactividad. Además, se han presentado distintos comportamientos para los isómeros de estos terpenos, abriendo nuevos interrogantes que presentan precedentes importantes para posteriores investigaciones de la actividad diferencial frente a las enzimas y a los mecanismos que afectan a *Sitophilus zeamais* y *Fusarium verticillioides*, plagas del maíz.

BIBLIOGRAFÍA

- Agronegocios (2015). *Sitophilus zeamais* e *Sitotroga cerealella*: Pragas do Milho. Recuperado de <http://www.agronegocios.eu/noticias/sitophilus-zeamais-e-sitotroga-cerealella-pragas-do-milho/>
- Bashyal, B.M; Aggarwal, R.; Banerjee, S.; Gupta, S. y Sharma, S. (2014). Pathogenicity, ecology and genetic diversity of the *Fusarium* spp. associated with an emerging bakanae disease of rice (*Oryza sativa* L.) in India. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, En: Kharwar R., Upadhyay R., Dubey N., Raghuwanshi R. (eds) *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, 300-307.
- Bercovich, N. (2000). Evolución y situación actual del complejo forestal en Argentina. Santiago de Chile. Informe Proyecto CEPAL/CIID: Reestructuración industrial, innovación y competitividad internacional en América Latina, Fase II.
- Bharadwaj, A., Stafford, III, K. C., y Behle, R. W. (2014). Efficacy and environmental persistence of nootkatone for the control of the blacklegged tick (Acari: Ixodidae) in residential landscapes. *Journal of medical entomology*, 49(5), 1035-1044.
- Bicas, J. L., Fontanille, P., Pastore, G. M., y Larroche, C. (2008). Characterization of monoterpene biotransformation in two pseudomonads. *Journal of applied microbiology*, 105(6), 1991-2001.
- Bolsa de Comercio de Rosario. (2017). Informe especial sobre cultivos: Guía Estratégica para el agro. N°84
- Boontawan A, Stuckey DC (2006) A membrane bioreactor for the biotransformation of α -pinene oxide to isovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:643–649. doi:10.1007/s00253-005-0025-7.
- Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem*, 72: 248-254.
- Brito, V. D., Achimón, F., Dambolena, J. S., Pizzolitto, R. P., y Zygadlo, J. A. (2019). Trans-2-hexen-1-ol as a tool for the control of *Fusarium verticillioides* in stored maize grains. *Journal of Stored Products Research*, 82, 123-130.
- Dambolena, J. S., López, A. G., Cánepa, M. C., Theumer, M. G., Zygadlo, J. A., y Rubinstein, H. R. (2008). Inhibitory effect of cyclic terpenes (limonene, menthol, menthone and thymol) on *Fusarium verticillioides* MRC 826 growth and fumonisin B1 biosynthesis. *Toxicon*, 51(1), 37-44.
- Dambolena, J.S.; López, A.G.; Meriles, J.M.; Rubinstein, H.; Zygadlo, J.A. (2012) Inhibitory effect of 10 natural phenolic compounds on *Fusarium verticillioides*. A structure-property-activity relationship study. *Food Control* 2012, 28, 163–170.
- Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Areco, V. A., y Zygadlo, J. A. (2016a). Terpenes: Natural products for controlling insects of importance to human Health—A structure-activity relationship study. *Psyche: A Journal of Entomology*.
- Dambolena, J.S.; Gallucci, M.N.; Luna, A.; González, S.B.; Guerra, P.E. y Zunino, M.P. (2016b). Composition, Antifungal and Antifumonisín Activity of *Pinus wallichiana*, *Pinus monticola* and *Pinus strobus* Essential Oils from Patagonia Argentina. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(7), 1769-1775.
- De La Torre-Hernández, M. E., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., y Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisinas—Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91
- Dell'Orto, T., y Arias, V. (1985). Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe, 37-54.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

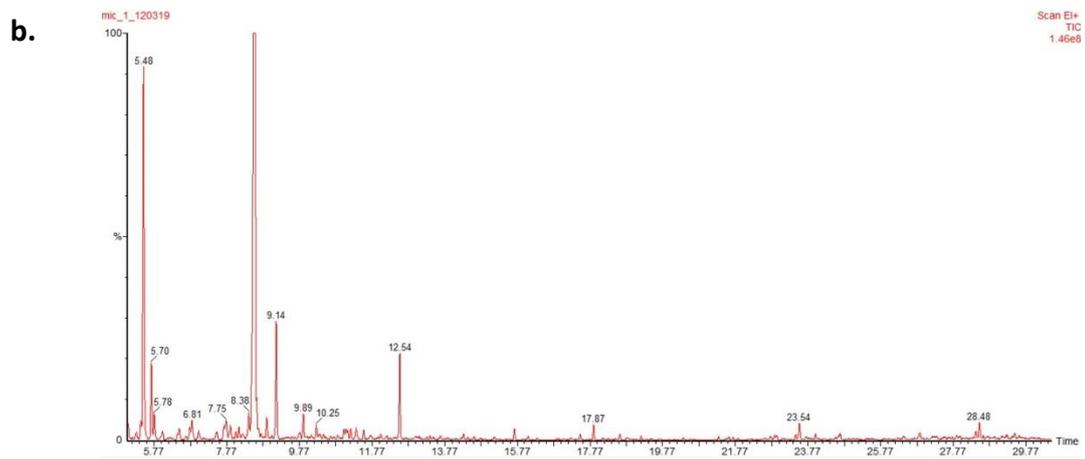
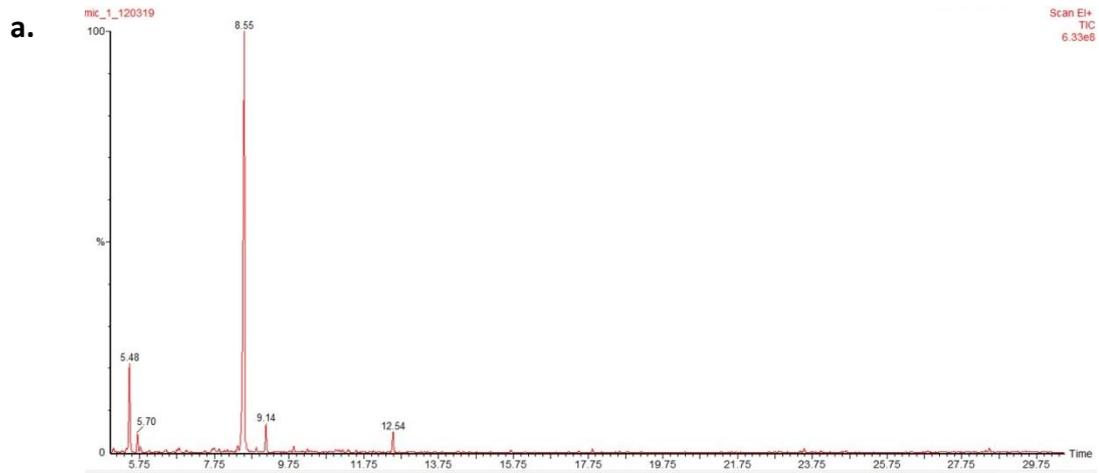
- Duff, S. J., y Murray, W. D. (1996). Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresource technology*, 55(1), 1-33.
- Duncan, K. E., y Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(1), 6-16.
- Ferreira-Castro, F. L., Potenza, M. R., Rocha, L. O., y Correa, B. (2012). Interaction between toxigenic fungi and weevils in corn grain samples. *Food Control*, 26 (2), 594-600.
- Fraatz, M. A., Riemer, S. J., Stöber, R., Kaspera, R., Nimtz, M., Berger, R. G., y Zorn, H. (2009). A novel oxygenase from *Pleurotus sapidus* transforms valencene to nootkatone. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 61(3-4), 202-207.
- Gakuubi, M.M; Maina, A.W. y Wagacha, J.M. (2017). Antifungal Activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against selected *Fusarium* spp. *International Journal of Microbiology*, 2017: 8761610.
- Griffin, G.S., Markham, L.J., Leach, N.D., (2000). Anagar dilution method for determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. *J. Essent. Oil Res.* 12, 149–255
- Haddi, K; Valbon, W.R.; Viteri Jumbo, L.O.; de Oliveira, L.O.; Guedes, R.N.C. y Oliveira, E.E. (2018). Diversity and convergence of mechanisms involved in pyrethroid resistance in the stored grain weevils, *Sitophilus* spp. *Scientific Reports*, 8(1): 16361.
- Hebeish, A., Fouda, M. M., Hamdy, I. A., El-Sawy, S. M., y Abdel-Mohdy, F. A. (2008). Preparation of durable insect repellent cotton fabric: Limonene as insecticide. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 268-273.
- Herrera, J.M. (2016). Compuestos volátiles como agentes de protección contra la acción de insectos granívoros: *Sitophilus zeamais* Motschulsky. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales; Universidad Nacional De Córdoba; Córdoba, Argentina.
- Herrera, J.M., Pizzolitto, R.P., Zunino, M.P., Dambolena, J.S., Zygadlo, J. A. (2015). Effect of fungal volatile organic compounds on a fungus and an insect that damage stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 62, 74:80.
- Ioannou, E., Koutsaviti, A., Tzakou, O., Roussis, V. (2014). The genus *Pinus*: a comparative study on the needle essential oil composition of 46 pine species (Review). *Phytochemistry Reviews*, 13(4): 741-768.
- Knobloch, J. E., y Suttie, J. W. (1987). Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the " propeptide" region of factor X. *Journal of Biological Chemistry*, 262(32), 15334-15337.
- Kumar, R., Mishra, A. K., Dubey, N. K., y Tripathi, Y. B. (2007). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity. *International journal of food microbiology*, 115(2), 159-164.
- Kurita, N., y Koike, S. (1983). Synergistic antimicrobial effect of ethanol, sodium chloride, acetic acid and essential oil components. *Agricultural and biological chemistry*, 47(1), 67-75.
- Lamboni, Y., y Hell, K. (2009). Propagation of mycotoxigenic fungi in maize stores by post-harvest insects. *International Journal of Tropical Insect Science*, 29 (1), 31-39.
- Lavin, P., de Saravia, S. G., y Guamet, P. (2016). *Scopulariopsis* sp. and *Fusarium* sp. in the documentary heritage: evaluation of their biodeterioration ability and antifungal effect of two essential oils. *Microbial ecology*, 71(3), 628-633.
- Lee, S. E., Lee, B. H., Choi, W. S., Park, B. S., Kim, J. G., y Campbell, B. C. (2001). Fumigant toxicity of volatile natural products from Korean spices and medicinal plants towards the rice weevil, *Sitophilus oryzae* (L). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 57(6), 548-553.
- Linares D, Fontanille P, Larroche C (2009) Exploration of α -pinene degradation pathway of *Pseudomonas rhodesiae* CIP 107491. Application to novalic acid production in a bioreactor. *Food Res Int* 42:461–469. doi:10.1016/j.foodres.2008.12.00

- Lindmark-Henriksson, M., Isaksson, D., Sjödin, K., Högberg, H. E., Vaněk, T., y Valterová, I. (2003). Transformation of α -pinene using *Picea abies* suspension culture. *Journal of Natural Products*, 66(3), 337-343.
- Linke, D., Bouws, H., Peters, T., Nimtz, M., Berger, R. G., y Zorn, H. (2005). Laccases of *Pleurotus sapidus*: characterization and cloning. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24), 9498-9505.
- López, A. G., Theumer, M. G., Zygodlo, J. A., y Rubinstein, H. R. (2004). Aromatic plants essential oils activity on *Fusarium verticillioides* Fumonisin B1 production in corn grain. *Mycopathologia*, 158(3), 343.
- Malekian, F; Rao, R.M; Prinyawiwatkul, W.; Marshall, W.E; Windhauser, M.; Ahmedna, M. (2000). Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage. Bulletin Number 870.
- Mason, L. (2003). *Purdue Extension*, E-237-W.
- Mejdoub, K., Benomari, F. Z., Djabou, N., Dib, M. E. A., Benyelles, N. G., Costa, J., y Muselli, A. (2019). Antifungal and Insecticidal Activities of Essential Oils of Four Mentha Species. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 14(1).
- Moghaddam, M., Mehdizadeh, L., Mirzaei Najafgholi, H., y Ghasemi Pirbalouti, A. (2018). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*. *International journal of food properties*, 21(1), 158-170.
- Moreno-Bayona, D. A., Gómez-Méndez, L. D., Blanco-Vargas, A., Castillo-Toro, A., Herrera-Carlosama, L., Poutou-Piñales, R. A., y Pedroza-Rodríguez, A. M. (2019). Simultaneous bioconversion of lignocellulosic residues and oxodegradable polyethylene by *Pleurotus ostreatus* for biochar production, enriched with phosphate solubilizing bacteria for agricultural use. *PLoS one*, 14(5), e0217100.
- Mshandete, A. M. (2011). Cultivation of *Pleurotus* HK-37 and *Pleurotus sapidus* (oyster mushrooms) on cattail weed (*Typha domingensis*) substrate in Tanzania. *International Journal of Research in Biological Sciences*, 1(3), 135-144.
- Murillo, W., Araque, P., y Peláez, C. A. (2012). Actividad fungicida e insecticida de emulsiones agua/aceite de mezclas de extractos de *Nicotiana tabacum*, *Azadirachta indica* y *Eucalyptus tereticornis*. *Información tecnológica*, 23(1), 139-152.
- Narushima, H.; Omori, T.; Minoda, Y. (1982). Microbial transformation of α -pinene. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* 16:174– 178. doi:10.1007/BF00505828
- Necha, L. L. B., y Barrera, L. J. G. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya (Carica papaya). *Revista científica UDO agrícola*, 8(1), 33-41.
- Negrea, M.; Alexa, E.; Sumalan, R.; Popescu, S. y Radulov, I. (2018). Chemical composition and in vitro antifungal activity of *origanum vulgare* plants and essential oil from west side of Romania. *International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management*, 18(6,2), 97-104.
- Nesci, A., Barra, P., y Etcheverry, M. (2011). Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize, using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. *Journal of stored products research*, 47 (3), 231-237.
- Omarini, A. B., Plagemann, I., Schimanski, S., Krings, U., y Berger, R. G. (2014). Crosses between monokaryons of *Pleurotus sapidus* or *Pleurotus florida* show an improved biotransformation of (+)-valencene to (+)-nootkatone. *Bioresource technology*, 171, 113-119.
- Onken, J., y Berger, R. G. (1999). Effects of R-(+)-limonene on submerged cultures of the terpene transforming basidiomycete *Pleurotus sapidus*. *Journal of biotechnology*, 69 (2-3), 163-168.

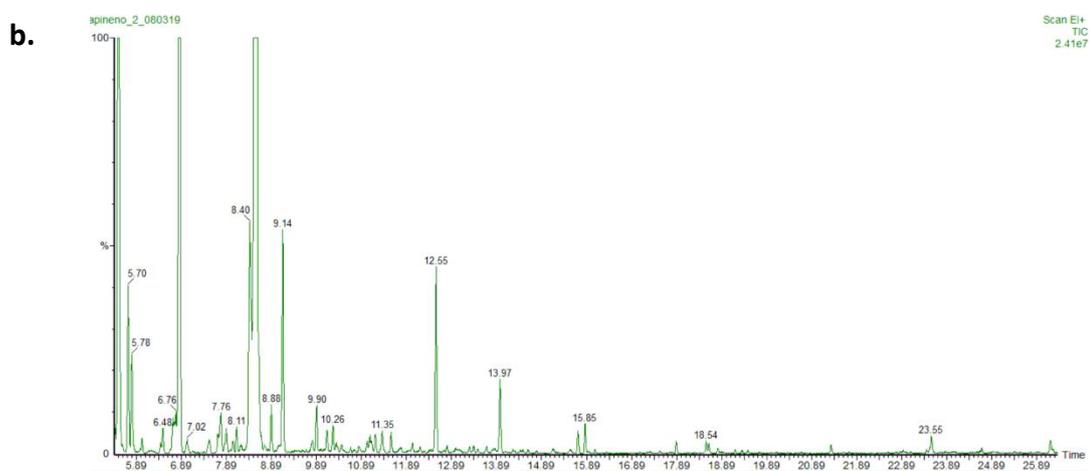
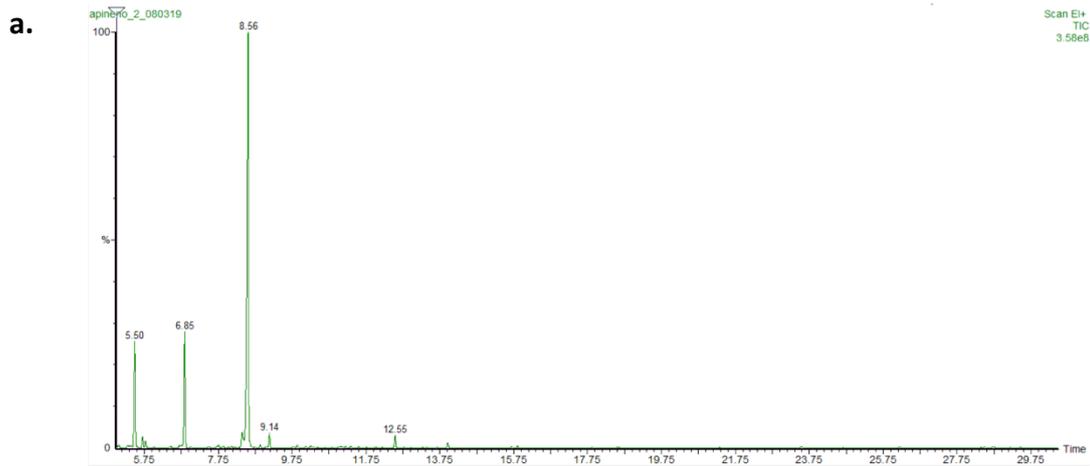
- Paz, A., Costa-Trigo, I., Tugores, F., Míguez, M., de la Montaña, J., y Domínguez, J. M. (2019). Biotransformation of phenolic compounds by *Bacillus aryabhattai*. *Bioprocess and biosystems engineering*, 1-9.
- Peschiutta, M. L., Brito, V. D., Achimón, F., Zunino, M. P., Usseglio, V. L., y Zygadlo, J. A. (2019). New insecticide delivery method for the control of *Sitophilus zeamais* in stored maize. *Journal of Stored Products Research*, 83, 185-190.
- Pérez, M. (1988). Tesis de Maestría de C.P. Chapingo, Mexico, Pp: 14.
- Phillips, T. W., Jiang, X. L., Burkholder, W. E., Phillips, J. K., y Tran, H. Q. (1993). Behavioral responses to food volatiles by two species of stored-product coleoptera, *Sitophilus oryzae* (curculionidae) and *Tribolium castaneum* (tenebrionidae). *Journal of Chemical Ecology*, 19(4), 723-734.
- Pizzolitto, R. P., Dambolena, J. S., Zunino, M. P., Larrauri, M., Grosso, N. R., Nepote, V. y Zygadlo, J. A. (2013). Activity of natural compounds from peanut skins on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B1 production. *Industrial crops and products*, 47, 286-290.
- Pizzolitto, R. P., Barberis, C. L., Dambolena, J. S., Herrera, J. M., Zunino, M. P., Magnoli, C. E., Rubistein, H., ZYgadlo, J.A y Dalcero, A. M. (2015). Inhibitory effect of natural phenolic compounds on *Aspergillus parasiticus* growth. *Journal of Chemistry*.
- Pizzolitto, R. P., Jacquat, A. G., Usseglio, V. L., Achimón, F., Cuello, A. E., Zygadlo, J. A., Y Dambolena, J. S. (2020). Quantitative-structure-activity relationship study to predict the antifungal activity of essential oils against *Fusarium verticillioides*. *Food Control*, 108, 106836.
- Plagemann, I., Zelena, K., Arendt, P., Ringel, P. D., Krings, U., y Berger, R. G. (2013). LOXPsa1, the first recombinant lipoxygenase from a basidiomycete fungus. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzym*.
- Plata-Rueda, A.; Mendonça Campos, J.; da Silva Rolim, G.; Martinez, L.C.; Dos Santos, M.H.; Lemes Fernandes, F.; Serrao, J.E. y Zanuncio, J.C. (2018). Terpenoid constituents of cinnamon and clove essential oils cause toxic effects and behavior repellency response on granary weevil, *Sitophilus granarius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 156: 263-270.
- Prema, B. R., y Bhattacharyya, P. K. (1962). Microbiological Transformation of Terpenes: II. Transformation of α -Pinene. *Appl. Environ. Microbiol.*, 10(6), 524-528. *atic*, 87, 99-104.
- Plazas-Jiménez, O. D., y Coy-Barrera, E. (2016). Actividad antifúngica del extracto en acetona asistido por ultrasonido y fracciones enriquecidas en alquilresorcinoles de *Hordeum vulgare* L. Contra *Fusarium oxysporum*. *Cultivos Tropicales*, 37(4), 173-181.
- Rottava I, Cortina PF, Zanella CA, Cansian RL, Toniazzo G, Treichel H, Antunes OAC, Oestreicher EG, De Oliveira D (2010a) Microbial oxidation of (-)- α -pinene to verbenol production by newly isolated strains. *Appl Biochem Biotechnol* 162:2221–2231. doi:10.1007/s12010-010- 8996.
- Rottava I, Toniazzo G, Cortina PF, Martello E, Grando CE, Lerin LA, Treichel H, Mossi AJ, De Oliveira D, Cansian RL, Antunes OAC, Oestreicher EG (2010b) Screening of microorganisms for bioconversion of (-)- β -pinene and R-(+)-limonene to α -terpineol. *LWT - Food Sci Technol* 43:1128–1131. doi:10.1016/j.lwt.2010.03.001.
- Rozenbaum HF, Patitucci ML, Antunes OAC, Pereira N (2006) Production of aromas and fragrances through microbial oxidation of monoterpenes. *Brazilian J Chem Eng* 23:273–279. doi: 10.1590/S0104- 66322006000300001.
- Saad, M.M.G. y Abdelgalei, S.A.M. (2018). Effectiveness of monoterpenes and phenylpropenes on *Sitophilus oryzae* L. (Coleoptera: Curculionidae) in stored wheat. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 21: 1153-1158.
- Sánchez Palacios, A. (2015). Producción de hongos comestibles del género *Pleurotus* a partir de los residuos vegetales provenientes de la plaza de mercado del municipio de Quibdó. (Tesis de postgrado). Universidad de Manizales. Manizales, Colombia.
- Savithiry, N., Gage, D., Fu, W., y Oriel, P. (1998). Degradation of pinene by *Bacillus pallidus* BR425. *Biodegradation*, 9(5), 337-341.

- Schrader, J. (2007). Microbial flavour production. In *Flavours and fragrances* (pp. 507-574). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Silva, A. C. R. D., Lopes, P. M., Azevedo, M. M. B. D., Costa, D. C. M., Alviano, C. S., y Alviano, D. S. (2012). Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305-6316.
- Skoronski, E., Fernandes, M., Furigo Júnior, A., Soares, C. H. L., y João, J. J. (2014). Immobilization of laccase (*Aspergillus sp.*) on chitosan and its application in the bioconversion of phenols in packed bed reactors. *Química Nova*, 37(2), 215-220.
- Toniazzo G, de Oliveira D, Dariva C, Oestreicher EG, Antunes OAC (2005) Biotransformation of (-)-betapinene by *Aspergillus niger* ATCC 9642. *Appl Biochem Biotechnol* 121–124:837–844. doi:10.1385/ABAB:123:1-3:0837
- Usseglio, V. L. (2016). Análisis de la actividad lipoxigenasa en posible relación con el mecanismo de defensa frente al ataque de *Sitophilus zeamais* y *Fusarium verticillioides* en granos de *Zea mays* L. Tesina de grado. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Väisänen, T., Haapala, A., Lappalainen, R., y Tomppo, L. (2016). Utilization of agricultural and forest industry waste and residues in natural fiber-polymer composites: A review. *Waste Management*, 54, 62-73.
- Velluti, A., Sanchis, V., Ramos, A. J., & Marín, S. (2004). Effect of essential oils of cinnamon, clove, lemon grass, oregano and palmarosa on growth of and fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* in maize. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(10), 1141-1146.
- Van Dyk MS, Van Rensburg E, Moleleki N (1998) Hydroxylation of (+)limonene, (-)- α -pinene and (-)- β -pinene by a *Hormonema sp.* *Biotechnol Lett* 20:431–436. doi:10.1023/A:1005399918647.
- Vespermann, K. A., Paulino, B. N., Barcelos, M. C., Pessôa, M. G., Pastore, G. M., y Molina, G. (2017). Biotransformation of α -and β -pinene into flavor compounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 101 (5), 1805-1817.
- Villa-Ruano, N.; Becerra-Martinez, E.; Cruz-Durán, R.; Zarate-Reyes, J.A.; Landeta-Cortés, G. y Romero-Arenas, O. (2018). Volatile profiling, Insecticidal, Antibacterial and Antiproliferative Properties of the essential Oils of *Bursera glabrifolia* Leaves. *Chemistry y Biodiversity*, 15(11): e1800354.
- Wagan, T. A., Wang, W., Khan, M. M., Hua, H., y Cai, W. (2018). Repellency, fumigant toxicity and chemical constituents of ethanol-extracted essential oils from *Mentha haplocalyx* and *Allium ascalonicum* on *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *African entomology*, 26(2), 369-379.
- Weidmann, V., Kliewer, S., Sick, M., Bycinskij, S., Kleczka, M., Rehbein, J. y Maison, W. (2015). Studies towards the synthetic applicability of biocatalytic allylic oxidations with the lyophilisate of *Pleurotus sapidus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 121, 15-21.
- Woodley, J. M. (2006). Microbial biocatalytic processes and their development. *Advances in applied microbiology*, 60, 1-15.
- Yoo, S. K., y Day, D. F. (2002). Bacterial metabolism of α -and β -pinene and related monoterpenes by *Pseudomonas sp.* strain PIN. *Process Biochemistry*, 37(7), 739-745.
- Zhang, W. J., Yang, K., You, C. X., Wang, Y., Wang, C. F., Wu, Y., ... y Deng, Z. W. (2015). Bioactivity of essential oil from *Artemisia stolonifera* (Maxim.) Komar. and its main compounds against two stored-product insects. *Journal of oleo science*, 14(11): 1418-1427.
- Zorn H, Neuser F, Berger RG (2004) Degradation of α -pinene oxide and [2H7]-2,5,6- trimethyl-hept-(2E)-enoic acid by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11761. *J Biotechnol* 107:255–263. doi:10.1016/j.jbiotec.2003.10.002
- Zunino, M. P., Herrera, J. M., Pizzolitto, R. P., Rubinstein, H. R., Zygodlo, J. A., y Dambolena, J. S. (2015). Effect of Selected Volatiles on Two Stored Pests: The Fungus *Fusarium verticillioides* and the Maize Weevil *Sitophilus zeamais*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63 (35), 7743-7749.

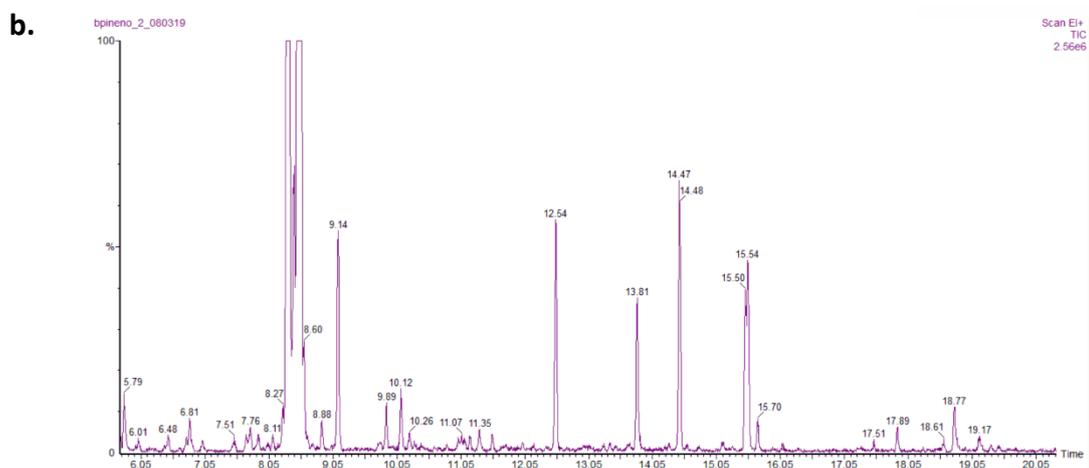
ANEXOS



Anexo I Cromatogramas obtenidos para los controles de los tratamientos (ausencia de pinenos). a) cromatograma sin ampliar. b) cromatograma ampliado, detalle de las señales.



Anexo II Cromatograma obtenido para las muestras biotransformadas de (-) α pineno. a) cromatograma sin ampliar. b) cromatograma ampliado, detalle de las señales.



Anexo III Cromatograma obtenido para las muestras biotransformadas de (-) β pineno. a) cromatograma sin ampliar. b) cromatograma ampliado, detalle de las señales.

The background of the image is a light green color with a pattern of faint, white chemical structures and arrows. The structures include various organic molecules such as alcohols, aldehydes, ketones, and carboxylic acids, some with specific functional groups like -CHO, -COOH, and -CH2OH. Arrows of various directions connect these structures, suggesting a reaction pathway or a flow of information. The overall aesthetic is clean and academic.

“La universidad debe formar
profesionales de mentalidad
solidaria y creativa.

Su lealtad primera es hacia
la sociedad en su conjunto”

Oscar Varsavsky