



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

**POLICÉTIDOS DIMÉRICOS BIOACTIVOS DEL HONGO ENDÓFITO
Acremonium sp. AISLADO DE *Bursera simaruba* (BURSERACEAE)**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB CLAUDIO MELÉNDEZ GONZÁLEZ



TUTORA: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava AÑO: 2012

El presente trabajo de investigación se realizó en el Instituto de Química, Departamento de Productos Naturales, UNAM, bajo la dirección de la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava. Los resultados obtenidos en este proyecto se presentaron en el Annual Meeting of American Society of Pharmacognosy. San Diego, California: Julio 30-agosto 4 de 2011, bajo el título: Allelochemical Activity of Novel Anthraquinone-Xanthone Heterodimers from the Endophytic Fungus *Acremonium* sp., en la modalidad cartel.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través del proyecto 81017.

Al CONACyT (No. de becario 237033) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A nuestra gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México por ser un espacio público para la superación académica, formación social y enriquecimiento cultural.

A la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la UNAM por mi formación profesional.

A mi tutora la Dra. Martha Macías Rubalcava del Instituto de Química, UNAM por su apoyo y motivación para sacar adelante este proyecto.

A la Dra. Ana Luisa Anaya Lang, del Instituto de Ecología, UNAM, por el apoyo otorgado durante mi estancia en el Laboratorio de Alelopatía, por su amistad y sus buenos consejos.

A la Q. A. Blanca Estela Hernández Bautista del Instituto de Ecología, le agradezco su continuo apoyo en la realización de las pruebas biológicas y el buen humor con el que alegra el ambiente de trabajo.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química, UNAM por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme su ayuda y buenos consejos.

A la Biol. Carmen Loyola Blanco del Instituto de Biología, UNAM, por las fotografías de los hongos.

A la Dra. Olga Gomez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños del Colegio de Postgraduados y la Universidad Autónoma de Chapingo, por facilitarnos los hongos y oomicetos fitopatógenos, y por sus valiosos consejos.

A los integrantes del jurado, los Drs. Leovigildo Quijano, Irma Susana Rojas Tomé, Mabel Fragoso Serrano, José Fausto Rivero Cruz y Baldomero Esquivel Rodríguez por las aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

A los técnicos académicos del Instituto de Química, UNAM: el M. en C. Héctor Ríos Olivarez y la Dra. Beatriz Quiroz García del Laboratorio de RMN, por la realización de los experimentos de resonancia. Al Ing. Q. Luís Velasco Ibarra y al Dr. Pérez Flores Francisco Javier del laboratorio de espectrometría de masas. Al M. en C. Simón Hernández-Ortega del laboratorio del laboratorio difracción de Rayos X. A la Q. F. B. Ma. Del Rocío Patiño Maya y la Q. Eréndira García Ríos del laboratorio de espectrometría y polarimetría por la realización de los espectros de infrarrojo. A la M. en C. Maria Teresa Rodríguez Apan del

laboratorio de pruebas biológicas por su colaboración en la realización de las pruebas de citotoxicidad.

A la M. en C. Aurora Saucedo García, a la Dra. Teresa Romero Romero, a Teresa Caudillo Estrada y, en general, a todos los que forman parte del laboratorio de Alelopatía del Instituto de Ecología, UNAM, por su apoyo y amistad.

A mis padres, Maria Luisa González Santillán y José Gilberto Meléndez Sánchez que siempre me han apoyado.

A mis hermanos, Antonieta, Antolín, Pablo e Isabel, que siempre me apoyaron y confiaron en mí.

A mi novia hermosa Paulette Huelgas Marroquín, que ha sido un pilar fundamental para concluir exitosamente esta etapa de mi vida, compañera, cómplice, confidente y albacea de lo que más amo en el mundo.

A mis amigos del árbol, por estos años maravillosos, las fiestas, las cenas, los viajes, los viernes: Carlos, Manuel, Esaú, Alfred, Erick, Gaby, Miguel, Arturo, Norma y Daniela, Enrique y Víctor, Ulises, Javis, Alondra, Jonathan, Alejandro, Jeza, Karla V., María, Raquel, Jesús, Gil.

A mis compañeros del laboratorio, por todos esos momentos de alegría que pasamos juntos: Jordi, Rosa, Lety, Emma, Mariana.

DEDICATORIA

A mis Padres

A mis hermanos

Y especialmente a Paulette

ÍNDICE

	Página
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	Xi
1. PRÓLOGO	xiii
2. RESUMEN	1
3. INTRODUCCIÓN	2
4. ANTECEDENTES	4
4.1 LOS OOMICETOS	4
4.1.2. Oomicetos fitopatógenos	5
4.1.3. Otros oomicetos patógenos	7
4.2. CONTROL QUÍMICO DE LOS OOMICETOS	8
4.3. PRODUCTOS NATURALES	11
4.3.1. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de plantas	13
4.3.2. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de bacterias	14
4.3.3. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de actinomicetos	15
4.3.4. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de hongos	17
4.4. LOS HONGOS ENDÓFITOS	17
4.4.1. Alcaloides bioactivos producidos por hongos endófitos	20
4.4.2. Péptidos bioactivos producidos por hongos endófitos	22
4.4.3. Compuestos bioactivos derivados de isocumarina, indolona y cromona producidos por hongos endófitos	22
4.4.4. Compuestos bioactivos tipo ciclohexanona y fenol prenilados producidos por hongos endófitos	27
4.4.5. Esteroles y compuestos alifáticos bioactivos producidos por hongos endófitos	28
4.5. EL HONGO ENDÓFITO 101	29

	Página
5. HIPÓTESIS	32
6. OBJETIVOS	33
6.1. OBJETIVO GENERAL	33
6.2. OBJETIVOS PARTICULARES	33
7. PARTE EXPERIMENTAL	35
7.1. MATERIAL FÚNGICO	35
7.2. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL HONGO ENDÓFITO 101	35
7.3. MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS DE PRUEBA	36
7.4. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADO EN LOS BIOENSAYOS Y EN LA OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA DEL ENDÓFITO 101	36
7.4.1. Papa-dextrosa-agar (PDA)	36
7.4.2. Agar-avena (AA)	36
7.4.3. Caldo-papa-dextrosa (CPD)	36
7.5. CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA DEL HONGO ENDÓFITO 101.	37
7.6. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS	37
7.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA	38
7.7.1. Determinación del potencial antimicrobiano	38
7.7.2. Determinación del potencial citotóxico	38
7.7.3. Determinación de la toxicidad	39
7.8. MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS ACTIVOS DEL ENDÓFITO 101	39
7.8.1. Cultivos en medio sólido	39
7.8.2. Cultivo en medio líquido	40
7.9. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO	40
7.9.1. Métodos cromatográficos generales	40
7.9.2. Separación y purificación de los metabolitos secundarios	41
7.9.2.1 Obtención de las acremoxantonas A y B (121 y 122)	41

	Página
7.9.3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los metabolitos secundarios	44
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
8.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ENDÓFITO 101	45
8.2. CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA	48
8.2.1. Determinación cuantitativa del potencial antioomiceto de los extracto del micelio de <i>Acremonium sp.</i>	48
8.3. AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES PRIMARIAS ACTIVAS DEL EXTRACTO DE MICELIO DE <i>Acremonium sp.</i>	51
8.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES ACTIVAS	53
8.4.1. Caracterización de las acremoxantonas A y B (121 y 122)	55
8.4.2. Caracterización de la xantoquinodina J (120) y desacetil xantoquinodina J (123)	66
8.4.3. Caracterización de las acremonidinas A y B (124 y 125)	71
8.5. MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR <i>Acremonium sp.</i>	74
8.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS de <i>Acremonium sp.</i>	82
8.6.1. Efecto de los compuestos puros sobre el crecimiento de oomicetos fitopatógenos	82
8.6.2. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios aislados	85
8.6.3. Evaluación de la toxicidad de los extractos orgánicos del micelio y metabolitos secundarios aislados	87
8.7. METABOLITOS SECUNDARIOS ESTRUCTURALMENTE RELACIONADOS A LOS COMPUESTOS DE <i>Acremonium sp.</i> Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA	88
8.8. METABOLITOS SECUNDARIOS DE <i>Bursera simaruba</i> (L.) SARG. (BURSERACEAE)	93
9. CONCLUSIONES	94
10. PERSPECTIVAS	96
11. EPÍLOGO	97
12. REFERENCIAS	98
13. ANEXO	110

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Ejemplos de especies patogénicas de diferentes órdenes de los oomicetos, su hospedero y correspondiente enfermedad (modificado de Fugestald, 2008)	6
Cuadro 2 Peso de las fracciones primarias obtenidas (tomado de Murià, 2007)	30
Cuadro 3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa XI	42
Cuadro 4 Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria XI-vi	43
Cuadro 5 Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de <i>Acremonium</i> sp. obtenidos en cultivos en mediana escala	48
Cuadro 6 Evaluación del efecto antifúngico y antioomiceto del extracto orgánico del micelio (fase sólida) del hongo endófito <i>Acremonium</i> sp., sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con importancia económica	51
Cuadro 7 Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito <i>Acremonium</i> sp.	52
Cuadro 8 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las acremoxantonas A y B (121 y 122)	66
Cuadro 9 Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H de las acremoxantonas A y B (121 y 122)	67
Cuadro 10 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las xantoquinodinas 120 y 123	71
Cuadro 11 Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H de la xantoquinodina J (120) y desacetilxantoquinodina J (123)	72
Cuadro 12 Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las acremonidinas A y B (124 y 125)	74
Cuadro 13 Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H de las acremonidinas A y B (124 y 125)	75
Cuadro 14 Potencial antioomiceto de los metabolitos secundarios aislados del hongo endófito <i>Acremonium</i> sp. a la concentración 1 μM	84
Cuadro 15 Potencial antioomiceto de los metabolitos secundarios aislados del hongo endófito <i>Acremonium</i> sp. a la concentración 10 μM	85
Cuadro 16 Actividad citotóxica de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios de <i>Acremonium</i> sp., sobre seis líneas celulares cancerosas humanas y sobre la viabilidad de macrófagos murinos	86

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Filogenia de los eucariontes (Govers y Gijzen, 2006)	4
Figura 2 Evaluación biológica de las fracciones primarias activas a 100 µg/mL sobre el crecimiento de dos oomicetos fitopatógenos y dos hongos verdaderos. * n=4; p<0.05	30
Figura 3 Conidióforos de <i>Acremonium</i> sp. en PDA. A: Conidióforos en 40 x B: Conidióforo a 100 x, y C: conidias agrupadas teñidos con rojo congo (ampliación)	46
Figura 4 Hongo endófito <i>Acremonium</i> sp. (endófito 101) aislado de <i>Bursera simaruba</i> en cultivo en papa-dextrosa-agar a los 15 días de crecimiento. A: anverso, B: reverso de la colonia	47
Figura 5 Efecto de los extractos orgánicos del micelio de <i>Acremonium</i> sp. evaluados a 100 µg/mL, sobre el crecimiento de un hongo verdadero (<i>Fusarium oxysporum</i>) y dos oomicetos fitopatógenos (<i>Phytophthora capsici</i> y <i>Phytophthora parasítica</i>). * n=4 p<0.05	49
Figura 6 Estructura de los distintos monómeros (subunidades) que componen la estructura de los policétidos heterodiméricos; xantoquinodinas, acremonidinas y acremoxantonas	54
Figura 7 Diferencia estructural entre las xantoquinodinas <i>orto</i> y <i>para</i> (modificado de Tabata <i>et al.</i> , 1993)	55
Figura 8 Correlaciones selectas. Ampliación del espectro HMBC del compuesto 121	58
Figura 9 Vista estereoscópica de la xantoquinodina J (120) [tomada de Murià, 2007]	70
Figura 10 Perfil cromatográfico (CLAR) de los extractos del micelio de <i>Acremonium</i> sp. a 30 y 60 días en cultivos líquidos en caldo papa dextrosa. Sistema de elución isocrático MeCN: H ₂ O (70:30); λ _{max} =272 nm	76
Figura 11 Perfil cromatográfico (CLAR) de los extractos del micelio de <i>Acremonium</i> sp. a los 20, 30 y 40 días, en cultivos sólidos en papa-dextrosa-agar. Sistema de elución con gradiente: MeCN:H ₂ O 25:75 → 50:50 en 5 min → 65:35 a los 30 min → MeCN 100% a los 35 min, manteniéndose hasta 40 min; λ _{max} 365 nm	78
Figura 12 Biogénesis propuesta para la cloromonilicina (126) [modificado de Sassa, 1991]	79
Figura 13 Perfil cromatográfico (CLAR) de los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito <i>Acremonium</i> sp. identificados en el extracto de AcOEt del micelio obtenido del cultivo líquido de 30 días de fermentación (CPD). Sistema de elución con gradiente: MeCN:H ₂ O 25:75 → 50:50 en 5 min → 65:35 a los 30 min → MeCN 100% a los 35 min y constante hasta los 40 min; λ _{max} =275 nm	83

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
CCF	Cromatografía en capa fina
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
CMI	Concentración mínima inhibitoria
COSY	Correlation spectroscopy (espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear)
CPD	Caldo-papa-dextrosa
D ₂ O	Agua deuterada
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DEPT	Decouplete enhancement proton test (experimento de desacoplamiento de protones)
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
EM	Espectroscopía de masas
eV	Electrón-volts
FAB ⁺	Fast atom bombardment (bombardeo con átomos acelerados modalidad positiva)
g	Gramos
Kg	Kilogramos
h	Hora
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
L	Litros
M ⁺	Ion molecular
<i>m/z</i>	Unidades de masa-carga
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
μg	Microgramos
μL	Microlitros

MHz	Mega herzios
mL	Mililitros
mm	Milímetros
Mult.	Multiplicidad
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy (espectro del efecto nuclear de Overhauser)
°C	Grados Celsius
p.f.	Punto de fusión
PDA	Papa-dextrosa-agar
Ref.	Referencia
RMN- ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Singulete
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
ϵ	Constante de absortividad molar
δ	Desplazamiento químico
λ_{\max}	Longitud de onda de máxima absorción
ν_{\max}	Frecuencia máxima

1. PRÓLOGO

A los cultivos...

En la tierra del maíz

En mayo,
Los campesinos
Se adelantaron a las lluvias,
Éste les pareció buen tiempo
Para comenzar la siembra.

La tierra seca y ajada,
Desolada y asoleada,
Cansada de la espera
Por el agua revivificadora,
Abierta por fuerza del arado
Recibe el grano de maíz,
La semilla fecunda de la vida.

Ahora juntas se entregan a la espera de junio
Tierra y grano aguardan la llegada de la primera lluvia,
Cuando al fin del horizonte se arrastren pesados
Los primeros nubarrones de color azul oscuro
Con relámpagos y truenos se anuncia
La pesada carga Que el viento arrastra.

De la oscuridad de la tierra ahora húmeda y suave,
Delicada y pequeña brota la planta hacia la luz
Tan rápido que pareciera como si la tierra
Le recompensara con todos sus nutrientes
Por haber compartido la cruel espera.

Hacia julio la planta renueva la espera
Exhibiendo en espiga la fecundidad de sus días
Aguarda la llegada de cupido a la milpa
¿Será una jicotillo, moscardón o abeja
Quien cargue en sus patas la luz de la vida?

Al final de la estación, la jornada fue justa,
Cada milpa de la parcela tiene doble mazorca.
El campesino recoge de las dos la más gorda
Mientras que la pequeña suertuda
Para el otro año será semilla.

La milpa seca, cruje y resquebraja a causa de las heladas de diciembre,
Rinde con sus hojas y tallo el tributo que adeuda a la tierra que le dio existencia
Y encomienda su vida, su futuro, su semilla a la bondad del hombre.

...CMG

2. RESUMEN

En las prácticas agrícolas es muy común el uso intensivo de plaguicidas para reducir las pérdidas ocasionadas por malezas, insectos y microorganismos fitopatógenos como los hongos, bacterias, virus y oomicetos. Estos últimos son una clase de microorganismos particularmente problemáticos en agricultura debido a su rápido crecimiento, su agresividad y especificidad hacia algunos cultivos, además de que existe un limitado número de compuestos químicos para tratar las enfermedades ocasionadas por oomicetos fitopatógenos.

Por lo anterior existe una fuerte urgencia de desarrollar nuevos agentes agroquímicos específicos y efectivos para tratar las enfermedades ocasionadas por estos microorganismos, y que en lo posible, sean menos tóxicos para los seres humanos y con un menor impacto ambiental.

En este contexto, el presente proyecto de investigación presenta la identificación taxonómica hasta género de un hongo endófito aislado de las hojas sanas *Bursera Simaruba*, así como el aislamiento y caracterización de seis policétidos heterodiméricos producidos por el hongo endófito *Acremonium* sp., un producto natural novedoso, la desacetil xantoquinodina J, y cinco compuestos conocidos; las acremoxantonas A y B, las acremonidinas A y B, la xantoquinodina J. Se analiza el potencial de estos compuestos para el control de algunos oomicetos que afectan cultivos de interés económico para nuestro país como el chile, la papa y el aguacate. Adicionalmente se evaluó la actividad citotóxica sobre líneas cancerosas humanas para explorar el potencial anticancerígeno de estos metabolitos secundarios.

3. INTRODUCCIÓN

Se estima que para el año 2050 la población mundial se duplicará, por lo tanto habrá un incremento superior al 50% en la demanda de productos agrícolas con respecto a la demanda actual. De lo anterior se deriva la urgencia de implementar mecanismos que permitan garantizar el abasto de alimentos en los próximos años. Una de las estrategias con mayor impacto en las actividades agrícolas es la que involucra el uso de plaguicidas para evitar las pérdidas ocasionadas por insectos, malezas y microorganismos fitopatógenos (Strange y Scott, 2005). Entre estos últimos, destacan algunos oomicetos tan devastadores como *Phytophthora infestans*, la cual ocasiona pérdidas que superan los 5 mil millones de dólares en todo el mundo (Tyler, 2007).

A causa de las grandes pérdidas económicas ocasionadas por los oomicetos fitopatógenos, al reducido número de sustancias químicas para su control y a la gran capacidad de estos organismos para desarrollar resistencia hacia algunos agroquímicos, es imperante la necesidad de desarrollar nuevos agentes químicos eficaces para combatirlos. Anteriormente, las enfermedades ocasionadas por los oomicetos eran tratadas con fungicidas sintéticos del tipo de fenilaminas y carbamatos, debido a que eran considerados como parte del reino fungi. Sin embargo, actualmente se han establecido diferencias importantes entre ambos tipos de microorganismos y con ello, investigaciones conducentes a desarrollar nuevos plaguicidas que actúen de forma específica contra los oomicetos (Govers, 2006).

En este tenor, los productos naturales constituyen una fuente prácticamente inagotable de sustancias químicas con potencial de aplicación en el control de plagas y con una diversidad química incluso superior que la obtenida por química combinatoria. Además, se considera que los productos naturales poseen un tiempo de residencia menor en el ambiente por lo que sus efectos perjudiciales son menores (Dubey *et al.*, 2011).

Históricamente, los actinomicetos y los hongos han sido la principal fuente de productos naturales (metabolitos secundarios) con aplicación como antimicrobianos, tanto para

tratar infecciones en humanos como en cultivos. Entre las sustancias más destacables se encuentran los antibióticos betalactámicos producidos por hongos del género *Penicillium* y *Acremonium*, así como los macrólidos y aminoglucósidos elaborados por actinomicetos del género *Streptomyces*. En cuanto al uso de antimicrobianos para el control de plagas, es justo mencionar a los fungicidas la clase de las estrobilurinas, que actúan inhibiendo el transporte de electrones en la mitocondria fúngica; tal como la azoxistrobina, que fue en su momento el fungicida más vendido en el mundo y cuya estructura está inspirada en los productos naturales estrobilurinas A y B producidas por el basidiomiceto *Strobilurus tenacellus*. Esto revela que la investigación en productos naturales antimicrobianos puede también ser una guía hacia el descubrimiento de nuevos mecanismos de actividad biológica y por lo tanto contribuir al desarrollo de agroquímicos sintéticos específicos (Demain, 2009).

Recientemente, los hongos endófitos, los cuales colonizan los tejidos vegetales de su hospedera sin producirle síntomas aparentes de enfermedad, han sido reconocidos como grandes productores de metabolitos antimicrobianos (Strobel *et al.*, 2004). Estos microorganismos han sido aislados de todas las plantas exploradas, por lo que se consideran ubicuos dentro del reino vegetal. Se estima que quizá tan sólo el número de hongos endófitos asciende a 1.2 millones de especies, de las cuales desconocemos casi el 95% (Hawksworth, 2001). Además, teniendo en consideración que existen cerca de 300 mil especies de plantas de las cuales sólo se ha examinado una pequeña proporción, y si cada una alberga al menos un hongo endófito, existe una gran cantidad de especies fúngicas aún por estudiar.

Se ha observado que la diversidad de hongos endófitos es directamente proporcional a la variedad y densidad de especies vegetales del lugar, es decir, que en las selvas la diversidad de hongos endófitos foliares es mucho mayor que en los bosques templados. La riqueza metabólica de los hongos endófitos también está ligada a la diversidad biológica, debido al incremento de las interacciones bióticas en las que se presume intervienen los metabolitos secundarios como mecanismos de defensa para competir con

otros microorganismos. De allí que la selección de posibles hospederas que se desarrollan en lugares de gran biodiversidad incrementa la probabilidad de aislar hongos endófitos productores de metabolitos secundarios bioactivos.

De esta forma, el hongo endófito 101 aislado de las hojas sanas de *Bursera simaruba* (Burseraceae), colectadas en la selva baja caducifolia de la reserva ecológica “El Edén” en el estado de Quintana Roo, en un estudio previo realizado por Murià (2007), fue seleccionado de entre un grupo de endófitos debido a que el extracto orgánico del micelio demostró ser activo contra oomicetos y hongos fitopatógenos. Del extracto del micelio de este endófito Murià (2007) obtuvo la xantoquinodina J (**120**) como metabolito secundario mayoritario con actividad antioomiceto.

La presente disertación incluye la caracterización taxonómica el hongo endófito 101 (*Acremonium* sp.) y el aislamiento y la caracterización de cinco metabolitos secundarios adicionales producidos por el endófito *Acremonium* sp., y se analiza el potencial de estos compuestos como posibles agentes en el control de oomicetos fitopatógenos. Paralelamente, se evaluó el potencial anticancerígeno de estos compuestos sobre líneas celulares tumorales, debido a que Strobel y colaboradores (1997) sugieren que la sensibilidad de los oomicetos hacia algunos compuestos con propiedades anticancerígenas como el taxol, los sitúa como un modelo práctico para discriminar entre posibles compuestos útiles en la terapia contra el cáncer.

4. ANTECEDENTES

4.1. LOS OOMICETOS

Los oomicetos son una clase de microorganismos eucariontes, conocidos como mohos acuáticos, que inicialmente fueron clasificados dentro del Reino Fungi, debido a que muestran un crecimiento filamentoso, producen micelio y se reproducen sexual y asexualmente mediante esporas, además de que se encuentran prácticamente en los mismos nichos ecológicos. Sin embargo, las investigaciones realizadas en las últimas décadas han permitido establecer que los oomicetos están genéticamente más emparentados con las algas café que con los hongos. Actualmente, los oomicetos están clasificados dentro del Reino Stramenopila, que pertenece al súper reino Cromalveolata y en el cual están incluidas las diatomeas, las algas café y apicomplexa [Figura 1] (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Govers y Gijzen, 2006; Phillips *et al.*, 2007; Govers *et al.*, 2009; Beakes *et al.*, 2011).

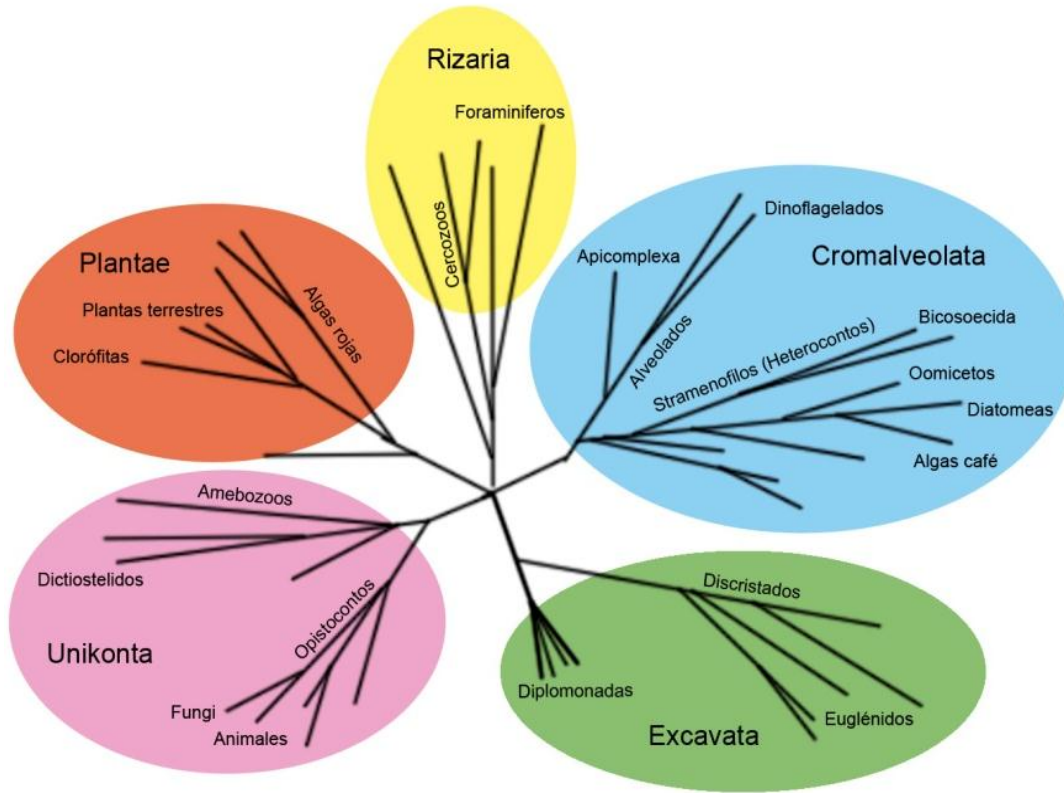


Figura 1. Filogenia de los eucariontes (Govers y Gijzen, 2006).

A diferencia de los hongos que son haploides la mayor parte de su ciclo de vida y sus hifas son a menudo septadas, los oomicetos son diploides y poseen hifas cenocíticas (no septadas). Algunos oomicetos son parcialmente auxótrofos a los esteroides, sus membranas contienen lípidos con estructuras inusuales y ácidos grasos de cadena larga que presumiblemente sustituyen a los esteroides en las membranas miceliales. Los hongos y los oomicetos sintetizan lisina por diferentes rutas; los primeros emplean la vía del ácido α -aminoadípico, mientras que los segundos lo hacen mediante la vía del ácido α - ϵ -diaminopimélico. La pared celular de muchos oomicetos está constituida principalmente por 1,3- β -glucanos, algo de 1,6- β -glucanos y 1,4- β -glucanos (celulosa); mientras que la quitina, que es principal constituyente de la pared celular de los hongos, ha sido detectada sólo en pequeñas cantidades. Además, los oomicetos producen esporas móviles (zoosporas) biflageladas, mientras que las de los hongos son inmóviles (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Strange y Scott, 2005; Phillips *et al.*, 2007; Beakes *et al.*, 2011).

Los oomicetos han evolucionado a un estilo de vida patogénico y algunas veces saprófito, aunque algunas especies combinan ambos estilos de vida. Y se han adaptado a varios tipos de organismos huésped, incluyendo plantas, nemátodos, vertebrados y crustáceos (Cuadro 1). Los oomicetos pueden ser biótrofos, hemibiótrofos o necrótrofos. Las especies biótrofas obtienen sus nutrientes de tejidos vivos, en tanto que los hemibiótrofos primero se alimentan de los tejidos vivos y posteriormente matan al hospedero en la etapa final de la infección. Por su parte, los necrótrofos viven exclusivamente de los tejidos muertos del hospedero (Kamoun, 2003; Fugelstad, 2008).

4.1.2. Oomicetos fitopatógenos

Dentro de la clase de los oomicetos se encuentran los microorganismos más agresivos y devastadores de plantas dicotiledóneas. El género *Phytophthora*, que etimológicamente significa destructor de plantas (*phyton* = planta; *phthorus* = destructor), comprende más de 80 especies, algunas con alta especificidad por un hospedero. La especie más devastadora y estudiada es *Phytophthora infestans*, la cual causa la quemadura o tizón

tardío de la papa. La introducción de esta especie de América hacia Europa a mediados del siglo XIX, fue responsable de la catastrófica hambruna de la papa en Irlanda, que provocó miles de muertes y la migración de irlandeses hacia Estados Unidos, debido a su alta dependencia al cultivo de la papa. Actualmente, las pérdidas económicas en todo el mundo, ocasionadas por *Phytophthora infestans*, ascienden a más de 5 mil millones de dólares anuales (Strange y scott, 2005; Govers y Gijzen, 2006; Tyler, 2007; Phillips *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2009).

Cuadro 1. Ejemplos de especies patogénicas de diferentes órdenes de los oomicetos, su hospedero y correspondiente enfermedad (modificado de Fugestald, 2008).

Orden	Especie representativa	Hospedero y enfermedad
Saprolegniales	<i>Saprolegnia monoica</i>	Saprolegniosis en peces
	<i>Saprolegnia parasitica</i>	Saprolegniosis en peces
	<i>Aphanomyces astaci</i>	Micosis ulcerativa en peces
	<i>Aphanomyces euteiches</i>	Plaga en cangrejo de río
	<i>Achlya bisexualis</i>	Pudrición de raíz en chícharo
Lagenidiales	<i>Lagenidium giganteum</i>	Infecta larvas de mosquito
Pythiales	<i>Pythium insidiosum</i>	Lesiones en la piel de animales
	<i>Pythium oligandrum</i>	Infecta hongos y otros oomicetos
	<i>Pythium aphanidermatum</i>	Pudrición de tallo y raíz en chile
Peronosporales	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	Mildiú en plantas
	<i>Pseudoperonospora cubensis</i>	Mildiú de cucurbitáceas
	<i>Phytophthora infestans</i>	Tizón tardío en papas
	<i>Phytophthora sojae</i>	Pudrición de tallo y raíz en soya
	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	Tristeza del aguacate
	<i>Albugo candida</i>	Roya blanca en plantas

Otras enfermedades de gran importancia económica causadas por especies del género *Phytophthora* son: la podredumbre de la raíz de la soya causada por *Phytophthora sojae*, cuyos daños suman pérdidas de alrededor de 2 mil millones de dólares por año (Strange y scott, 2005; Tyler, 2007; Phillips *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2009); la mancha negra del cacao originada por *Phytophthora palmivora* y *Phytophthora megakayra*, con un costo anual de 1 500 millones de dólares en pérdidas (West *et al.*, 2003); la muerte del roble de California (Tanoak) en los Estados Unidos y de otras especies de robles en Europa,

producida por *Phytophthora ramorum*; la podredumbre causada por *Phytophthora cinnamomi* en un gran número de plantas ornamentales y comunidades nativas, como la tristeza del aguacate que afecta a 70 países (incluyendo México), y la epidemia en los bosques de eucalipto y brezal en Australia (Kamoun, 2003; Sánchez-Pérez, 2007; O'Brien *et al.*, 2009). La pudrición de las hojas, frutos y raíces ocasionada *Phytophthora capsici* afecta a una amplia variedad de cucurbitáceas (pepino, melón, calabaza, sandía), solanáceas (pimiento verde, chile, berenjena, tomate) y leguminosas (fríjol) en todo el mundo (Hausbeck y Lamour, 2004).

Entre otros oomicetos fitopatógenos importantes estan incluidos más de un ciento de especies del género *Pythium*, el cual es ubicuo en ambientes acuáticos y en el suelo, y causa enfermedades tales como la pudrición de semillas, el marchitamiento de plántulas y la pudrición del tallo de todo tipo de plantas. Se estima que las enfermedades que provoca *Pythium* sp. producen pérdidas de alrededor de mil millones de dólares en todo el mundo (West *et al.*, 2003). Por ejemplo, *Pythium aphanidermatum* y *Pythium myriotylum* causan la pudrición de la raíz en el pimiento verde, con 42% y 62% de la mortalidad de las plantas, respectivamente. Sin embargo, algunas otras especies, como *Pythium oligandrum*, son benéficas y reducen la infección causada por algunos patógenos como *Fusarium oxysporum* (Kamoun, 2003; Agrios, 2005; Phillips *et al.*, 2007).

Otras especies, pertenecientes principalmente a los géneros *Bremia*, *Peronospora*, *Plasmopara* y *Pseudoperonospora* causan las enfermedades más destructivas conocidas como mildius en dicotiledóneas como lechuga, tabaco, uva y diversas cucurbitáceas. *Peronosclerospora*, *Sclerophthora* y *Sclerospora* causan los mildius de monocotiledóneas como maíz, sorgo y caña de azúcar. *Albugo* causa la roya blanca en plantas crucíferas como coliflor y brócoli (Kamoun, 2003; Agrios, 2005; Strange y Scott, 2005).

4.1.3. Otros oomicetos patógenos

En la naturaleza se encuentran también oomicetos patógenos de animales, que tienen un impacto muy importante tanto en cuestiones de salud como económicas y ambientales.

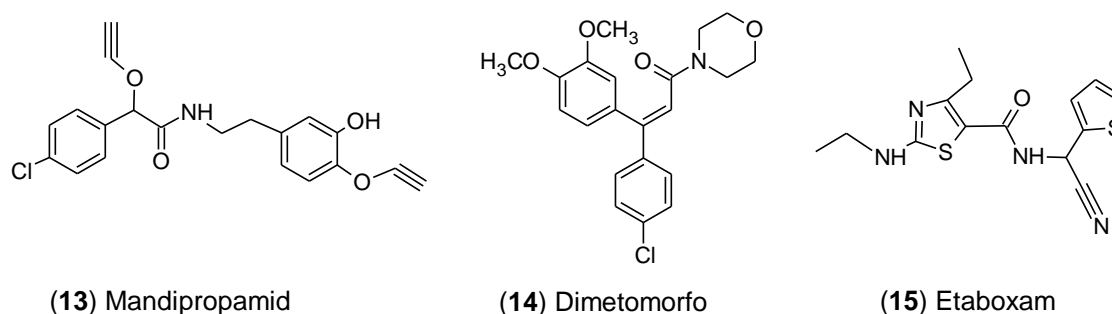
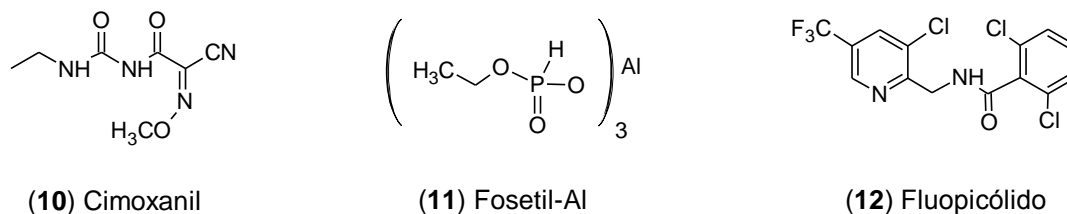
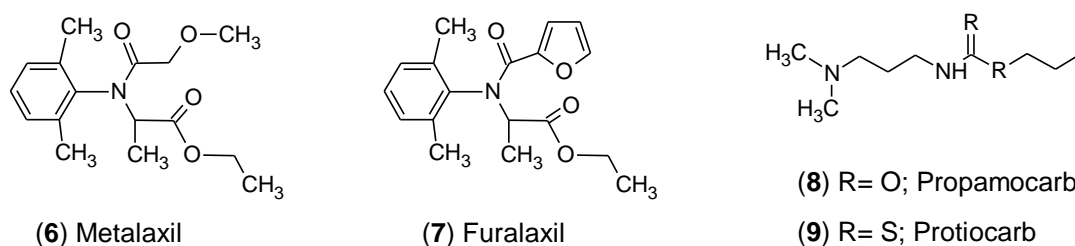
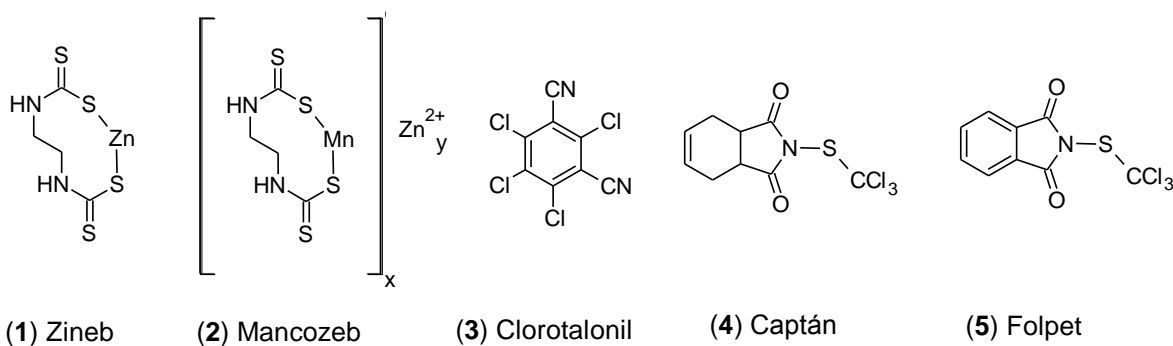
Tal es el caso del microorganismo *Pythium insidiosum* es capaz de infectar a humanos, caballos y perros, colonizando tejidos cutáneos y subcutáneos, pudiendo invadir incluso vasos capilares y huesos. Por otra parte, ciertas especies del género *Saprolegnia*, atacan a los peces y a sus huevos, causando una enfermedad llamada saprolegniosis que se caracteriza por la presencia de manchas blancas o grises de micelio filamentoso. Específicamente, *Saprolegnia parasitica* está implicada en el declive de la población de salmón silvestre alrededor del mundo y es responsable de la muerte invernal en las granjas de bagre en Estados Unidos, provocando pérdidas que ascienden a los 50 millones de dólares anualmente. Otro género, denominado *Aphanomyces*, incluye especies patógenas tanto de plantas como de animales, como *Aphanomyces astaci*, el agente causal del 100% de la mortalidad de las especies de cangrejo *Astacus astacus*, *Astacus leptodactylus* y *Austropotamobius pallipes*, en ríos de toda Europa (Kamoun, 2003; Fugelstad, 2008; Phillips *et al.*, 2007).

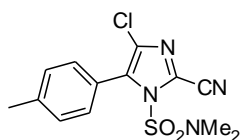
4.2. CONTROL QUÍMICO DE LOS OOMICETOS

Tradicionalmente, las enfermedades ocasionadas por oomicetos fitopatógenos han sido tratadas con fungicidas sintéticos, debido principalmente a que se consideraban como parte del reino de los hongos. Sin embargo, debido a las diferencias genéticas y bioquímicas de los hongos y los oomicetos, muchos de los fungicidas disponibles en el mercado son ineficaces contra estos organismos. Por ejemplo, los fungicidas del grupo de los azoles, que actúan sobre la síntesis del ergosterol; nikomicina y polioxina D que inhiben la síntesis de quitina, son ineficaces debido a que los oomicetos son auxótrofos a los esteroides y la quitina es un componente minoritario de su pared celular. De allí que solo una pequeña proporción de los fungicidas comerciales sean efectivos contra estos organismos (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Strange y Scott, 2005; Govers *et al.*, 2009).

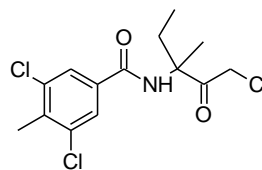
La primera formulación química para el control de las enfermedades ocasionadas por especies fitopatógenas de oomicetos fue la mezcla Bordeaux, constituida por hidróxido de calcio y sulfuro de cobre. Posteriormente, se emplearon compuestos con un amplio espectro de actividad, que controlaban tanto a hongos como oomicetos, como los

ditiocarbamatos (**1 y 2**), el clorotalonil (**3**) y las ftalimidias (**4 y 5**). El desarrollo posterior de agroquímicos específicos, los cuales fueron menos tóxicos para el medio ambiente, es ejemplificado por compuestos como las fenilaminas (**6, 7**), los carbamatos (**8, 9**), las oximas de cianoacetamidas (**10**), los fosfonatos (**11**), los acilpicólidos (**12**), las amidas de ácidos carboxílicos (**13 y 14**), las tiazol carboxiamidas (**15**), los ciano imidazoles (**16**) y las benzamidas (**17**) [Kuck y Gisi, 2007].





(16) Ciazofamida



(17) Zoxamida

Si bien se considera que estos nuevos agroquímicos son específicos sobre los oomicetos, sólo se conoce el sitio de acción de algunos de ellos. Las fenilaminas, por ejemplo, inhiben el complejo RNA polimerasa I, aunque la subunidad diana se desconoce. Las amidas de ácidos carboxílicos recientemente han demostrado tener como blanco a la enzima celulosa sintasa 3 (CesA3). El fluopicólido provoca la deslocalización de una proteína tipo espectrina, pero se desconoce si esta es su proteína blanco o si es un efecto secundario de la actividad del compuesto. Se sabe que los cianoimidazoles inhiben el complejo citocromo bc₁ (ubiquinol oxidasa), mientras que las benzamidas interfieren en el ensamblaje de la β -tubulina, y los carbamatos actúan a nivel de la permeabilidad de la membrana (Kuck y Gisi, 2007; Hollomon, 2009; Whisson, 2010).

El desarrollo de agroquímicos con modos de acción específicos contribuye a reducir los efectos secundarios perjudiciales al medio ambiente y hacia la microbiota benéfica, al disminuir la cantidad de sustancias que se debe aplicar por hectárea. Por ejemplo, hacia la década de los sesentas, los ditiocarbamatos se aplicaban en un rango de concentración de 1.5-3.5 Kg/Ha (Russell, 2005), mientras que el fluopicólido se aplica a una concentración de entre 0.075-0.1 Kg/ha (Bardsley *et al.*, 2006).

De manera paralela a las enfermedades de plantas ocasionadas por oomicetos, las infecciones en mamíferos y peces han sido tratadas con pocos compuestos químicos. En 2002, el verde de malaquita, que era usado para el control de la saprolegniosis en peces, fue prohibido en todo el mundo debido a sus efectos carcinogénicos y tóxicos. Actualmente, el tratamiento con formalina es el método económicamente disponible para el tratamiento de esta enfermedad, pero su eficacia es limitada (Phillips *et al.*, 2007; Fugelstad, 2008).

Por otra parte, las infecciones cutáneas en humanos por *Pythium insidiosum* son tratadas satisfactoriamente con soluciones de yoduro de potasio; sin embargo, tratándose de infecciones profundas, como la pitiosis ocular, los antifúngicos convencionales no son efectivos y en muchos casos es necesario recurrir a operaciones drásticas para remover el tejido afectado (Phillips *et al.*, 2007).

Tomando en consideración el gran impacto económico que causan las enfermedades causadas por oomicetos, principalmente en plantas de interés agrícola, además del limitado número de compuestos químicos para el tratamiento de estas enfermedades, existe una fuerte urgencia de desarrollar nuevos agentes químicos, potentes y específicos para el control de los oomicetos (Govers *et al.*, 2009; Fugelstad, 2008).

4.3. PRODUCTOS NATURALES

La filosofía en el manejo de plagas ha cambiado radicalmente hacia la reducción de la población de la plaga a niveles sub-económicos o no letales, más que a su erradicación (Saxena y Pandey, 2001). Por otra parte, las implicaciones de los fungicidas sintéticos como contaminantes ambientales y como agentes tóxicos para mamíferos incluyendo a los humanos, han favorecido el desarrollado de nuevas estrategias para combatir el problema de las plagas en los cultivos agrícolas con la intención de retirar del mercado a muchos de los fungicidas sintéticos (Montesinos, 2003; Fravel, 2005; Rimando y Duke, 2006).

Actualmente, para que una molécula sea considerada como candidato para llegar a ser un producto comercial debe resistir el sol, el calor y la lluvia, además de penetrar en el organismo blanco (maleza, hongo, oomiceto, insecto) y ser transportado al sitio diana (proteína) e inhibirlo efectivamente; asimismo, debe resistir al metabolismo del organismo y evitar afectar especies que no son su blanco, especialmente al cultivo; ser inofensivo para el ambiente y no mostrar efectos adversos contra los humanos. Preferentemente, que tenga un nuevo modo de acción y tan potente como para aplicarse

en baja cantidad por hectárea y conveniente en cuanto a los costos de su formulación y manufacturación (Smith *et al.*, 2008).

En este sentido, los productos naturales constituyen una fuente casi inagotable de estructuras químicas novedosas con posible aplicación en agroquímica y farmacología, y un amplio campo de investigación en el desarrollo racional de plaguicidas. Se considera, en general, que un gran número de productos naturales poseen un tiempo de vida corto y son susceptibles de ser degradados por los microorganismos del suelo, lo cual disminuye sus efectos tóxicos, permitiendo así mantener la diversidad biológica de predadores y reduciendo la contaminación del ambiente, así como el riesgo a la salud humana (Dubey *et al.*, 2011). La vasta diversidad química de los compuestos naturales, según Demain (2009), se debe a que el metabolismo secundario evolucionó en respuesta a las necesidades y retos del medio ambiente. La naturaleza ha estado llevando a cabo a lo largo de la evolución su propia versión de química combinatoria la cual ha rendido una plétora de estructuras exóticas ricas en estereoquímica, anillos concatenados y grupos funcionales reactivos. Los productos naturales han evolucionado para unirse a proteínas y tienen propiedades tipo fármaco y son, por lo tanto, la principal fuente de farmacóforos (Saxena y Pandey, 2001).

Las fuentes de productos naturales permanecen inexploradas en gran parte, en consecuencia, estrategias adecuadas de investigación pueden conducir al descubrimiento de novedosos compuestos bioactivos. La principal ventaja del estudio de la química de productos naturales es la promesa de encontrar nuevos compuestos con mecanismos de acción específicos y novedosos, así como moléculas líderes para el diseño y desarrollo de nuevos agentes químicos, además de ser una poderosa herramienta bioquímica, sirviendo como trazadores en biología molecular en la investigación de funciones celulares (Saxena y Pandey, 2001; Knight *et al.*, 2003).

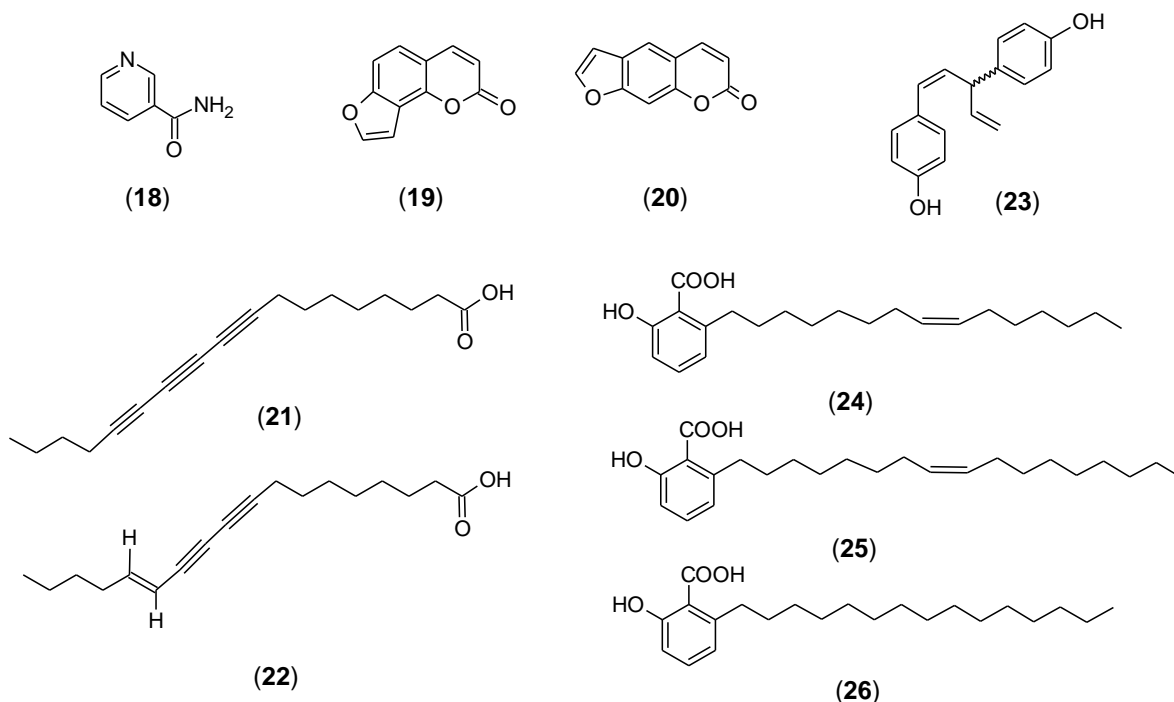
Con relación a metabolitos secundarios potencialmente útiles para combatir los daños ocasionados por oomicetos fitopatógenos, en la literatura existen apenas una veintena de

artículos científicos que presentan productos naturales obtenidos de plantas, bacterias, actinomicetos y hongos, con actividad antioomiceto.

4.3.1. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de plantas

Las plantas, al tener un estilo de vida sedentaria, están en contacto continuo con diferentes microorganismos, como bacterias, virus, hongos y oomicetos; y al ser incapaces de emplear estrategias de defensa como el escape, la evasión o el mimetismo, han acoplado sistemas de defensa tanto mecánicos (presencia de espinas, agallas, cutícula serosa, tricomas), fenológicos (rápida reposición de biomasa) y químicos (antialimentarios, antimicrobianos) que pueden, a su vez, ser constitutivos (fitoanticipinas) o inducibles (fitoalexinas) [Sánchez-Pérez, 2007; Oliveros-Bastidas, 2008].

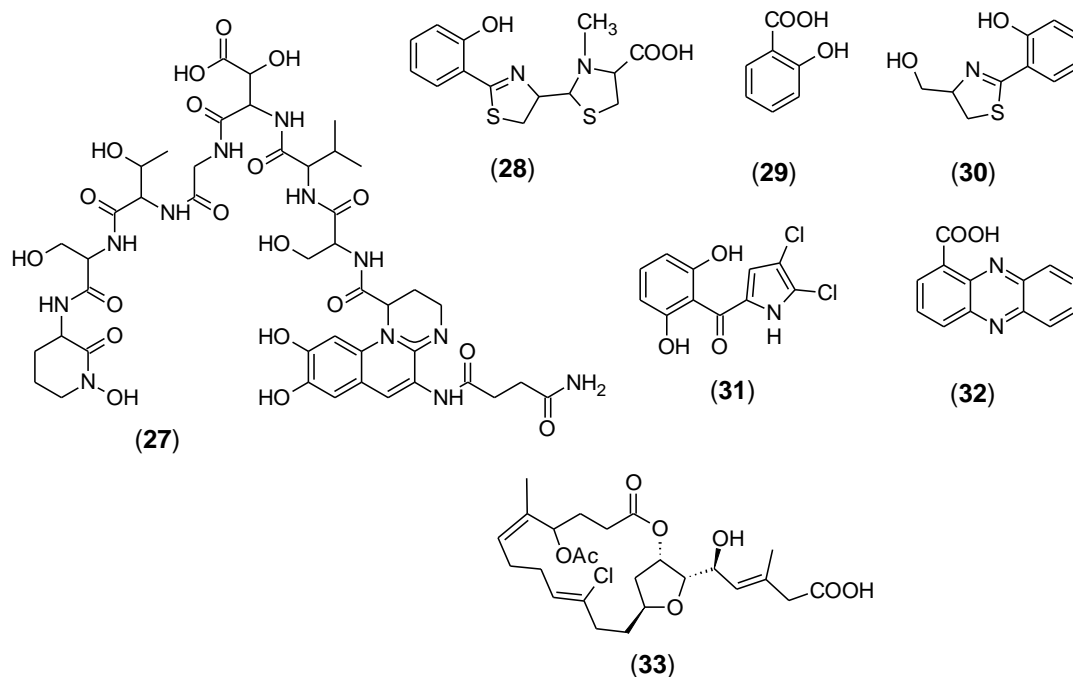
Algunos compuestos aislados de plantas han mostrado actividad inhibitoria contra oomicetos, tanto *in vivo* como *in vitro*, y se postula que algunos de ellos están involucrados en la defensa de la planta contra las enfermedades. Entre los más representativos se encuentran: la nicotinamida (**18**), obtenida de las hojas de la espinaca roja (*Amaranthus gangeticus*), y compuestos relacionados con un anillo aromático nitrogenado y una amida; estos compuestos muestran actividad paralizante sobre las zoosporas de *Aphanomyces cochlioides*, agente causal de la pudrición de la raíz de espinaca y marchitamiento de las semillas (Shimai *et al.*, 2002). Las furanocumarinas, como el psoraleno (**19**) y el isopsoraleno (**20**), aislados de *Psoralea corylifolia* (*leguminosae*) presentan actividad inhibitoria sobre *Phytophthora infestans* (Shim *et al.*, 2009). Los ácidos poliacetilénicos, octadeca-9,11,13-triinoico (**21**) y trans-octadeca-13-en-9,11-diinoico (**22**) de *Prunella vulgaris*, inhiben el crecimiento de *Phytophthora infestans* y *Phytophthora capsici* (*in vitro*), además del desarrollo de la enfermedad *in vivo* (Yoon, *et al.*, 2010). De los rizomas de *Anemarrhena asphodeloides* (Liliaceae) fue aislado el compuesto niasol (**23**), que inhibe el crecimiento de *Phytophthora capsici* (Park *et al.*, 2003). Los ácidos 22:1- ω 7-anacárdico (**24**), 24:1- ω 9-anacárdico (**25**) y 22:0-anacárdico (**26**), obtenidos de frutos inmaduros de *Ginkgo biloba*, inhiben la movilidad de las zoosporas de *Aphanomyces cochlioides* (Begum *et al.*, 2002).



4.3.2. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de bacterias

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias representan una fuente importante de compuestos con propiedades antifúngicas y antioomicetos. El 17% de los metabolitos bioactivos conocidos han sido aislados de este grupo de microorganismos (Bérdy, 2005). Algunos géneros de bacterias como *Pseudomonas* han sido reconocidos como antagonistas de patógenos de plantas y productores de antibióticos (debido quizá a su abundancia e importancia en los suelos). Por ejemplo, la cepa 7NSK2 de *Pseudomonas aeruginosa* aislada de raíces de cebada, es productora de tres sideróforos, la pioverdina (**27**), la pioquelina (**28**) y el ácido salicílico (**29**), cuya producción es indispensable para el mayor efecto protector contra la infección de *Pythium splendens* en semillas de jitomate (Buysens *et al.*, 1996). La cepa MM-B16 de *Pseudomonas fluorescens* colectada de una muestra de suelo produce el antibiótico aerugina (**30**), que reduce la infección por *Phytophthora capsici* en plantas de chile, aunque es menos efectivo que el antioomiceto comercial metalaxil (Lee *et al.*, 2003a). La cepa Pf-5 de *Pseudomonas fluorescens* produce el antibiótico pioluteorina (**31**), un inhibidor del crecimiento de *Pythium ultimum*, y que

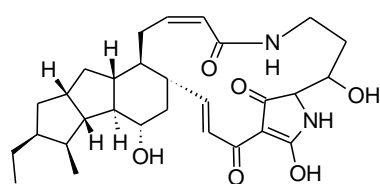
protege a las semillas de algodón de la pudrición temprana causada por este patógeno (Howell y Stipanovic, 1980). La cepa CG-B26 de *Pseudomonas aeruginosa* aislada del suelo, produce el ácido fenazina-1-carboxílico (**32**), el cual es muy activo *in vitro* contra *Pythium ultimum*, *Phytophthora capsici* y *Colletotrichum orbiculare*, aunque es menos efectivo que el metalaxil en el control del tizón causado por *Phytophthora capsici* en plantas de Chile (Lee *et al.*, 2003b). Resulta muy interesante la actividad de la lactona macrocíclica clorada, oocidina A (**33**), producida por *Serratia marcescens* aislada como epífita de hojas sanas de la planta acuática *Rhynholacis pedicillata*; esta lactona muestra una concentración mínima inhibitoria (CMI) menor que el metalaxil sobre el crecimiento de *Pythium ultimum*, *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora cinnamomi* (Strobel *et al.*, 1999a).



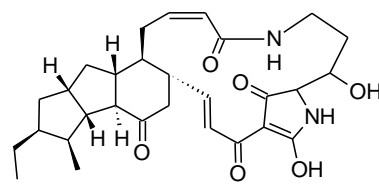
4.3.3. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de actinomicetos

Los actinomicetos son, históricamente, los microorganismos con mayor producción de metabolitos secundarios, con un 43% del total de los compuestos microbianos bioactivos (Bérday, 2005). De *Streptomyces* sp. aislado del suelo, se identificaron dos macrociclos, la maltofilina (**34**) y la dehidromaltofilina (**35**), constituidas por un residuo de ácido

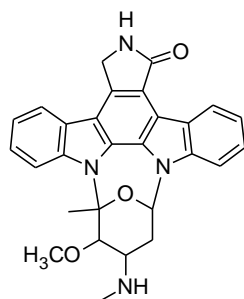
tetrámico fusionado a un sistema tricíclico de anillos; ambos compuestos muestran actividad antioomiceto sobre *Plasmopara viticola*, el principal patógeno de *Vitis vinifera* (Graupner *et al.*, 1997). Del actinomiceto *Lechevalieria aerocolonigenes* cepa VK-A9, aislado del suelo, se obtuvo la tiobutacina (**36**), un metabolito que inhibe la motilidad de las zoosporas, la germinación de los quistes y el crecimiento de las hifas de *Phytophthora capsici*, además de ser efectivo en el tratamiento del tizón causado por *P. capsici* en plantas de Chile, y de no ser tóxico para estas últimas, por lo cual representa una molécula promisoriosa para el control de enfermedades ocasionadas por oomicetos (Lee *et al.*, 2004). Otro actinomiceto del suelo, *Streptomyces roseoflavus* produce el compuesto estaurosporina (**37**) que inhibe el crecimiento de *Phytophthora capsici* y controla el tizón sobre plantas de Chile, aunque es menos efectiva que el metalaxil (Park *et al.*, 2006). De *Streptomyces flaveus* se aisló un antibiótico del tipo manumicina, la 2,4,6-trimetildecadienamida (**38**), que tiene actividad inhibitoria sobre el crecimiento de *P. capsici* (Hwang *et al.*, 1996).



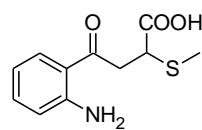
(34)



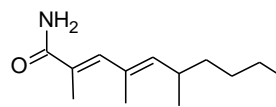
(35)



(37)



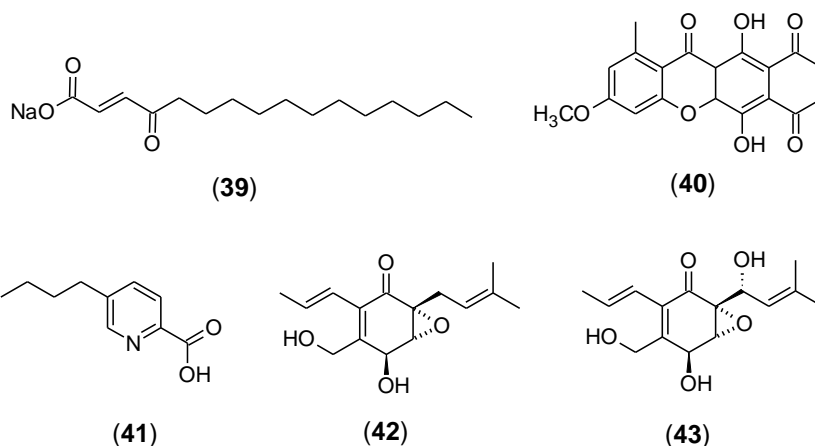
(36)



(38)

4.3.4. Metabolitos secundarios con actividad antioomiceto obtenidos de hongos

Los hongos, después de los actinomicetos, son los segundos productores de compuestos bioactivos con un 38% del total de metabolitos microbianos (Bérdy, 2005), destacando, por su actividad antioomiceto, la sal sódica del ácido (E)-4-oxohexadeca-2-enóico (**39**), aislada de los cuerpos fructíferos del basidiomiceto *Hygrophorus* sp., y que posee actividad inhibitoria sobre el crecimiento y la germinación de las esporas de *Phytophthora infestans* y reduce la infección en plantas de papa (Eschen *et al.*, 2009). Interesantemente, el ácido fusárico (**40**) y la bicaverina (**41**), obtenidos de la cepa EF119 de *Fusarium oxysporum* aislada de tejido sano de la raíz de plantas de pimiento rojo, reducen de manera importante el desarrollo del tizón tardío en jitomate causado por *P. infestans* (Son *et al.*, 2008). Dos epóxidos de la ciclohexanona, la jesterona (**42**) y la hidroxijesterona (**43**), producidos por *Pestalotiopsis jesteri*, un hongo endófito de *Fragaria bodenii*, poseen actividad antioomiceto sobre *Pythium ultimum*, *Aphanomyces* sp., *Phytophthora citrophthora* y *Phytophthora cinnamomi*. La jesterona (**42**) posee una CMI relativamente baja (~25 µg/mL), lo cual sugiere que tiene potencial como agroquímico comercial (Li y Strobel, 2001).



4.4. LOS HONGOS ENDÓFITOS

En años recientes, la investigación en productos naturales ha puesto en evidencia que la producción de metabolitos secundarios por un organismo no es un fenómeno aleatorio

sino que existe una estrecha correlación con el nicho ecológico que ocupa, por lo que el uso de la ecología fúngica en la búsqueda de nuevos productos naturales bioactivos resulta extremadamente atractiva. En primera instancia porque los hongos son los segundos principales productores de metabolitos secundarios, y en segunda, debido a que el número estimado de especies fúngicas es cinco veces mayor que el predicho para las especies de plantas y cincuenta veces superior al estimando de especies de bacterias (Gloer, 2007; Demain, 2009).

Los hongos endófitos, que colonizan los tejidos de plantas sin causarles síntomas aparentes de enfermedad, han sido reconocidos recientemente como una nueva herramienta en la producción de metabolitos antimicrobianos (Gond *et al.*, 2010). En un estudio realizado por Schulz y colaboradores (2002) encontraron que el 58 % de los metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos fueron novedosos, en comparación con el 38 % de aquellos producidos por hongos aislados del suelo.

Los hongos endófitos han sido aislados de todas las especies de plantas estudiadas, por lo que se consideran ubicuos dentro del reino vegetal. Y considerando que existen aproximadamente 300 mil especies de plantas, cuya diversidad de microbiota interna es relativamente alta, y dado que una proporción comparativamente pequeña de potenciales hospederos ha sido examinada, los endófitos representan un substancial número de especies de hongos aún por descubrir (Tan y Zou, 2001; Faeth, 2002; Strobel *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2004; Ganguli y Deshmukh, 2007).

Se estima que existen, según cálculos conservadores, más de 1.5 millones de especies de hongos, de los cuales se conocen apenas cerca del 5% (Guzman, 1998; Hawksworth, 2001). Aunque se ha propuesto que quizá tan sólo los hongos endófitos podrían alcanzar 1.62 millones de especies, considerando la diversidad de plantas y el número de especies de hongos asociados a ellas, por lo cual, constituyen una fuente importante de nuevas moléculas bioactivas, no sólo de interés agrícola, sino también médico e industrial (Gunatilaka, 2006).

En la última década se ha dado un crecimiento exponencial en el estudio de hongos endófitos y sus metabolitos, lo cual se ilustra con el número de publicaciones científicas y patentes publicadas en los últimos 20 años: 1990-1995 (12), 1996-2000 (32), 2001-2005 (78), 2006-2010 (196) y más de 650 patentes (Tejesvi y Pirttilä, 2011). De manera que el verdadero potencial de los hongos endófitos como productores de metabolitos secundarios apenas comienza a vislumbrarse.

La investigación sobre hongos endófitos productores de metabolitos con actividad antimicrobiana se ha enfocado principalmente en plantas medicinales (35%), cultivos (29%), plantas en ambientes especiales (18%) y otras plantas (18%) [Yu *et al.*, 2010]; que ha rendido una gran diversidad química de compuestos químicos como esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, derivados del perileno, quinonas, furandionas, terpenoides, depsipéptidos, citocalacinas, entre otros (Schulz y Boyle, 2005).

Asociado a la diversidad estructural de estos productos naturales sobreviene su pluralidad funcional y, por lo tanto, su potencial como posibles agentes quimioterapéuticos y antibióticos en medicina, plaguicidas y reguladores del crecimiento en agricultura. La diversidad metabólica de los hongos endófitos se sustenta en que su desarrollo ha ocurrido a través de un proceso coevolutivo con las plantas. Son organismos que se han especializado en un nicho biológico (los tejidos vegetales), que si bien los protege del medio ambiente externo, los sitúa en un ambiente extremadamente competitivo, en el cual deben luchar por alimento y espacio con otros organismos endófitos y además contender contra las defensas químicas de la planta hospedera. Este estrés biótico (interacciones) dentro de la hospedera es el motor que impulsa la constante y exhaustiva innovación química que han desarrollado los hongos endófitos a lo largo de la evolución (Strobel *et al.*, 2004).

Se ha postulado que los hongos endófitos son capaces de proveerle beneficios a su hospedera a través de mecanismos que pueden ser: directos, como la interacción endófito-patógeno; indirectos, reforzando las defensas de la planta; y ecológicos, por ocupación de un nicho (la hospedera) impidiendo el establecimiento del patógeno.

Específicamente, dentro de los mecanismos directos se encuentra la producción de metabolitos secundarios bioactivos y la secreción de enzimas líticas. Esta teoría es apoyada empíricamente por el hecho de que muchos microorganismos endófitos producen *in vitro* metabolitos secundarios que presentan actividad antifúngica y antibacteriana sobre microorganismos fitopatógenos. Sin embargo, debido a la específica y limitada colonización de muchos endófitos, la producción *in vivo* de estos metabolitos secundarios bioactivos no puede ser medida (Gao *et al.*, 2010). No obstante, esta correlación permite suponer que los hongos endófitos, debido a su alta diversidad biológica y metabólica, constituyen una fuente muy abundante de metabolitos secundarios con posible uso en agricultura como agroquímicos de origen natural. En este contexto, a lo largo de los últimos diez años, a partir de hongos endófitos se ha obtenido un sinnúmero de metabolitos secundarios activos contra hongos y oomicetos fitopatógenos. A continuación se presentan algunos ejemplos notables.

4.4.1. Alcaloides bioactivos producidos por hongos endófitos

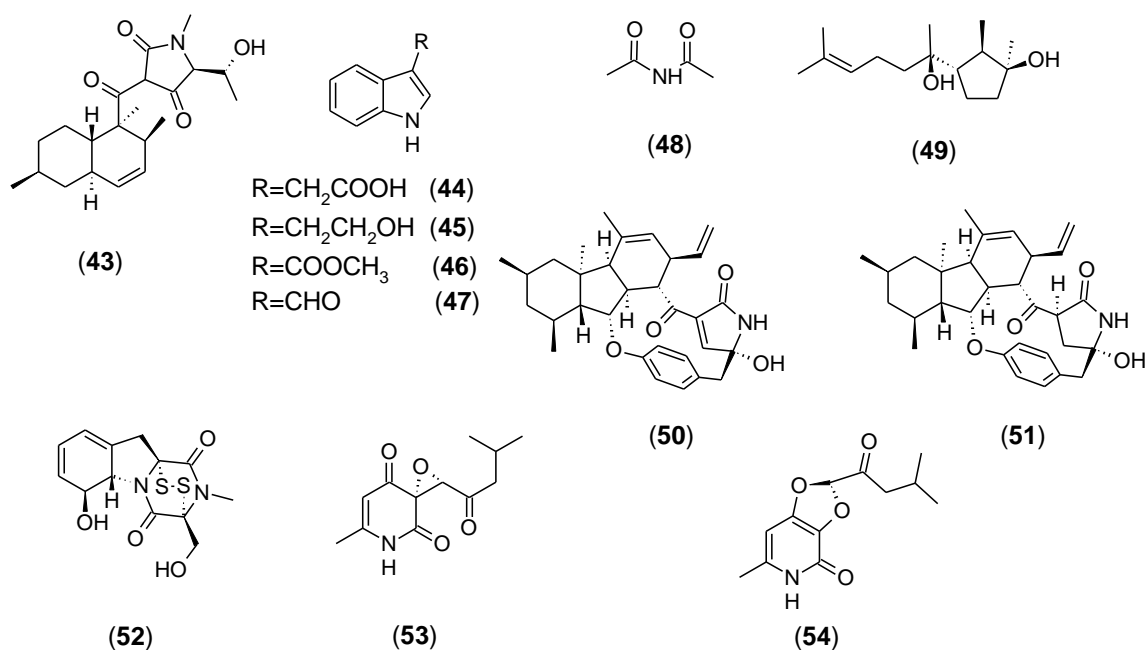
Entre los alcaloides más destacados, tanto por su actividad fungicida como por su estructura, se encuentran: la criptocina (**43**), un ácido tetrámico producido por *Criptosporiopsis quercina*, un endófito de *Tripterygium wilfordii*, muestra una potente actividad sobre *Pyricularia oryzae*, el principal patógeno del arroz, con una CMI de 0.39 μM (Li *et al.*, 2000). Los derivados del indol denominados ácido 3-indolacético (**44**), indol-3-etanol (**45**), indol-3-carboxilato de metilo (**46**), indol-3-carboxaldehído (**47**), diacetamida (**48**) y el terpeno cicloneerodiol (**49**), fueron aislados por Yue y colaboradores (2000) de *Epichloë festucae*, endófito de *Festuca rubra*; y muestran actividad antifúngica sobre *Cryphonectria parasitica*, agente causal del chancro del castaño.

Acremonium zeae, uno de los hongos endófitos aislados más frecuentemente de maíz sano (*Zea mays*), produce las pirrocidinas A y B (**50**, **51**), las cuales presentan actividad inhibitoria sobre *Aspergillus flavus* y *Fusarium verticilloides*. Wicklow y colaboradores (2005) identificaron que 13 de 14 cepas de *Acremonium* aisladas de plantas de maíz de distintas regiones, producen al menos una de las pirrocidinas y además que estos

antibióticos son producidos también *in planta*, por lo que se postula que *A. zeae* le confiere protección al maíz contra los hongos fitopatógenos evaluados.

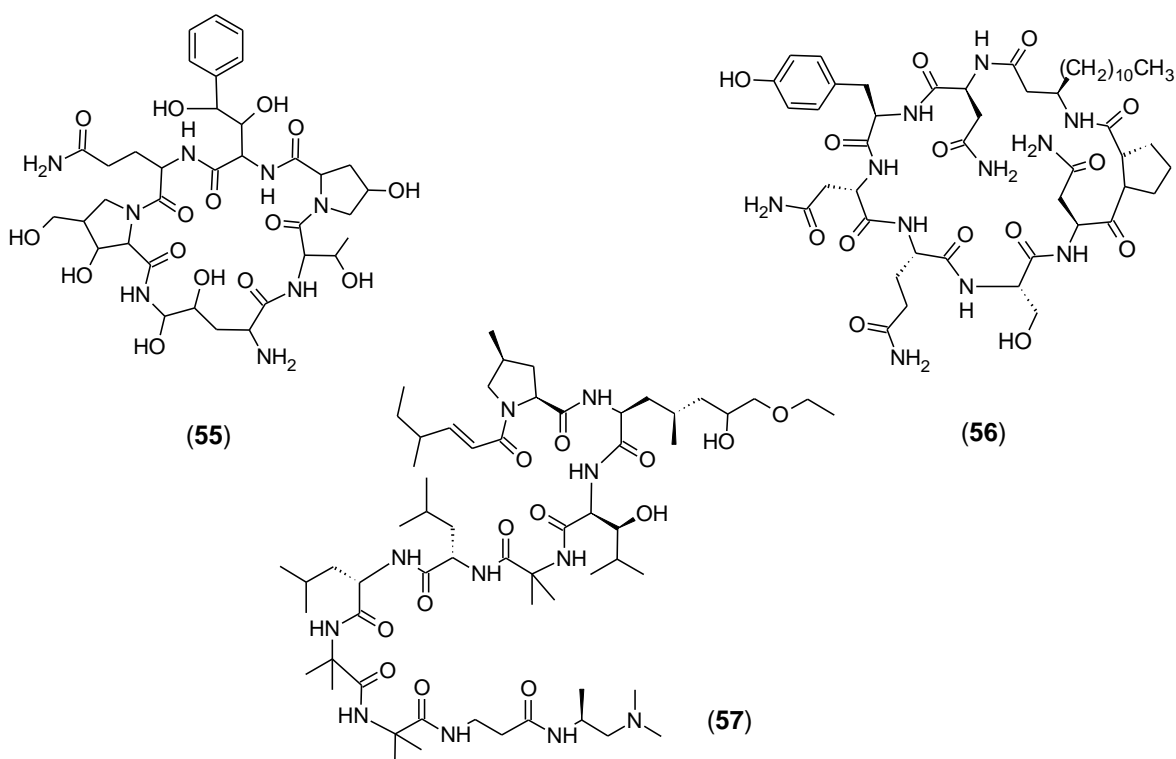
Li y colaboradores (2011) aislaron 12 compuestos del extracto del micelio de *Chaetomium globosum*, un endófito de *Ginkgo biloba*; de los cuales sólo la gliotoxina (**52**), una dicetopiperazina con un puente disulfuro, presenta buena actividad antifúngica sobre *Fusarium sulphureum*, *Alternaria alternata* y *Cercospora sorghi*, con valores de CI_{50} 68.5, 36.8 y 59.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente; y moderada actividad hacia *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium graminearum*, con valores de CI_{50} de 93.7, 106.6 y 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Del extracto del caldo de cultivo del endófito *Phoma* sp., aislado de las hojas de *Salsola oppositifolia*, fueron aislados ocho metabolitos secundarios con estructura de piridona prenilada, que presentan actividad antibacteriana y fungicida. Específicamente, la (+)-flavipucina (**53**) presenta fuerte actividad inhibitoria sobre los hongos fitopatógenos *Phytophthora infestans* ($CMI=7.81 \mu\text{g/mL}$) y *Septoria tritici* ($CMI=31.1 \mu\text{g/mL}$), mientras que la isoflavipucina (**54**) posee una actividad fungicida moderada sobre *Phytophthora infestans* ($CMI=31.3 \mu\text{g/mL}$) [Loesgen *et al.*, 2011].



4.4.2. Péptidos bioactivos producidos por hongos endófitos

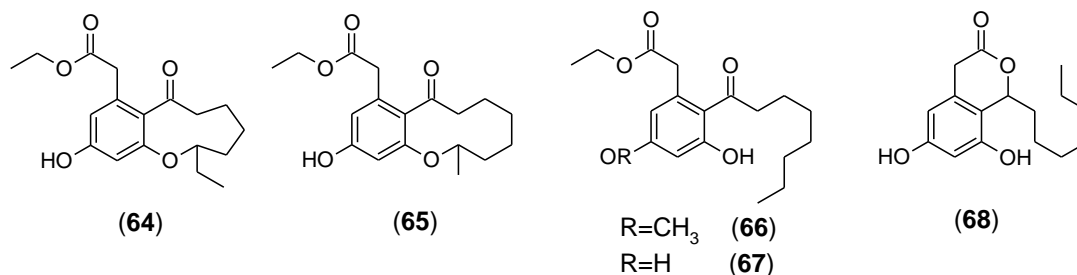
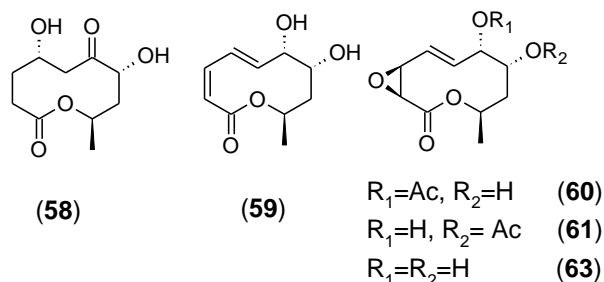
Algunos péptidos producidos por hongos endófitos han demostrado una buena actividad fungicida. La criptocandina (**55**) producida por *Criptosporiopsis quercina*, endófito de *Tripterygium wilfordii*, inhibe el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos, incluyendo *Sclerotinia sclerotiorum* y *Botrytis cinerea* (Strobel *et al.*, 1999b). La epiclicina (**56**) aislada de *Epichloe typhina*, que coloniza de forma endofítica a *Phleum pretense*, presenta actividad inhibitoria hacia *Cladosporium phlei*, un hongo fitopatógeno de este pasto, con un valor de CI_{50} de 22 nM (Seto *et al.*, 2007). La especie *Acremonium* sp. aislada de *Taxus baccata*, produce el péptido leucinostatina A (**57**), que posee una CI_{50} menor a 1 μ M contra el oomiceto *Pythium ultimum* (Strobel *et al.*, 1997).



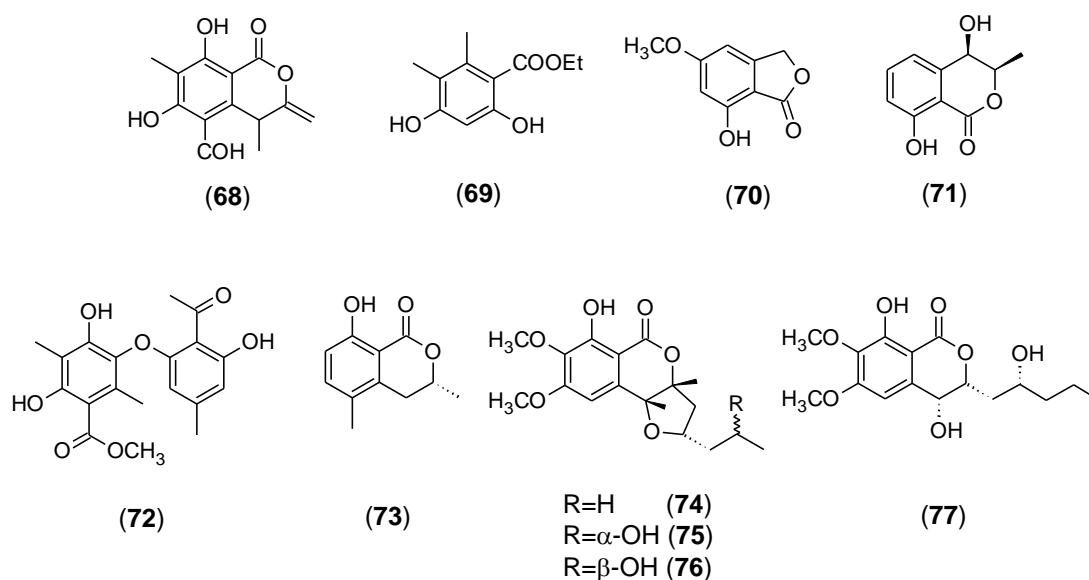
4.4.3. Compuestos bioactivos derivados de isocumarina, indolona y cromona producidos por hongos endófitos

Un gran número de metabolitos secundarios con actividad fungicida producidos por hongos endófitos son de origen policétido, presentando grupos funcionales como lactonas, fenoles, ésteres, derivados de cumarina, cromona, xantona, benzofenona,

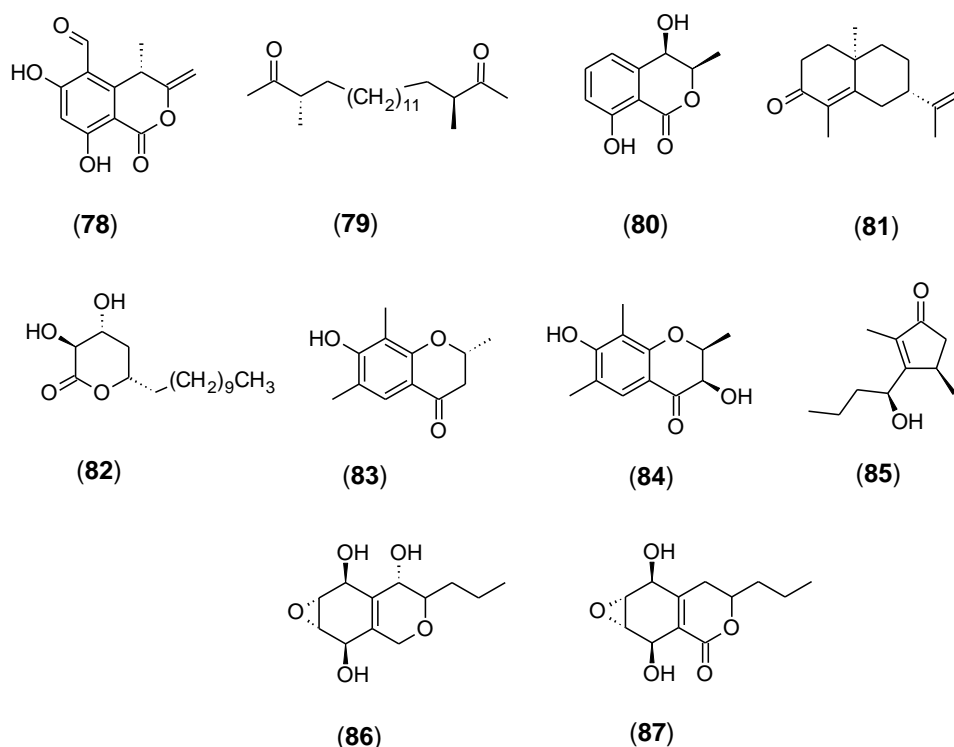
benzoindolona, entre otros. Algunos de estos compuestos pertenecen a rutas biosintéticas mixtas como ciclohexenonas y fenoles prenilados. Por ejemplo, *Phomopsis* sp. cepa YM 311483, aislado de tallos de un espécimen sano de *Azadirachta indica*, produce cuatro nuevas lactonas de diez miembros denominadas 8-acetoxi-5-hidroxi-7-oxodecan-10-ólida (**58**), 7,8-dihidroxi-3,5-decadien-10-ólida (**59**), 7-acetoximulti-plólida A (**60**) y 8-acetoximultiplólida A (**61**), así como la conocida multiplólida A (**62**). Estos compuestos muestran una débil actividad antifúngica sobre *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium moniliforme*, *Helminthosporium maydis*, *Penicillium islandicum* y *Ophiostoma minus*. La 8-acetoximultiplólida A (**61**) fue el compuesto más potente con un rango de CMI de 31.25 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Wu *et al.*, 2008). De otra especie de *Phomopsis*, la cepa ZSU-H76, aislada del tallo del árbol de manglar *Excoecaria agallocha*, fueron aislados cinco octacétidos, las nuevas fomopsinas A, B y C (**63**, **64**, **65**), además de las conocidas citosporonas B y C (**66**, **67**); estas dos últimas inhiben a *Candida albicans* y *Fusarium oxysporum* con CMI que van de 32 a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Huang *et al.*, 2008).



Algunos compuestos relacionados con el esqueleto de isocumarina, isoindolona y derivados del ácido benzoico, han demostrado una actividad fungicida destacada. La fomopsilactona (**68**) y el 2,4-dihidroxi-5,6-dimetil benzoato de etilo (**69**), aislados de *Phomopsis cassiae*, un hongo endófito de *Cassia spectabilis*, muestran una fuerte actividad antifúngica sobre *Cladosporium cladosporioides* y *Cladosporium sphaerospermum* (Silva *et al.*, 2005). De un ascomiceto no identificado, aislado como endófito de *Melilotus dentatus*, se identificaron cuatro indolonas, dos derivados de la meleína y dos esteroides, de los cuales la 5-metoxi-7-hidroxi-7-oxo-2,3-dihidro-1H-benzofuran-3-ona (**70**) y la (3*R*,4*R*)-*cis*-4-hidroxi-5-metilmeleína (**71**) presentan actividad fungicida sobre *Microbotryum violaceum*, además de actividad antibacteriana y alguicida (Hussain *et al.*, 2009a). De la planta halotolerante *Adenocarpus foliolosus*, se aisló una cepa de *Phomopsis* sp. de cuyo extracto del micelio se obtuvieron trece metabolitos secundarios, seis nuevos y siete conocidos, de los cuales la phomopsina A (**72**) y la 5-metilmeleína (**73**) fueron activos contra *M. violaceum* a 10 µg/mL (Dai *et al.*, 2005). Del hongo *Microdochium bolleyi*, un endófito de *Fagonia cretica*, se obtuvieron tres nuevas isocumarinas (**75-77**), además de la monocerina (**74**). Los cuatro compuestos presentan actividad fungicida sobre *M. violaceum*, siendo el compuesto (**74**) el más activo (Zhang *et al.*, 2008c)

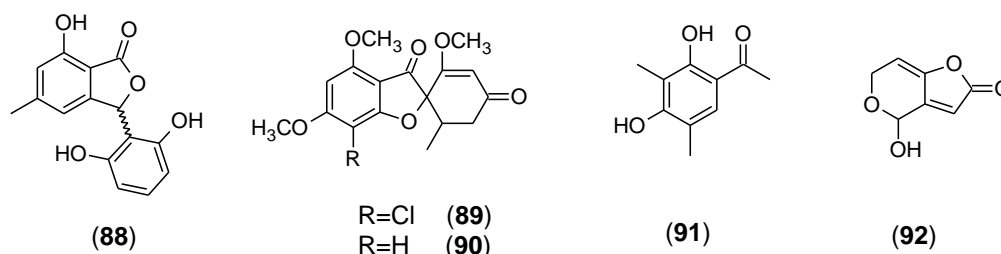


Kronh y colaboradores (2007) obtuvieron del hongo endófito *Ascochyta* sp., aislado de la planta *Melilotus dentatus*, dos compuestos nuevos: la (*S*)-(+)-ascoquina (**78**) y la (*S,S*)-(+)-ascodicetona (**79**); y tres conocidos, la (*3R,4R*)-(-)-4-hidroximeleína (**80**), la *ent-α*-ciperona (**81**) y la (*3S,4R*)-(-)-dihidroxi-(*6S*)-undecil- α -piranona (**82**), de los cuales este último presenta la mayor actividad antifúngica sobre *Microbotryum violaceum*. Una cepa de *Phomopsis* sp., un endófito aislado de *Cistus monspeliensis*, produce dos nuevas cromonas, las fomocromonas A y B (**83**, **84**), y una ciclopentanona, la fomotenona (**85**), que son activas sobre *Microbotryum violaceum*, *Botrytis cinerea* y *Septoria tritici* (Ahmed *et al.*, 2011). *Phomopsis* sp., aislado de *Laurus Azorica*, produce una familia de epóxidos de dihidroxi-ciclohexeno, de los cuales el cicloepoxitriol B (**86**) y la cicloepoxilactona (**87**) muestran actividad antibacteriana y antifúngica sobre *Bacillus subtilis* y *Microbotryum violaceum*, respectivamente (Hussain *et al.*, 2009b).

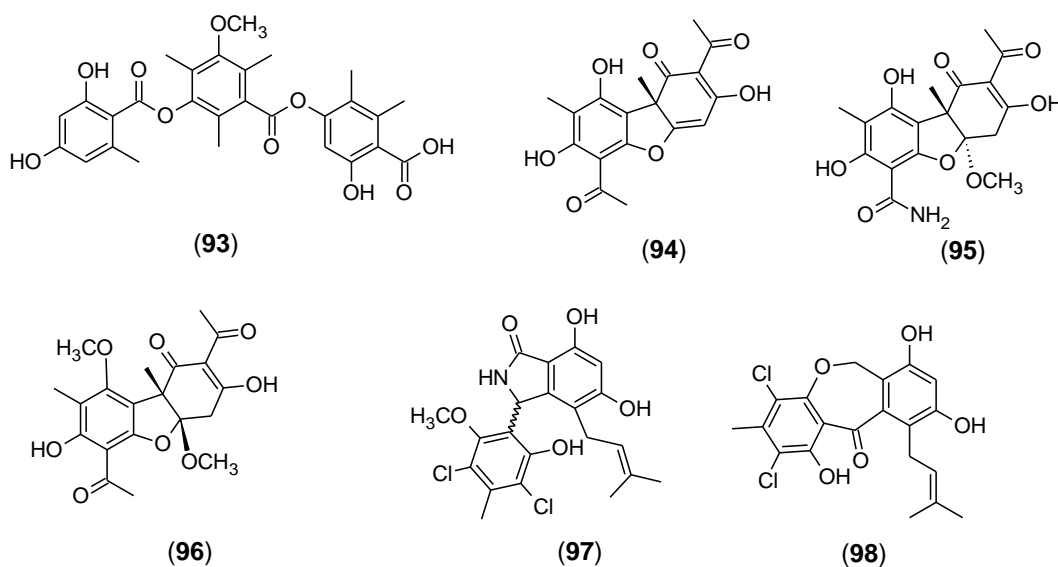


Pestalotiopsis microspora, un endófito de *Terminalia morobensis*, produce un compuesto con actividad antifúngica moderada, la isopestacina (**88**), una isobenzofuranona (mezcla

de isómeros *R* y *S*) que a 40 µg/mL inhibe totalmente el crecimiento de *Pythium ultimum* (Strobel *et al.*, 2002). De la cepa *Xylaria* sp. (F0010) aislada como endófito de *Abies holophylla*, se obtuvieron dos metabolitos secundarios con actividad antifúngica, la griseofulvina (**89**) y la desclorogriseofulvina (**90**), siendo la primera más potente en el control de *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Magnaporthe grisea* tanto *in vitro* como *in vivo* (Park *et al.*, 2005). *Aspergillus clavatonanicus*, un endófito de *Taxus marei*, produce los antibióticos clavatol (**91**) y patulina (**92**), que inhiben el crecimiento de varios microorganismos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Didymella bryoniae*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum*, con valores de CI_{50} de entre 0.011-0.1 y 0.005-0.0197 µg/mL, respectivamente (Zhang *et al.*, 2008a).

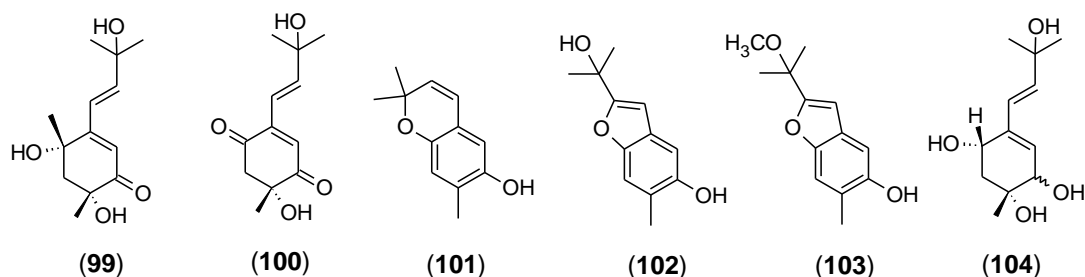


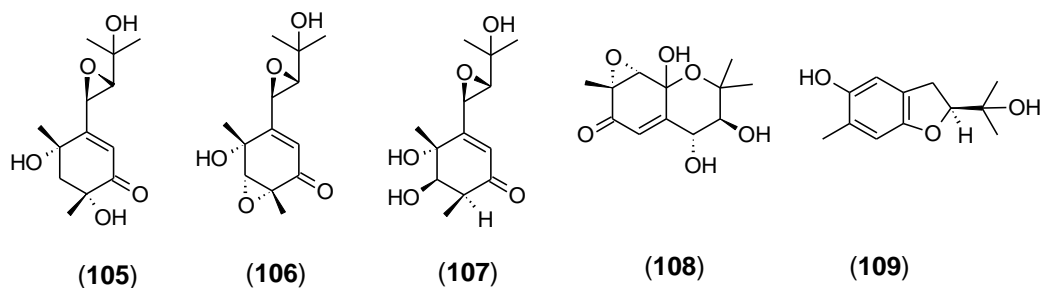
El ácido colletotrico (**93**), un tridépsido producido por *Colletotrichum gloeosporioides* (un endófito de *Artemisia mongolica*), muestra actividad antifúngica sobre *Helminthosporium sativum* a 50 µg/mL (Zou *et al.*, 2000). Hoffman y colaboradores (2008) obtuvieron un grupo de ácidos fenólicos del caldo de cultivo de *Phoma* sp. aislado como endófito de *Saurauia scaberrinae*, de los cuales el ácido úsnico (**94**), la cercosporamida (**95**) y la fomodiona (**96**), presentan actividad sobre bacterias Gram-positivas y sobre *Pythium ultimum*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*. Dos nuevos antibióticos, los pestalocloruros A y B (**97**, **98**), fueron aislados del endófito *Pestalotiopsis adusta* (obtenido de un árbol no identificado), los cuales muestran actividad antifúngica significativa sobre los patógenos de plantas *Fusarium culmorum*, *Gibberella zeae* y *Verticillium alboatrum* (Li *et al.*, 2008).



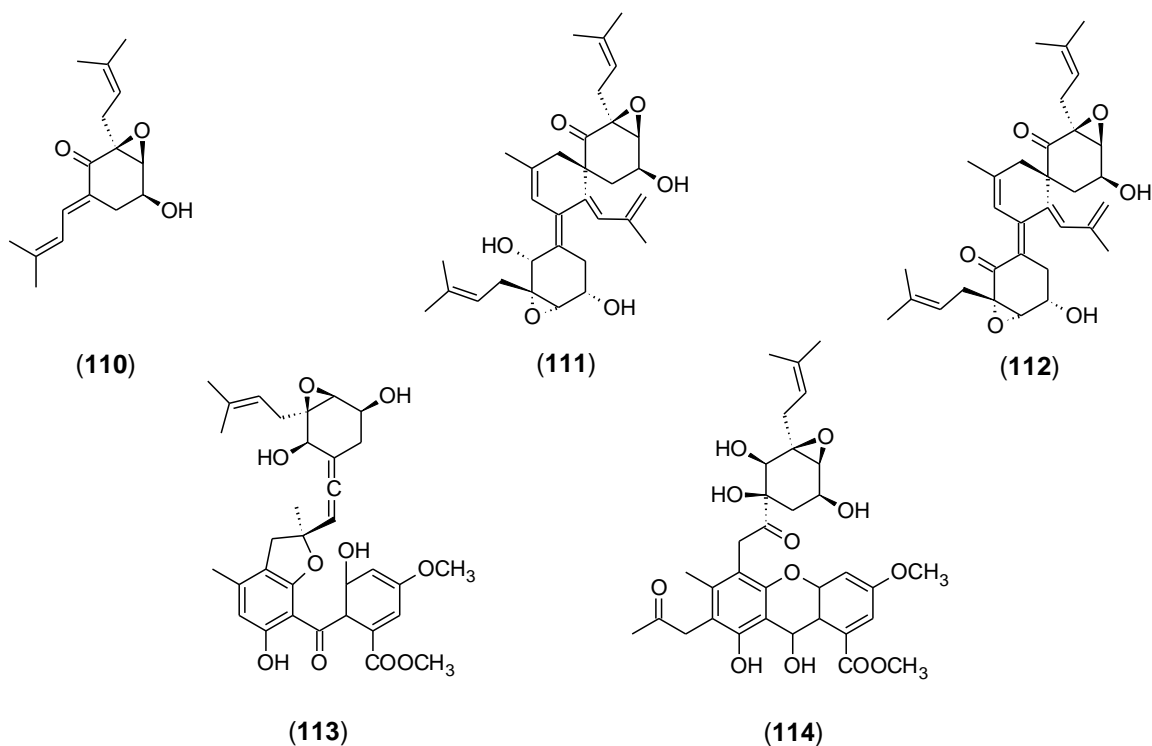
4.4.4. Compuestos bioactivos tipo ciclohexanona y fenol prenilados producidos por hongos endófitos

Otra clase de metabolitos secundarios con notoria actividad fungicida corresponde a las epoxi-ciclohexanonas y a los fenoles prenilados. Por ejemplo, el hongo endófito *Acremonium byssoides*, aislado de las hojas de *Vitis vinifera* y además identificado como micoparásito de *Plasmopara viticola* (principal patógeno de la vid), produce una serie de ciclohexanonas preniladas, las acreminas A-F (99-104) y H, I, L-N (105, 106, 107-109), que muestran actividad inhibitoria moderada sobre la germinación de esporas de *P. viticola*, con una $CI_{50} \sim 0.5$ mM (Assante *et al.*, 2005; Burruano *et al.*, 2008; Arnone *et al.*, 2009).





Pestalotiopsis fici, endófito de un árbol no identificado de China, produce una serie de derivados prenilados de ciclohexanona, las pestalafonas A-E (**110-114**), que son activas contra *Candida albicans*, *Geotrichum candidum* y *Aspergillus fumigatus*. Las pestalofonas C (**112**) y E (**114**) muestran actividad antifúngica significativa sobre *A. fumigatus*, con valores de CI_{50}/CMI de 1.10/35.3 y 0.90/31.2 μM , respectivamente (Liu *et al.*, 2009).

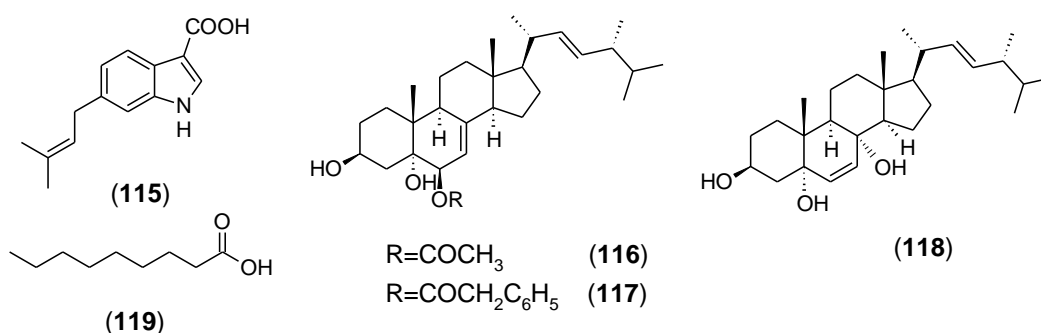


4.4.5. Esteroles y metabolitos alifáticos bioactivos producidos por hongos endófitos

Algunos derivados del ergosterol han demostrado actividad antifúngica. Por ejemplo, de *Colletotrichum sp.*, hongo endófito de *Artemisia annua*, fueron aislados once metabolitos secundarios: un indol hemiterpenoide, el 6-isoprenilindol-3-ácido carboxílico (**115**) y diez

esteroles; de estos últimos el 3 β ,5 α -dihidroxi-6 β -acetoxi-ergosta-7,22-dieno (**116**), 3 β ,5 α -dihidroxi-6 β -fenilacetiloxi-ergosta-7,22-dieno (**117**) y 3 β -hidroxi-5 α ,8 α -epidioxi-ergosta-6,22-dieno (**118**) son activos a 200 μ g/mL sobre los hongos patógenos de cultivos, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum* y *Phytophthora capsici* (Lu *et al.*, 2000).

Por otra parte, no sólo compuestos altamente funcionalizados y estructuralmente complejos poseen una actividad fungicida promisorio, sino también compuestos alifáticos, por ejemplo, el ácido nonanoico (**119**), producido por el hongo endófito *Trichoderma harzianum* aislado de la corteza del cacao (*Theobroma cacao*), inhibe la germinación de las esporas de dos hongos patógenos del cacao, *Monliophthora roreri* y *Crinipellis pernicioso*, a concentraciones menores a 1 μ M (Aneja *et al.*, 2005).



4.5. EL HONGO ENDÓFITO 101

El hongo endófito 101 fue aislado de hojas sanas de *Bursera simaruba* (Burseraceae), colectadas en la reserva ecológica de “El Edén” en el Estado de Quintana Roo. Este endófito fue seleccionado por Murià (2007) de entre un grupo de 14 hongos endófitos aislados de diversas plantas que crecen en esta reserva. Los endófitos fueron cultivados en pequeña escala y posteriormente se probó la actividad antifúngica y fitotóxica sobre microorganismos fitopatógenos (hongos y oomicetos) y plantas de interés económico.

El estudio químico biodirigido a partir de 50 g de extracto orgánico del micelio del hongo endófito 101 (32 L de cultivo) obtenido en condiciones estáticas; permitió obtener catorce

grupos de fracciones primarias (Cuadro 2). La actividad biológica se monitoreó empleando el método de dilución en agar utilizando los hongos *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani* y los oomicetos fitopatógenos *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici* como indicadores. La actividad biológica se concentró en las fracciones (XI-XIV) [Figura 2].

Cuadro 2. Peso de las fracciones primarias derivadas del fraccionamiento del extracto del micelio de 101.

Fracción	Peso (g)	Fracción	Peso (g)
I	0.07	VIII	0.23
II	0.14	IX	1.84
III	0.12	X	5.12
IV	0.60	XI	5.06
V	0.06	XII	4.90
VI	0.01	XIII	0.26
VII	23.77	XIV	0.20

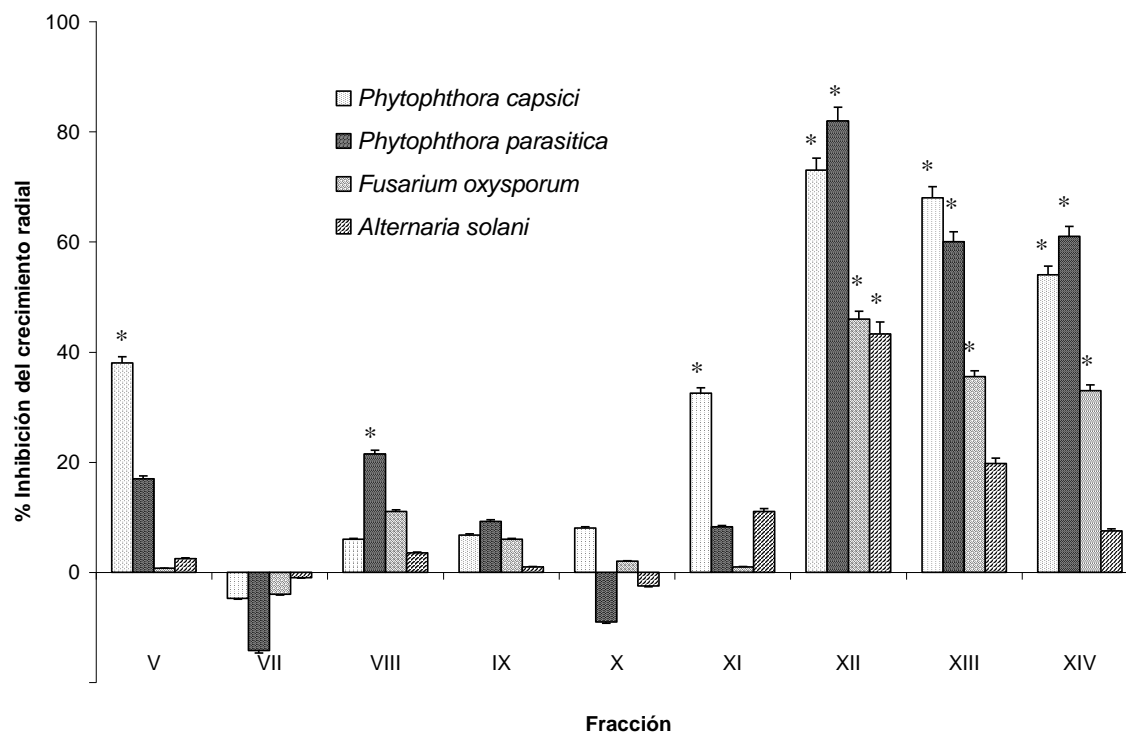
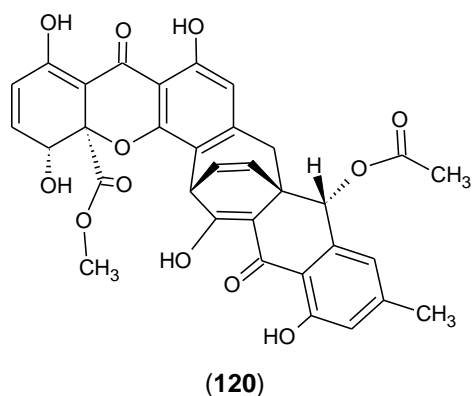


Figura 2. Evaluación biológica de las fracciones primarias activas a 100 $\mu\text{g/mL}$ sobre el crecimiento de dos oomicetos fitopatógenos y dos hongos verdaderos. * n=4; p<0.05.

Asimismo, este trabajo permitió obtener un heterodímero novedoso de hidroxantona y oxantrona; la xantoquinodina J (**120**), la cual precipitó espontáneamente de la fracción primaria activa XII. Este metabolito secundario es el componente mayoritario del extracto activo del micelio de 101 y mostró importante potencial antioomiceto sobre *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici* (Murià, 2007).



Con base en estos resultados, el presente proyecto de investigación se enfocó en realizar el estudio químico de la fracción primaria activa XI y de las aguas madres de la fracción XII, las cuales probablemente contengan metabolitos secundarios estructuralmente relacionados a la xantoquinodina J (**120**) y que muestren potencial antioomiceto.

5. HIPÓTESIS

Los hongos endófitos han sido reconocidos como una fuente prometedora de metabolitos secundarios bioactivos, con posible aplicación en agricultura y medicina, de manera que es altamente probable que el hongo endófito 101 produzca compuestos antimicrobianos que puedan ser útiles en agricultura para el control de oomicetos fitopatógenos.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Clasificar taxonómicamente al hongo endófito 101 de *Bursera simaruba* así como aislar y caracterizar los metabolitos secundarios que posean actividad biológica sobre el crecimiento de oomicetos fitopatógenos, con el fin de contribuir en la búsqueda de nuevos agentes químicos de origen natural útiles en el control de estos microorganismos.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Clasificar taxonómicamente el género y, en lo posible, la especie del hongo endófito 101, con base en su morfología macro y microscópica, estableciendo las características de las hifas, fiálides y conidias.
- Cultivar el hongo endófito 101 en mediana escala y preparar los extractos orgánicos del medio de cultivo y del micelio.
- Determinar cuantitativamente el potencial antimicrobiano del extracto orgánico del micelio del hongo endófito 101, sobre el crecimiento de diferentes microorganismos fitopatógenos con importancia económica para nuestro país: un hongo verdadero, *Fusarium oxysporum*; un hongo fitopatógeno aislado de *B. simaruba*, *Pestalotiopsis* sp., y nueve oomicetos fitopatógenos, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum* y *Pythium polytylum*.
- Aislar y purificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad antioomiceto demostrada por las fracciones primarias, utilizando diversos procedimientos cromatográficos.

- Determinar cuantitativamente el potencial antioomiceto de los compuestos puros aislados del hongo endófito 101, sobre oomicetos fitopatógenos.
- Evaluar la citotoxicidad de los compuestos activos del hongo endófito 101, con el fin de explorar el potencial anticancérgeno y la posible correlación con la actividad antioomiceto.
- Determinar la toxicidad de los compuestos activos del hongo endófito 101, sobre la viabilidad celular de macrófagos murinos (MTT).
- Monitorear la producción de los principales metabolitos secundarios en cultivos de diferentes periodos de incubación, utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

7. PARTE EXPERIMENTAL

7.1. MATERIAL FÚNGICO

El hongo endófito 101 fue aislado en 2005 por la Q. A. Blanca Estela Hernández, del Instituto de Ecología, UNAM, a partir de hojas sanas de *Bursera simaruba* (Burseraceae) colectadas en la reserva ecológica 'El Edén' en el estado de Quintana Roo.

7.2. CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DEL HONGO ENDÓFITO 101

La identificación taxonómica del hongo endófito 101 se realizó utilizando cultivos en placas de papa-dextrosa-agar preparado con papas frescas (PDA) y agar avena (AA). Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C por 15 días con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h. Transcurrido el periodo de incubación, se obtuvieron preparaciones tomando pequeñas muestras del micelio, bajo microscopio estereoscópico, extendiéndolas sobre un portaobjetos con ayuda de una aguja de disección, dentro de una gota de colorante rojo congo o azul de algodón. Posteriormente, se realizaron observaciones en microscopio óptico con el objetivo seco fuerte (40x) para registrar la forma de las hifas y fiálides; y observaciones a inmersión (100x) para registrar las medidas de las fiálides y conidias, utilizando el programa AxioVision (v 4.6.3.0). Adicionalmente, se obtuvieron microcultivos del endófito 101 utilizando fragmentos de PDA de 1 cm² y ~3 mm de espesor, montados sobre un cubreobjetos soportado por un triángulo de vidrio dentro de una caja de Petri. El inóculo se efectuó haciendo contacto en los cuatro bordes del fragmento de agar con el asa cargada de esporas del hongo endófito 101. Posteriormente, se colocó otro cubreobjetos sobre los fragmentos de agar y se adicionaron 10 mL agua destilada en la caja de Petri. Las cajas se sellaron y se incubaron por 15 días, con fotoperiodo luz artificial-oscuridad 12:12 h. A continuación, los fragmentos de agar con crecimiento miceliar fueron desprendidos de los cubreobjetos, se tiñeron con rojo congo o azul de algodón y se realizaron observaciones en microscopio óptico con el objetivo seco fuerte y a inmersión para determinar la forma y longitud de fiálides y conidias, utilizando el programa AxioVision (v 4.6.3.0) [Koneman, 1987].

7.3. MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS DE PRUEBA

Como organismos de prueba se utilizaron la especie *Fusarium oxysporum* (Eumycota), la cual constituye un hongo fitopatógeno con importancia agrícola para México; la especie fitopatógena *Pestalotiopsis* sp., aislada de *B. simaruba*; y nueve oomicetos fitopatógenos identificados como *Phytophthora capsici*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora cactorum*, *Pythium debaryanum*, *Pythium aphanidermatum*, *Pythium ultimum* y *Pythium polytylum* (Oomycota). Las cepas de microorganismos fitopatógenos con importancia agrícola fueron donadas por la Dra. Olga Gómez y la M. en C. Bertha Tlapal Bolaños, del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

7.4. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADO EN LOS BIOENSAYOS Y EN LA OBTENCIÓN DE LOS CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA DEL ENDÓFITO 101

7.4.1. Papa-dextrosa-agar (PDA)

200 g de papa fresca, previamente pelada y cortada cubos, se sometieron a ebullición durante 20 minutos. La decocción resultante se filtró a través gasa y se le agregaron 20 g de dextrosa y 15 g de agar. Por último, se añadió agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa y Hanlin, 1978).

7.4.2. Agar-avena (AA)

A 20 g de avena Quaker® se les adicionó una pequeña cantidad de agua destilada y se hirvieron durante 10 min. A continuación se les agregaron 30 g de agar y agua destilada hasta un volumen final de 1000 mL (Ulloa y Hanlin, 1978).

7.4.3. Caldo-papa-dextrosa (CPD)

El caldo-papa-dextrosa se preparó siguiendo la metodología indicada para el medio papa-dextrosa-agar, con la diferencia de que no se le adicionó agar (Murià, 2007).

7.5. CULTIVOS EN MEDIANA-ESCALA DEL HONGO 101

Los cultivos del hongo endófito 101 se prepararon utilizando las condiciones óptimas de crecimiento establecidas previamente por Murià (2007). Se obtuvieron tres cultivos en condiciones estáticas empleando como medio de fermentación caldo-papa-dextrosa preparado con papas frescas (CPD). Para cada cultivo se utilizaron 4 matraces Fernbach de 2800 mL con 1000 mL de medio de cultivo. Ocho de los matraces se incubaron por un período de 30 días y los cuatro restantes por 60 días; en todos los casos la temperatura de incubación fue de 28 °C, con fotoperíodo de luz artificial-obscuridad 12:12 h. El inóculo se obtuvo con un sacabocado estéril de 5 mm de diámetro y consistió en 10 cortes circulares del micelio del hongo 101, cultivado previamente en PDA durante 15 días. Una vez obtenidos los cultivos, se verificó su pureza mediante el análisis de preparaciones microscópicas. Posteriormente, el medio de cultivo se separó del micelio mediante una filtración simple utilizando gasa y se procedió a preparar los extractos orgánicos de los cultivos (Macías-Rubalcava *et al.*, 2008).

7.6. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS ORGÁNICOS

El micelio húmedo obtenido a partir de 4 de los matraces Fernbach incubados durante 30 días, se sometió a un proceso de maceración con acetato de etilo (AcOEt) y los 4 matraces restantes se maceraron con diclorometano (CH₂Cl₂), realizándose en cada caso cinco extracciones con 2.0 L de disolvente, dejando entre cada extracción un periodo de tres días. Por otra parte, los 4 matraces Fernbach incubados durante un periodo de 60 días se sometieron a un proceso de maceración con AcOEt. Al término de la maceración, los extractos se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío. Posteriormente, se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCF) y se combinaron aquéllos que mostraron características similares.

Por otra parte, los extractos del medio de cultivo se obtuvieron mediante particiones sucesivas, empleando CH₂Cl₂ y AcOEt como disolventes de extracción. La fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío. El análisis por CCF de los extractos orgánicos permitió agruparlos según su similitud.

7.7. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

7.7.1. Determinación del potencial antimicrobiano

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico o antioomiceto de los extractos orgánicos, fracciones primarias y compuestos puros del hongo endófito 101, se realizó mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento radial de los microorganismos fitopatógenos de prueba utilizando el método de dilución en agar.

Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro. Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en metanol (~100-500 μ L) y se prepararon disoluciones en PDA (1%) a 100 μ g/mL para los extractos y fracciones, y a 1 y 10 μ M para los compuestos puros. En cada caja de Petri se colocaron 5 mL de la disolución, se dejaron solidificar (\approx 40 °C) y enseguida se colocó en el centro un inóculo de 5 mm de diámetro del microorganismo de prueba, previamente incubado en PDA por 8 días. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. Las cajas de Petri se incubaron de 1 a 5 días, dependiendo del microorganismo de prueba (1 día para *Pythium aphanidermatum*; 4 días para *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora parasitica*; 3 días para los microorganismos restantes), a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h con luz artificial. Como controles negativos se utilizaron PDA (1%) y PDA 1(%)-metanol (~100-500 μ L), y como control positivo se utilizó el fungicida comercial Ridomil Gold 4E® (metalaxil-m). Al final del bioensayo se tomaron dos medidas perpendiculares del diámetro del micelio de cada repetición y de cada especie de microorganismo de prueba. Los promedios se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha = 0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD (utilizando el programa STATISTICA versión 6.0) [Mead *et al.*, 2002; Macías-Rubalcava *et al.*, 2008].

7.7.2. Determinación del potencial citotóxico

La evaluación del potencial citotóxico de los compuestos aislados del hongo endófito 101 se efectuó sobre seis líneas celulares cancerosas de humano: glía de sistema nervioso

central (U25), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU), evaluados a una concentración de 50 µg/mL. Este bioensayo se realizó en el laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, por la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan, siguiendo el protocolo descrito por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica.

7.7.3. Determinación de la toxicidad

La determinación de la toxicidad preliminar de los compuestos activos del hongo endófito 101 se realizó sobre la viabilidad celular de macrófagos murinos (MTT), en el laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, UNAM, por la M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan.

7.8. MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS ACTIVOS DEL ENDÓFITO 101

El monitoreo de la producción de los principales metabolitos secundarios producidos por el endófito 101, se realizó verificando la producción de cada uno de ellos en cultivos sólidos y líquidos, incubados por diferentes periodos, utilizando en ambos casos cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

7.8.1. Cultivos en medio sólido

En primer lugar, se realizaron cultivos en PDA empleando cuatro cajas de Petri de 15 cm de diámetro por cada periodo de incubación. El inóculo consistió en un corte del micelio de 5 mm de diámetro del endófito 101, incubado previamente en PDA por 15 días. Las cajas de Petri se incubaron en periodos de 20, 30 y 40 días a 28 °C con fotoperiodo luz-oscuridad 12:12 h con luz artificial. Al término del periodo de incubación, las placas se procesaron el mismo día de la siguiente manera: el micelio obtenido se cortó en pequeños segmentos y se fragmentó mecánicamente con una varilla de vidrio. A continuación, se maceró con 25 mL de CH₂Cl₂ por 4 horas. Una alícuota de 1 mL del extracto crudo se dejó evaporar a temperatura ambiente y se reconstituyó con acetonitrilo (MeCN) y una vez

filtrado (Acrodisco 4 μm), se analizó su perfil cromatográfico por CLAR. El sistema de elución consistió en un gradiente que comenzó con MeCN:H₂O 25:75 hasta 50:50 en 5 min; luego hasta 65:35 a los 30 min y, por último, hasta MeCN 100% a 35 min y manteniéndolo hasta 40 min. La velocidad del flujo fue de 1 mL/min. Se utilizó una columna de fase reversa C₁₈ (Atlantis) con un tamaño de partícula de 5 μm , longitud de 150 mm y diámetro interno de 4.6 mm, operada a temperatura ambiente. Los compuestos fueron detectados midiendo la absorbencia a una longitud de onda de 272 y 365 nm.

Posteriormente, cada micelio fue sometido a sucesivas maceraciones con CH₂Cl₂ hasta agotar los componentes solubles y se prepararon los extractos orgánicos de manera habitual.

7.8.2. Cultivo en medio líquido

Para obtener el perfil cromatográfico de los extractos orgánicos obtenidos a partir de cultivos líquidos se utilizaron los extractos derivados de los cultivos en mediana escala en CPD incubados por 30 y 60 días. Para efectuar el análisis se tomó una muestra de 10 mg y se disolvió en 1 mL de MeCN, se filtró y se analizó por CLAR, utilizando una columna de fase reversa C₁₈ (Atlantis) con un tamaño de partícula de 5 μm , longitud de 150 mm y diámetro interno de 4.6 mm, operada a temperatura ambiente y como sistema de elución isocrático una mezcla de MeCN:H₂O (70:30). Los compuestos fueron detectados midiendo la absorbencia a una longitud de onda de 272 y 365 nm.

7.9. FRACCIONAMIENTO QUÍMICO

7.9.1. Métodos cromatográficos generales

Las fracciones primarias XI y XII del cultivo en mediana escala (32 L) derivadas del extracto del micelio del hongo endófito 101 (Murià 2007), se sometieron a un fraccionamiento secundario mediante cromatografía de adsorción en columna abierta, empleando como adsorbente gel de sílice (Sílica gel G-60 Merck, gránulos de 0.2-0.5 mm, malla 70-230). Los

análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice (Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck de 0.25 mm de espesor), varios sistemas de eluyentes (Hexano-CH₂Cl₂, Hexano-CH₃COCH₃, CH₂Cl₂, y CH₂Cl₂-CH₃OH, en diversas proporciones) y como agente cromógeno, se empleó una disolución de ácido sulfúrico al 10% (para obtener el desarrollo del color fue necesario calentar cada cromatoplaça por dos minutos aproximadamente a 110 °C) [Dzido y Tuzimski, 2008]. La cromatografía preparativa en capa delgada se realizó empleando placas de vidrio cubiertas con gel de sílice 60 GF₂₅₄ Merck de 20 x 20 cm y de 0.25 mm de espesor, aplicando en cada cromatoplaça aproximadamente 10 mg de muestra. La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se efectuó en un equipo Waters (Aliance) 2695 con un detector de rearreglo de diodos. En todos los análisis se utilizó una columna analítica de fase reversa C₁₈ (Atlantis) con un tamaño de partícula de 5 µm, longitud de 150 mm y diámetro interno de 4.6 mm, operada a temperatura ambiente y la velocidad del flujo fue de 1mL/min. El sistema de elución consistió en el gradiente indicado en el inciso **6.8.1**. En tanto que el fraccionamiento de la fracción primaria activa XII se efectuó en una columna semi-preparativa de fase reversa C₁₈ (Clipeus) con un tamaño de partícula de 5µm, longitud de 150 mm y diámetro interno de 10 mm con el sistema de elución indicado en el inciso **6.8.1** y un flujo de 5 mL/min. Los compuestos fueron detectados midiendo la absorbencia a una longitud de onda de 272 y 365 nm.

7.9.2. Separación y purificación de los metabolitos secundarios

7.9.2.1 Obtención de las cremoxantonas A y B (121 y 122)

La fracción primaria activa XI (2.8 g), obtenida con CH₂Cl₂:MeOH (9:1), se sometió a un fraccionamiento secundario mediante una cromatografía en columna abierta utilizando 456 g de gel de sílice. El proceso de elución se efectuó con hexano, CH₂Cl₂ y MeOH en diferentes proporciones. Se obtuvieron 162 fracciones de 200 mL cada una, reuniéndose las que resultaron cromatográficamente similares, para generar 11 grupos de fracciones secundarias (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria activa XI.

Fracciones	Eluyente/(proporción)	Fracciones reunidas	Clave
1-6	Hex-CH ₂ Cl ₂ (9:1)	1-7	XI-i
7-45	Hex-CH ₂ Cl ₂ (8:2)	8-17	XI-ii
		18-21	XI-iii
46-58	Hex-CH ₂ Cl ₂ (7:3)	22-67	XI-iv
59-74	Hex-CH ₂ Cl ₂ (1:1)	68-73	XI-v
75-88	Hex-CH ₂ Cl ₂ (2:8)	74-78	XI-vi
		79-97	XI-vii
89-119	CH ₂ Cl ₂	98-118	XI-viii
120-125	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (99:01)	119-128	XI-ix
126-131	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (97:03)	129-136	XI-x
132-140	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (95:05)	137-162	XI-xi
	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (90:10)		
141-149	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (90:10)		
150-156	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (80:20)		
157-161	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (70:30)		
162	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (50:50)		

El análisis por cromatografía en capa fina de la fracción XI-vi (484 mg) mostró estar constituida por dos compuestos mayoritarios. Por lo cual fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta, empleando 114 g de gel de sílice, obteniéndose 49 fracciones de 100 mL. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron para generar 12 fracciones terciarias. En el Cuadro 4 se resumen los sistemas de elución empleados y las fracciones combinadas.

De la fracción terciaria vi-f (69 mg) precipitó de manera espontánea un sólido amorfo de color amarillo, el cual se purificó mediante un proceso de recristalización con CH₂Cl₂-hexano (99:1). Como resultado de este proceso se obtuvieron 40 mg de cremoxantona B (**122**) [Isaka *et al.*, 2009].

Cuadro 4. Fraccionamiento terciario de la fracción secundaria XI-vi.

Fracciones	Eluyente/(proporción)	Clave
1-2	Hexano (100)	vi-a
3-7	Hex-CH ₂ Cl ₂ (9:1)	vi-b
8-10	Hex-CH ₂ Cl ₂ (8:2)	vi-c
11-13	Hex-CH ₂ Cl ₂ (7:3)	vi-d
14-16	Hex-CH ₂ Cl ₂ (6:4)	vi-e
17-25	Hex-CH ₂ Cl ₂ (5:5)	vi-f
26-36	Hex-CH ₂ Cl ₂ (4:6)	vi-g
37-40	Hex-CH ₂ Cl ₂ (3:7)	vi-h
41-43	Hex-CH ₂ Cl ₂ (2:8)	vi-i
44-45	CH ₂ Cl ₂ (100)	vi-j
46-47	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)	vi-k
48-49	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (5:5)	vi-l

El análisis por cromatografía en capa fina de la fracción vi-g (50 mg) mostró que estaba constituida por dos componentes mayoritarios. La separación de los productos naturales se realizó mediante una cromatografía preparativa en capa delgada (CCFP), utilizando CH₂Cl₂-MeOH (95:5) como eluyente. Las cromatoplasas se procesaron de manera habitual, obteniéndose 10 mg de acremoxantona A (**121**) en forma de un sólido cristalino de color amarillo claro, soluble en CH₂Cl₂. Por otra parte, se obtuvieron 21 mg adicionales del acremoxantona B (**122**) [Isaka *et al.*, 2009].

De la fracción terciaria XI-ix (123 mg) precipitó un sólido cristalino de color amarillo con forma de agujas finas que se purificó mediante sucesivas recristalizaciones con CH₂Cl₂:Hex (9:1). Como resultado del procedimiento anterior, se obtuvieron 15 mg de acremoxantona A (**121**).

7.9.2.2. Obtención de los compuestos xantoquinodina J (**120**), desacetil xantoquinodina J (**123**) y acremonidinas A y B (**124** y **125**)

La fracción primaria activa XII (250 mg) se sometió a un fraccionamiento secundario por CLAR, utilizando las condiciones cromatográficas y el sistema de elución señalado en el inciso **5.8.1**. Después de procesar las fracciones de manera habitual se obtuvieron 75 mg de xantoquinodina J (**120**) [26.64 min] (Murià 2007); 15 mg del nuevo producto natural, la desacetil xantoquinodina J (**123**) [16.25 min]; 45 mg de acremonidina A (**124**) [19.45 min] (He, *et al.*, 2003) y 23 mg de la acremonidina B (**125**) [10.60 min] (He, *et al.*, 2003). Además, se obtuvieron 6 y 12 mg adicionales de las acremoxantonas A [27.83 min] y B [20.27 min], respectivamente (Isaka *et al.*, 2009).

7.9.3. Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas de los metabolitos secundarios

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y se describen sin corregir. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- ^1H) y de carbono-13 (RMN- ^{13}C) se generaron en un aparato Varian UNITY PLUS 500, el cual se operó a una frecuencia de 500 MHz y de 125 MHz, respectivamente. Los espectros se registraron en CDCl_3 o $\text{DMSO}-d_6$, los desplazamientos químicos (δ) se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) empleado como referencia interna. Los espectros en el ultravioleta-visible (UV) se obtuvieron en el detector de arreglo de diodos Waters (Alliance) 2695 del cromatógrafo de líquidos, en $\text{MeCN}-\text{H}_2\text{O}$ (50:50). Los espectros en el infrarrojo (IR) se registraron en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, en pastilla de KBr y en película. Los espectros de masas se registraron en un aparato JEOL JMS-AX505 HA mediante introducción directa a 70 eV.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló con la finalidad de caracterizar taxonómicamente al hongo endófito 101 aislado de hojas sanas de *Bursera simaruba*, así como estudiar el potencial antioomiceto de los metabolitos secundarios que produce, con el propósito de contribuir en la búsqueda de nuevos agentes agroquímicos alternativos útiles en el control de oomicetos fitopatógenos con importancia económica para el país. Los resultados obtenidos se dividen en cinco partes. La primera corresponde al proceso de caracterización macro y microscópica del hongo endófito 101 dentro del género *Acremonium* sp. La segunda comprende la obtención de cultivos en mediana escala de *Acremonium* sp., y la evaluación cuantitativa del potencial antifúngico y antioomiceto de los extractos orgánicos del micelio, sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos con importancia económica. La tercera parte se refiere al aislamiento y caracterización de los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica demostrada por el extracto orgánico y fracciones primarias del micelio. La cuarta parte comprende el análisis detallado de la producción de metabolitos secundarios activos producidos por *Acremonium* sp., por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), en cultivos sólidos y líquidos incubados por diferentes periodos. Por último, la quinta parte se enfoca en la evaluación biológica de los compuestos puros mediante la determinación de su efecto sobre el crecimiento de oomicetos fitopatógenos, así como a la determinación de su actividad citotóxica y la correlación con el potencial antioomiceto demostrado.

8.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL ENDÓFITO 101

La identificación taxonómica del hongo endófito 101, aislado de las hojas sanas de *Bursera simaruba*, se realizó utilizando tanto cultivos en placa como microcultivos, empleando como medios de crecimiento papa-dextrosa-agar (PDA) y avena agar (AA) (Koneman, 1987). A continuación se describen las características macroscópicas y microscópicas más importantes para su caracterización taxonómica.

El hongo endófito 101 forma micelio aéreo aterciopelado y plegado, de crecimiento muy lento. En la parte superior es de color blanco, y produce exudado hialino con la edad (Figura 3A). En la parte posterior, el micelio es de color amarillo intenso (Figura 3B). Su crecimiento es radial y los bordes del cultivo son ligeramente lobulados.



Figura 3. Hongo endófito *Acremonium* sp. (endófito 101) aislado de *Bursera simaruba* en cultivo en papa-dextrosa-agar a los 15 días de crecimiento. A: anverso, B: reverso de la colonia.

Las observaciones al microscopio de las preparaciones frescas del endófito 101 cultivado en placas y en microcultivos muestran la presencia de conidias arriñonadas ($1.8 \times 3.6 \mu\text{m}$) agrupadas en forma de cabezas viscosas que surgen sobre fiálides solitarias ($1.7 \times 34.4 \mu\text{m}$). Estas observaciones permiten clasificar claramente al hongo endófito 101 dentro del género *Acremonium* (Figura 4) [Onions y Brady, 1987; Glenn *et al.*, 1996]. Sin embargo, la descripción taxonómica hasta especie requiere de la aplicación de técnicas moleculares ya que el género *Acremonium* agrupa una gran cantidad de especies anamorfas (de reproducción asexual) cuyos teleomórfos (con reproducción sexual) están clasificados dentro de tres grandes grupos de ascomicetos; *Hypocreales*, *Plectosphaerellales* y *Sordariales* (Summerbell *et al.*, 2011).

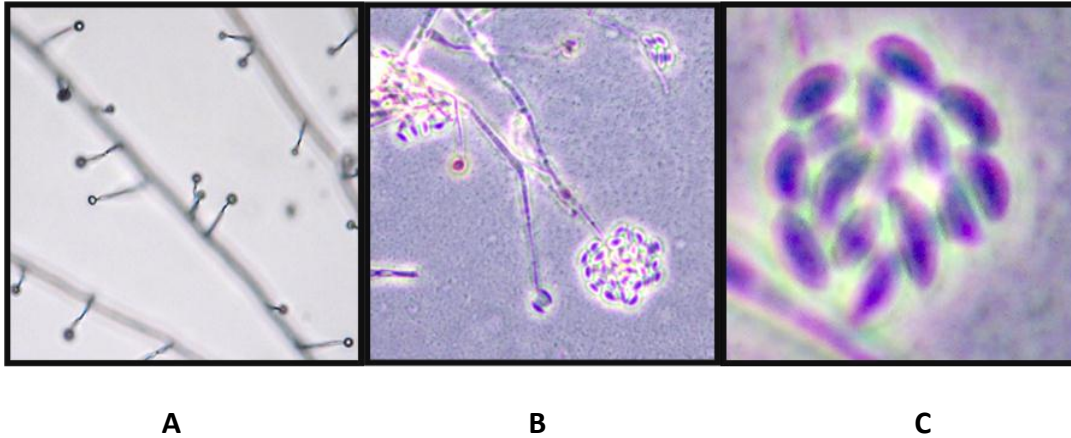


Figura 4. Conidióforos de *Acremonium* sp. en PDA. A: Conidióforos en 40 x, B: Conidióforo a 100 x, y C: conidias agrupadas teñidas con rojo congo (ampliación).

La mayoría de hongos tipo *Acremonium* aislados como endófitos pertenecen a la familia Clavicipitaceae y corresponden a los anamorfos de *Epichloë* que han sido recientemente denominados como *Neotyphodium*. Estos microorganismos generalmente, colonizan gramíneas (monocotiledóneas).

Es importante mencionar que únicamente cuatro hongos endófitos tipo *Acremonium* han sido aislados de plantas dicotiledóneas. El primero de ellos, denominado *Acremonium* sp. (secc. Chaetomioidea), fue aislado de la corteza de *Taxus baccata* y fue clasificado con base en sus características morfológicas; sin embargo, se desconoce su especie teleomórfica (Strobel *et al.*, 1997). El segundo, corresponde a un endófito de *Vitis vinifera* y además micoparásito de *Plasmopara viticola*, denominado *Acremonium byssoides* (Burruano *et al.*, 2008), este hongo fue recientemente reclasificado dentro de la familia Clavicipitaceae como *Simplicium lanosoniveum* (Summerbell *et al.*, 2011). Adicionalmente, existen dos aislamientos de endófitos tipo *Acremonium* de la planta trepadora *Trachelospermum jasminoides*, el primero de ellos clasificado como *Cephalosporium acremonium* U43971 (Zhang *et al.*, 2008b) y el segundo como *Cephalosporium* sp. IFB-E001 (Song *et al.*, 2005). De ambos aislamientos se desconoce la especie teleomórfica.

El hongo endófito *Acremonium* sp. caracterizado en el presente estudio representa el quinto aislamiento tipo *Acremonium* en plantas dicotiledóneas.

8.2. CULTIVOS EN MEDIANA ESCALA

Acremonium sp. se cultivó en mediana escala obteniéndose tres cultivos en condiciones estáticas empleando como medio de fermentación caldo-papa-dextrosa y dos diferentes tiempos de incubación (30 y 60 días) y dos distintos disolventes de extracción (CH_2Cl_2 y AcOEt). En el Cuadro 5 se resumen los rendimientos obtenidos para cada uno de los cultivos. El extracto orgánico del micelio de *Acremonium* sp., fue mucho más abundante que el del medio de cultivo, independientemente del periodo de incubación y del disolvente de extracción. El extracto del micelio generado a partir del cultivo de 30 días extraído con CH_2Cl_2 fue el más abundante, sin embargo, estaba constituido por dos fases de similar abundancia, una sólida y otra oleosa, las cuales se separaron por decantación. Por su parte, los extractos orgánicos obtenidos con AcOEt presentan características semisólidas, es decir, muestran una menor cantidad de aceites por lo que el extracto de 60 días se obtuvo únicamente con acetato de etilo.

Cuadro 5. Rendimiento de los extractos orgánicos del medio de cultivo y micelio de *Acremonium* sp. obtenidos en cultivos en mediana escala.

Extracto	Rendimiento (mg/L)		
	30 días CH_2Cl_2	30 días AcOEt	60 días
Micelio	461 _{sólido} + 590 _{aceite}	310	587
Medio	20	17	15

8.2.1. Determinación cuantitativa del potencial antioomiceto de los extracto del micelio de *Acremonium* sp.

La evaluación cuantitativa de la actividad antioomiceto de los tres extractos orgánicos del micelio de *Acremonium* sp., derivados de los cultivos en mediana escala, se efectuó

mediante la determinación de su efecto sobre el crecimiento de dos oomicetos fitopatógenos (*Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasítica*) y de un hongo verdadero (*Fusarium oxysporum*). Los resultados de este bioensayo preliminar permitieron corroborar que los extractos inhiben significativamente el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos, reduciendo de manera general el crecimiento en un 50% a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte, el crecimiento del hongo verdadero no es inhibido significativamente por los extractos evaluados (Figura 5).

Cabe mencionar que la fase oleosa no se evaluó debido a que en el estudio previo realizado en nuestro grupo de trabajo no demostró actividad antimicrobiana significativa.

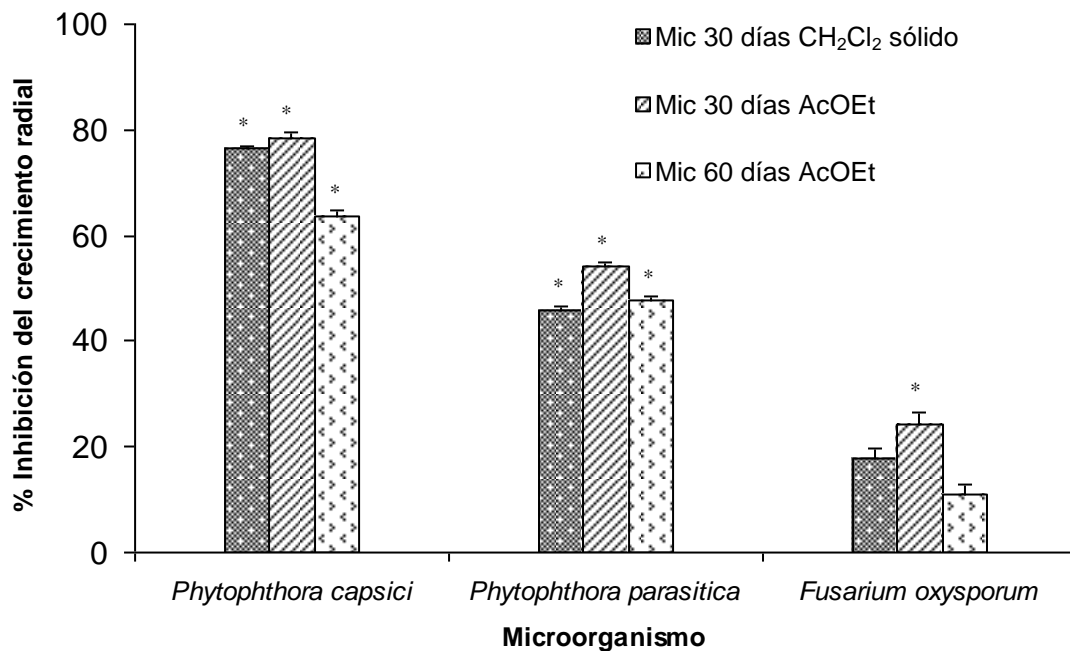


Figura 5. Efecto de los extractos orgánicos del micelio de *Acremonium* sp. evaluados a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sobre el crecimiento de un hongo verdadero (*Fusarium oxysporum*) y dos oomicetos fitopatógenos (*Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasítica*). * $n=4$ $p<0.05$

Con el fin de corroborar su selectividad biológica y considerando el alto rendimiento de la fase sólida del extracto orgánico del micelio de *Acremonium* sp. derivado del cultivo con 30 días de fermentación y utilizando como disolvente de extracción CH₂Cl₂, se decidió evaluar la actividad antioomiceto sobre especies representantes de los dos principales

grupos de oomicetos fitopatógenos: *Pythium* y *Phytophthora*. Por otra parte, con la finalidad de conocer el potencial de los componentes del extracto del micelio sobre el control de estos microorganismos, se evaluó paralelamente la actividad del Ridomil Gold 4E® (metalaxil), que es el agente químico de elección para tratar las enfermedades ocasionadas por oomicetos fitopatógenos. Adicionalmente, se evaluó la actividad antifúngica del extracto sobre dos hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* y *Pestalotiopsis* sp.

Los microorganismos de prueba seleccionados fueron cuatro especies fitopatógenas de *Pythium* y cinco de *Phytophthora*. Las especies más sensibles al extracto orgánico del micelio de *Acremonium* sp. fueron; *Pythium aphanidermatum* (concentración inhibitoria media, $CI_{50}=36.7 \mu\text{g/mL}$), *Pythium ultimum* ($CI_{50}=166.1 \mu\text{g/mL}$), *Phytophthora capsici* ($CI_{50}=52.4 \mu\text{g/mL}$), *Phytophthora cinnamomi* ($CI_{50}=54.3 \mu\text{g/mL}$), *Phytophthora parasitica* ($CI_{50}=117.9 \mu\text{g/mL}$) y *Phytophthora cactorum* ($CI_{50}=182.2 \mu\text{g/mL}$).

A pesar de que el metalaxil es considerado como un agroquímico específico para el control de oomicetos fitopatógenos, cuatro de los nueve oomicetos evaluados presentan resistencia a este compuesto. *Pythium debaryanum*, *Pythium polytylum*, *Phytophthora cactorum* y *Phytophthora palmivora* mostraron una CI_{50} con metalaxil superior a la calculada para los hongos verdaderos (Cuadro 6). En este sentido, se ha reportado que los oomicetos poseen una gran plasticidad genética que les permite desarrollar mecanismos de resistencia contra algunos fungicidas comerciales (Gisi *et al.*, 2000). Desafortunadamente, las especies de oomicetos evaluados que son resistentes al metalaxil también lo son al extracto de *Acremonium* sp. (Cuadro 6).

Se sabe que uno de los mecanismos mediante el cual los oomicetos desarrollan resistencia al metalaxil, es la modificación del sitio de acción de este agroquímico, el cual actúa inhibiendo la RNA polimerasa tipo II (Davidse *et al.*, 1988). Por otra parte, se ha determinado que la mutagénesis inducida por radiación UV o mutágenos químicos transforma variantes sensibles al metalaxil a resistentes. Sin embargo, los reportes de resistencia cruzada con otros fungicidas con modos de acción distintos y estructuralmente

no relacionados, como el propamocarb, el foltep, y el fosetil-Al (Cohen y Samoucha, 1984), no permiten establecer que la resistencia cruzada observada entre el extracto derivado del micelio *Acremonium* sp. y metalaxil pueda asociarse a una similitud en el mecanismo de acción.

Cuadro 6. Evaluación del efecto antifúngico y antioomiceto del extracto orgánico del micelio (fase sólida) del hongo endófito *Acremonium* sp., sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos de importancia económica.

Microorganismo	CI ₅₀ (µg/mL)	
	Extracto del micelio	Metalaxil
<i>Pythium ultimum</i> ^b	166.1	296.9
<i>Pythium debaryanum</i> ^b	371.0	531.0
<i>Pythium polytylum</i> ^b	363.2	513.7
<i>Pythium aphanidermatum</i> ^a	36.7	0.05
<i>Phytophthora cactorum</i> ^b	182.2	502.6
<i>Phytophthora cinnamomi</i> ^b	54.3	8.1
<i>Phytophthora palmivora</i> ^b	263.6	494.6
<i>Phytophthora capsici</i> ^b	52.4	0.28
<i>Phytophthora parasitica</i> ^c	117.9	0.07
<i>Fusarium oxysporum</i> ^c	420.0	339.9
<i>Pestalotiopsis</i> sp. ^b	438.6	105.0

^a Calculada a un día de crecimiento; ^b Calculada a tres días de crecimiento; ^c Calculada a cuatro días de crecimiento

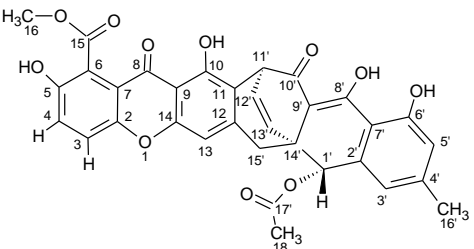
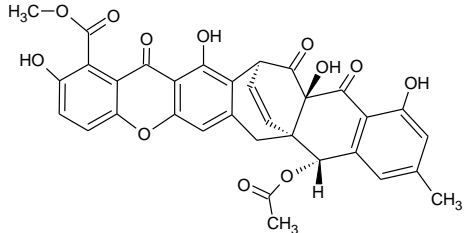
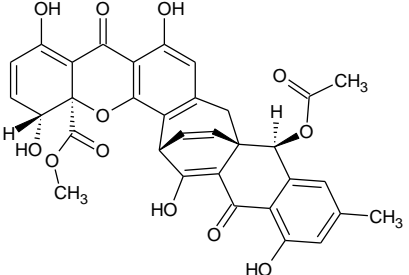
8.3. AISLAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES PRIMARIAS ACTIVAS DEL EXTRACTO DE MICELIO DE *Acremonium* sp.

La fracción primaria activa XI, por su abundancia (5.06 g) y actividad inhibitoria significativa sobre el crecimiento de *Phytophthora capsici*, constituyó un candidato adecuado para la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antioomiceto. El fraccionamiento químico utilizando diversos procedimientos cromatográficos (CC y CCFP), permitió el aislamiento y purificaron de dos metabolitos secundarios; las acremoxantonas A y B (**121** y **122**) [Isaka *et al.*, 2009].

Por otra parte, el análisis mediante cromatografía en capa fina de las aguas madres de la fracción activa XII mostró que se trataba de una mezcla compleja de metabolitos

secundarios. La separación de los productos naturales se realizó mediante CLAR y permitió la purificación de seis policétidos heterodiméricos, incluyendo un derivado novedoso de xantoquinodina: la desacetil xantoquinodina J (**123**), y cinco compuestos conocidos: la xantoquinodina J (**120**) [Murià 2007], las acremonidinas A y B (**124** y **125**) [He *et al.*, 2003], así como cantidades adicionales de las acremoxantonas A y B (**121** y **122**). En el Cuadro 7 se muestran las estructuras de los compuestos aislados, su rendimiento y las fracciones cromatográficas de donde se aislaron.

Cuadro 7. Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito *Acremonium* sp.

Metabolito secundario	Rendimiento (mg/L)	Fracción primaria
 <p>Acremoxantona A (121)</p>	0.96	XI, XII XI-ix
 <p>Acremoxantona B (122)</p>	2.28	XI, XII vi-f
 <p>Xantoquinodina J (120)</p>	2.34	XII

Cuadro 7. Metabolitos secundarios aislados a partir del hongo endófito *Acremonium* sp. (continuación).

Metabolito secundario	Rendimiento (mg/L)	Fracción primaria
<p>Desacetilxantoquinodina J (123)</p>	0.47	XII
<p>Acremonidina A (124)</p>	1.40	XII
<p>Acremonidina B (125)</p>	0.72	XII

8.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS FRACCIONES ACTIVAS

Los seis metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias XI y XII presentan como característica estructural un biciclo(3,2,2)nonano formado por una subunidad de origen policétido; que corresponde a una hidroxantona en las xantoquinodinas (I), una benzofenona, en las acremonidinas (II) o una xantona en las cremoxantonas (III), fusionado con una subunidad oxantrona (IV) [Figura 6].

Los distintos heterodímeros de octacétidos fusionados por un biciclo(3,2,2)nonano reportados en la literatura, presentan dos posibles tipos de arreglo entre ambas subunidades, los cuales han sido denominados como tipo “*orto*” o “*para*” en analogía con la sustitución sobre un anillo aromático. Por ejemplo, en la estructura de la xantoquinodina B1, en el anillo **C** el protón aromático está en posición orto al hidróxilo fenólico y el anillo **D** queda en una posición tipo para. Mientras que en la estructura de la xantoquinodina A1 el protón aromático se encuentra en posición para al hidroxilo fenólico sobre el anillo **C** y el anillo **D** queda entonces en una posición “*orto*” (Figura 7).

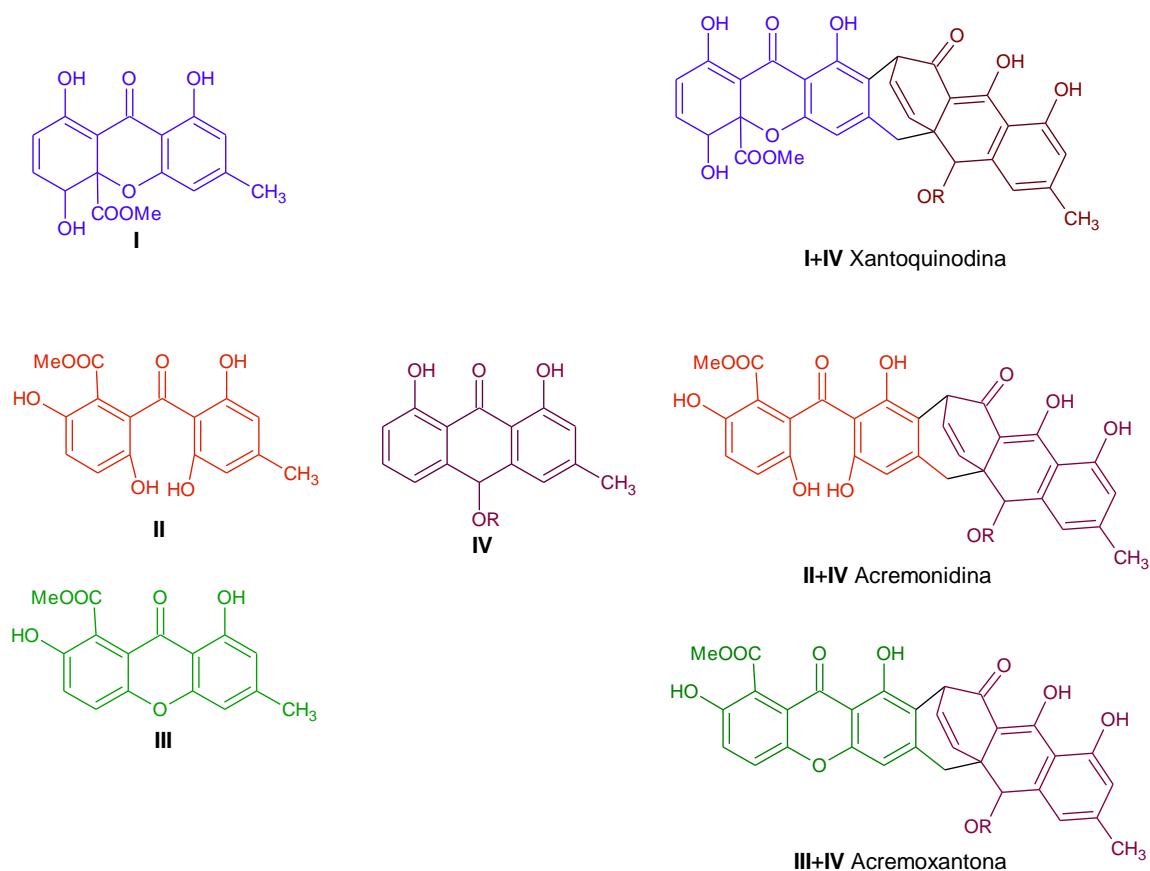


Figura 6. Estructura de los distintos monómeros (subunidades) que componen la estructura de los policétidos heterodiméricos; xantoquinodinas, acremonidinas y acremoxantonas.

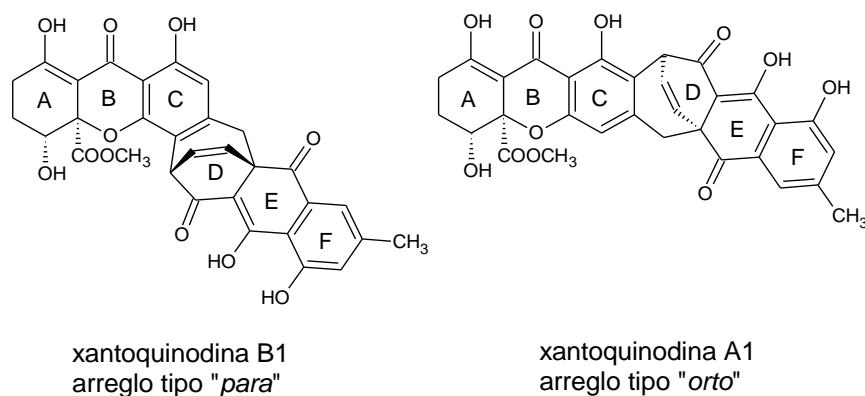


Figura 7. Diferencia estructural entre las xantoquinodinas *orto* y *para* (modificado de Tabata *et al.*, 1993).

De acuerdo con las evidencias obtenidas en los espectros bidimensionales (HMQC, HMBC, COSY y NOESY) Murià (2007) estableció que la xantoquinodina J (**120**) presenta un arreglo tipo "*para*" entre la subunidad de hidroxantona y la de oxantrona. Adicionalmente, esta observación fue confirmada mediante un análisis de difracción de rayos X.

Por analogía estructural con la xantoquinodina J (**120**) podría presumirse que las acremoxantonas **121** y **122** producidas el endófito *Acremonium* sp. presentan el mismo arreglo estructural tipo *orto*. Para poder discernir entre los dos posibles arreglos de las acremoxantonas A y B (**121** y **122**) se realizó el análisis detallado de sus espectros de RMN de una y dos dimensiones. A continuación se discuten en detalle las características principales de sus espectros.

8.4.1. Caracterización de las acremoxantonas A y B (**121** y **122**)

Las acremoxantonas A (**121**) y B (**122**) se obtuvieron de la fracción activa XI como un sólido cristalino con forma de agujas finas (**121**) y otro amorfo (**122**), ambos de color amarillo, solubles en CH₂Cl₂. En el Cuadro 8 se muestran sus constantes espectroscópicas y espectrométricas.

Sus espectros de ultravioleta muestran máximos de absorción en 362, 303, 271 y 329 nm que permiten proponer la presencia de grupos cromóforos con un patrón de conjugación extendido para **121** y un grupo cromóforo distinto con un máximo de absorción en 272 nm para **122**. Los espectros de masas permiten observar iones moleculares con relaciones masa/carga de 596 para la cremoxantona A (**121**) y de 612 para la cremoxantona B (**122**), permitiendo establecer las fórmulas moleculares de $C_{33}H_{24}O_{11}$ y $C_{33}H_{24}O_{12}$, respectivamente. Estas fórmulas permiten calcular un índice de insaturación de veintidós para ambos compuestos. En el espectro en el IR se observan bandas de estiramiento O-H (ν_{\max} $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$), bandas de estiramiento C-H de alqueno (ν_{\max} $\sim 3000\text{ cm}^{-1}$), señales correspondientes al estiramiento C=O de éster y cetona (ν_{\max} $\sim 1637\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$), y bandas asociadas a la presencia de anillos aromáticos (ν_{\max} $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$).

Los espectros de RMN unidimensionales (^1H y ^{13}C) [Anexo; Espectros 1-4] y bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) permitieron asignar la estructura de los compuestos **121** y **122** como heterodímeros de xantona y oxantrona unidos por un biciclo(3,2,2)nonano (Isaka *et al.*, 2009). A continuación se detallan las características más relevantes de la elucidación estructural.

El espectro de RMN- ^1H de la cremoxantona A (**121**) muestra señales para dos grupos hidroxilo quelatados intercambiables con D_2O en δ_{H} 11.57 (OH-8') y δ_{H} 12.79 (OH-10); para cinco hidrógenos aromáticos, de los cuales tres se observan como señales simples en δ_{H} 6.48 (H-13), 6.80 (H-5') y 6.91 (H-3') mientras que las dos restantes en δ_{H} 7.34 (H-3) y 7.41 (H-4), se encuentran *orto* acopladas ($J=9.2$). En la región de alquenos se observan dos señales acopladas en δ_{H} 6.48 (dd, $J=6.6, 8.5$; H-12') y 6.11 (dd, $J=1.1, 8.5$; H-13'), con el protón vinílico en δ_{H} 4.93 (dd, $J=1.1, 6.6$; H-11'); además una señal simple en δ_{H} 6.00 (H-1'). A campo alto, se observan señales para un par de protones diastereotópicos en δ_{H} 2.80 y 2.93 ($J=18$; H-15'a y b), así como tres señales que integran para un grupo metil éster en δ_{H} 3.98, un grupo metilo sobre anillo aromático en δ_{H} 2.39 y para un metilo de grupo acetato en δ_{H} 2.01.

El espectro de RMN-¹³C de **121** muestra señales para de 33 átomos de carbono. A campo bajo se aprecia una señal para un carbonilo de cetona en δ_c 180.0 (C-8) y dos señales para los carbonos tautoméricos en δ_c 185.8 y 186.1 (C-8' y C-10'). En la región δ_c 160-170 se observan dos señales que corresponden a carbonos cuaternarios de éster en δ_c 169.00 (C-15) y 170.5 (C-17'). En tanto que en la región aromática (δ_c 100-160 ppm) se aprecian señales para 21 carbonos aromáticos o de alqueno, algunos por su desplazamiento, unidos a funciones oxigenadas. De acuerdo con el espectro DEPT, cinco corresponden a grupos metino aromáticos δ_c 109.8 (C-13), 119.4 (C-5'), 122.3 (C-3), 123.2 (C-3') y 125.7 (C-4), dos a metinos de alqueno δ_c 131.8 (C-12'), y 132.9 (C-13'), cinco señales más pertenecen a carbonos aromáticos unidos a funciones oxigenadas δ_c 150.7 (C-2), 152.7 (C-5), 154.0 (C-14), 157.8 (C-10) y 161.8 (C-6'). De los carbonos restantes, nueve corresponden a carbonos aromáticos cuaternarios (δ_c 105.2 (C-9'), 107.1 (C-9), 112.7 (C-7'), 113.4 (C-6), 117.4 (C-11), 118.4 (C-7), 136.4 (C-2'), 146.4 (C-12), 147.7 (C-4') y a un carbono alifático cuaternario en δ_c 41.6 (C-14'). Finalmente, a campo alto se aprecian la señal para un metino base de oxígeno en δ_c 73.0 (C-1'), un metileno en δ_c 35.2 (C-15'), un metino alifático en δ_c 37.4 (C-11'), así como señales para tres carbonos de metilo en δ_c 21.1 (C-18'), 22.1 (C-16') y 53.1 (C-16). Los datos espectrocópicos de RMN ¹H y ¹³C de los compuestos **121** y **122** se encuentran reportados en el Cuadro 9.

El análisis exhaustivo de los espectros bidimensionales de correlación heteronuclear y homonuclear permitieron ubicar los grupos funcionales evidenciados en los espectros de una dimensión en el esqueleto base de la molécula. Las observaciones más importantes se resumen a continuación.

El espectro HMBC del compuesto **121** muestra que las señales de los protones aromáticos orto acoplados en δ_H 7.34 y 7.41 (H-3 y H-4) presentan correlaciones con los carbonos aromáticos base de oxígeno en δ_c 150.7 (C-2) y 152.7 (C-5) y con los carbonos cuaternarios sp^2 en δ_c 113.4 (C-6) y 118.4 (C-7). De manera que los protones H-3 y H-4 forman parte de un anillo aromático tetrasustituido (Estructura A, Figura 8). El protón H-4 muestra correlaciones con C-5, a dos enlaces de distancia y con C-6 a tres enlaces. Mientras que para H-3 se observan correlaciones con C-2, a dos enlaces de distancia y con C-7 a tres

enlaces (Figura 8). Adicionalmente, las correlaciones observadas a cuatro enlaces de distancia de H-4 con el carbonilo del éster en δ_c 169.0 (C-15) y de H-3 con el carbonilo de la cetona en δ_c 180.0 (C-8) permiten proponer la ubicación del éster sobre C-6 y la cetona sobre C-7. Por otra parte, la señal simple para el metilo en δ_H 3.98 (H-16) presenta una correlación a tres enlaces con el carbonilo de éster C-15, atribuible a un metil éster (Estructura B).

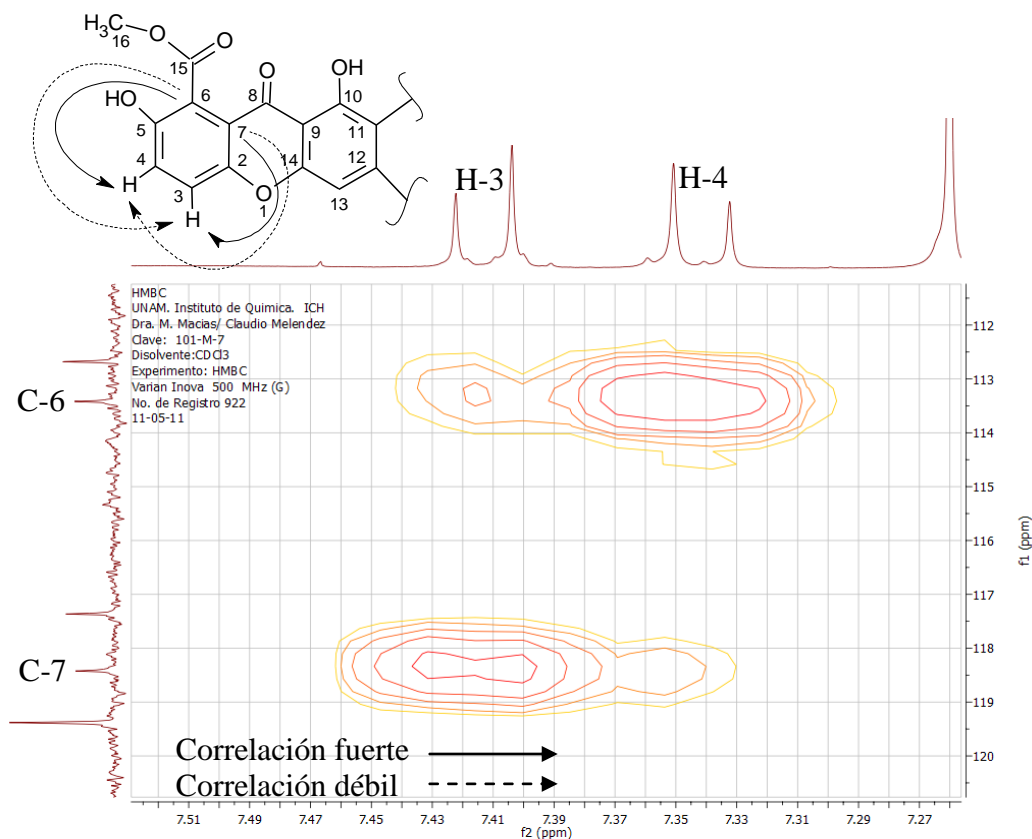
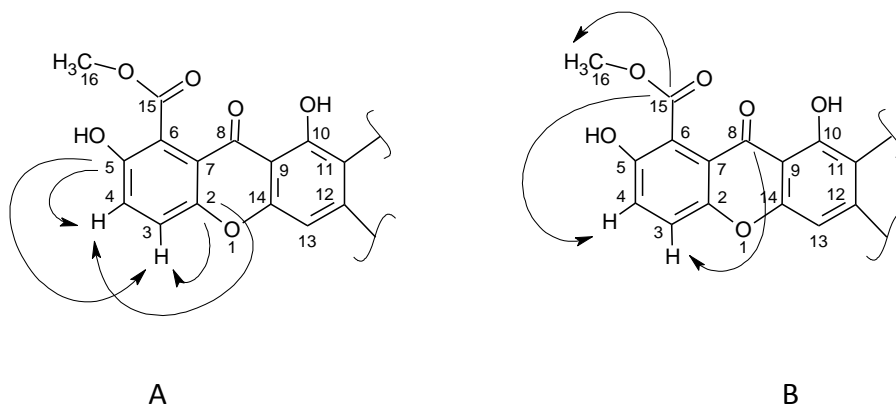
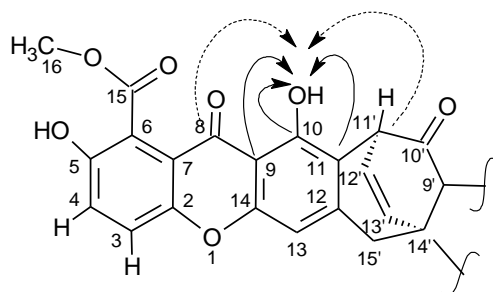


Figura 8. Correlaciones selectas. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **121**.

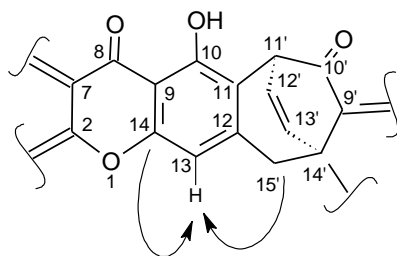


El protón quelatado en δ_H 12.79 correlaciona fuertemente con el carbono aromático base de oxígeno en δ_C 157.7 (C-10), con los carbonos aromáticos en δ_C 107.1 (C-9) y 117.4 (C-11); y débilmente con el carbono aromático en δ_C 146.4 (C-12), el carbonilo en δ_C 180.0 (C-8) y el carbono alifático en δ_C 37.6 (C-11'). Lo cual permite asignarlo como un grupo hidroxilo sobre el carbono C-10, quelatado con el carbonilo C-8 (Estructura C).

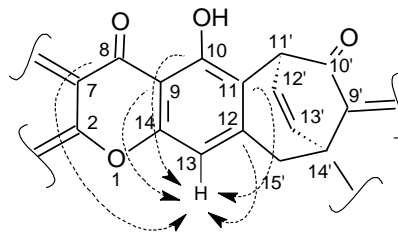


C

La señal simple del protón aromático en δ_H 6.48 (H-13) presenta una correlación acentuada con el carbono aromático base de oxígeno en δ_C 153.9 (C-14) y con el carbono alifático en δ_C 35.2 (C-15'); además se observan correlaciones débiles con los carbonos aromáticos en δ_C 107.1 (C-9), 117.4 (C-11), 146.4 (C-12), 157.7 (C-10), y con el carbonilo en δ_C 180.0 (C-8) (Estructuras D y E).

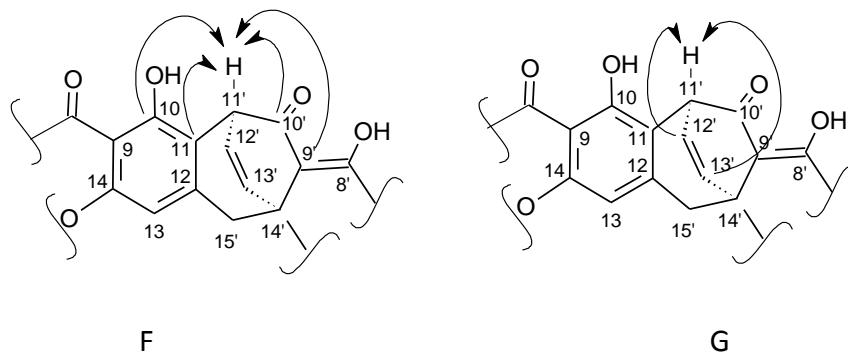


D

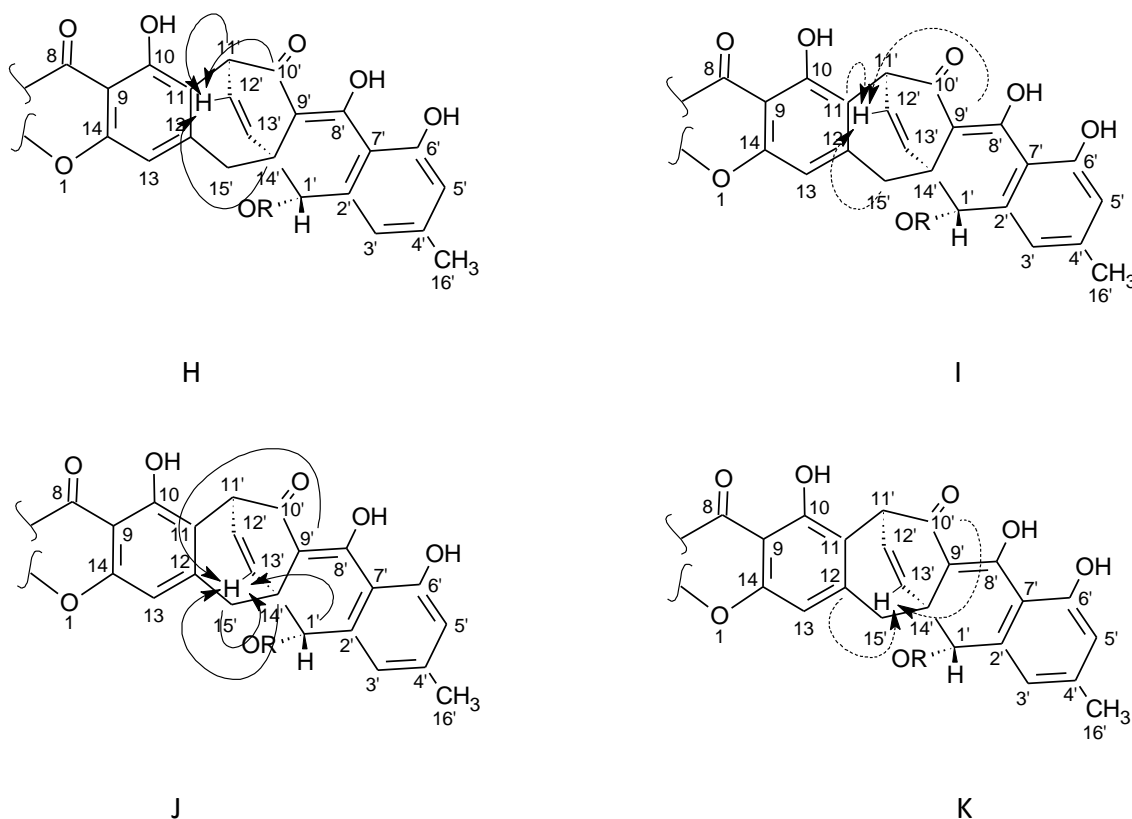


E

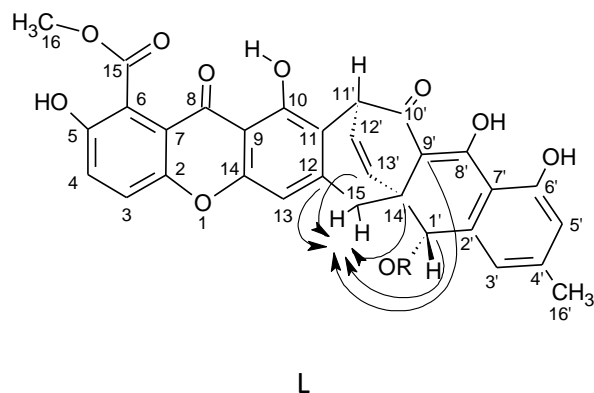
Por otra parte, la señal del hidrógeno alifático en δ_H 4.93 (dd, $J=1.1, 6.65$; H-11') correlaciona con el carbono de cetona en δ_C 186.1 (C-10'), con el carbono aromático base de oxígeno en δ_C 157.7 (C-10), con el carbono aromático cuaternario en δ_C 117.4 (C-11) y con los metinos de alqueno en δ_C 131.8 (C-12') y 132.9 (C-13'), así como con el carbono cuaternario de alqueno en δ_C 109.2 (C-9') [Estructuras F y G].



El protón de alqueno en δ_H 6.48 (dd, $J=6.60, 8.50$; H-12') presenta correlación fuerte con los carbonos en δ_C 41.6 (C-14'), 37.6 (C-11') y 186.1 (C-10'); y correlaciones débiles con los carbonos en δ_C 35.2 (C-15'), 105.2 (C-9') 132.9 (C-13'), y 117.4 (C-11) [Estructuras H e I]. Mientras que la señal en δ_H 6.11 (H-13') presenta correlaciones fuertes con los carbonos en δ_C 105.2 (C-9'), 73.0 (C-1'), 41.6 (C-14'), 35.2 (C-15') y 37.6 (C-11'); y correlaciones débiles con los carbonos en δ_C 186.1 (C-10'), 146.4 (C-12) y 131.8 (C-12') [Estructuras J y K].

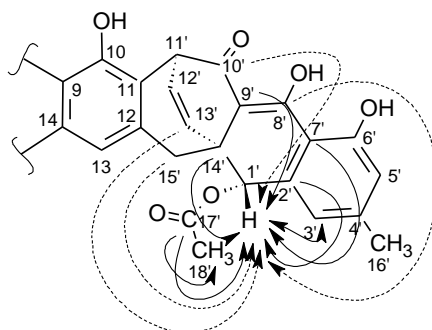


Por otra parte, los protones diasterotópicos en δ_H 2.93 y 2.80 ($J=18$; H-15'a y b) muestran correlaciones con los carbonos en δ_C 41.6 (C-14'), 105.2 (C-9'), 146.4 (C-12), 73.0 (C-1'), 117.4 (C-11) y 132.9 (C-13') (Estructura L).

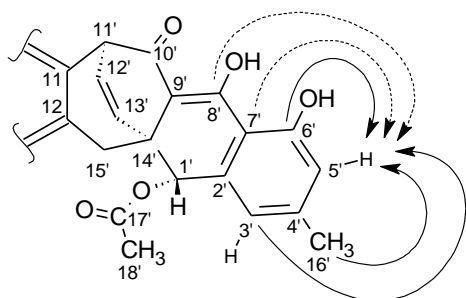


El análisis de las correlaciones antes mencionadas, tanto en los espectros de RMN de ^{13}C como ^1H y permite proponer la presencia de un anillo de siete miembros con un puente de etileno formando un biciclo(3,2,2)nonano entre los carbonos C-11, C-12, C-15', C-14', C-9', C-10', C-11' y C-13'.

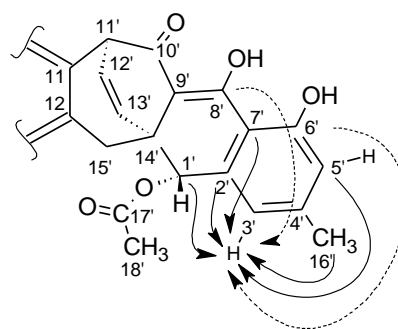
El espectro HMBC del compuesto **121** manifiesta una señal simple en δ_H 6.00 (H-1') que muestra correlaciones intensas con los carbonos en δ_C 170.5 (C-17'), 136.4 (C-2'), 123.2 (C-3'), 41.6 (C-14'), 112.6 (C-7') y 105.2 (C-9') y correlaciones laxas con los carbonos en δ_C 186.1 (C-10'), 185.8 (C-8'), 132.9 (C-13') y 35.2 (C-15'). Adicionalmente, la señal de los protones del metilo δ_H 2.01 (H-18') presenta una correlación con el carbono de éster en δ_C 170.5 (C-17'). Por lo que el carbono C-1' corresponde a un metino que soporta un grupo acetilo (Estructura M).



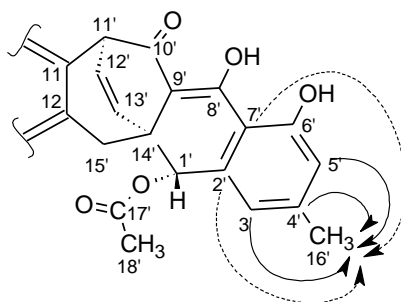
Con relación a los protones aromáticos en δ_H 6.80 (H-5') y 6.91 (H-3') en el espectro HMBC, el primero de ellos presenta correlaciones acentuadas con los carbonos en δ_C 161.8 (C-6'), 123.2 (C-3'), 22.1 (C-16'), y una correlación débil con los carbonos en δ_C 112.7 (C-7') y 185.8 (C-8') [Estructura N]. El segundo muestra correlación fuerte con los carbonos en δ_C 73.0 (C-1'), 136.4 (C-2'), 119.4 (C-5'), 112.7 (C-7') y 22.0 (C-16'); y una correlación menos intensa con los carbonos 147.7 (C-4'), 161.8 (C-6') y 185.8 (C-8') [Estructura O]. Los protones del metilo en δ_H 2.39 (H-16') correlacionan fuertemente con los carbonos en δ_C 123.2 (C-3'), 147.7 (C-4') y 119.4 (C-5'), y de manera débil con los carbonos en δ_C 136.4 (C-2') y 112.7 (C-7'). Estas correlaciones permiten proponer que H-5' se encuentra en posición *orto* al carbono aromático base de oxígeno C-6' y H-3' en posición *para*, mientras que el metilo C-16' está soportado por el carbono C-4' en posición *meta* con respecto al C-6' (Estructura P).



N

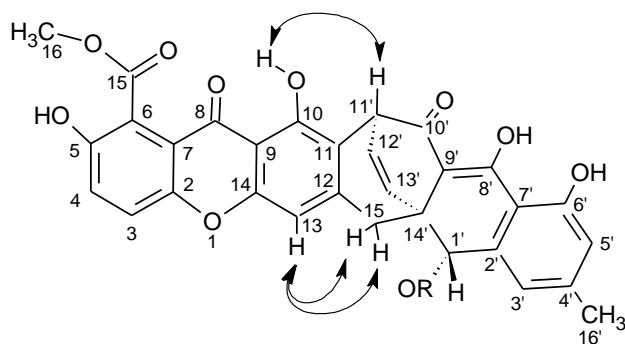


O



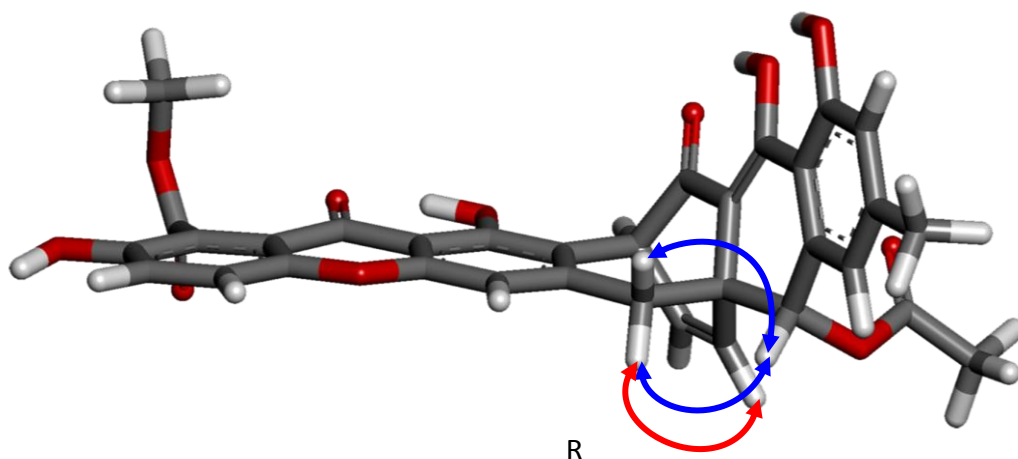
P

En el espectro de correlación homonuclear NOESY se aprecian una correlación entre el protón quelatado en δ_H 12.79 (H-10) y el protón alifático en δ_H 4.93 (H-11'); que aunado a la correlación en el espacio de la señal simple en δ_H 6.48 (H-13) con los dos protones diastereotópicos en δ_H 2.80 (H-15'b) y 2.93 (H-15'a), permite proponer a H-13 en posición *para* al hidroxilo fenólico en C-10 y por lo tanto un arreglo tipo "orto" entre las unidades xantona y oxantrona (Estructura Q).



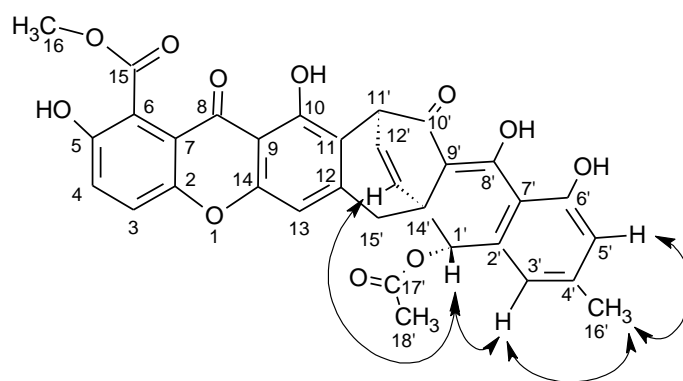
Q

Con respecto a la configuración del carbono C-1', en el espectro NOESY se aprecian correlaciones entre los dos hidrógenos diastereotópicos H-15'a y b y el protón en δ_H 6.00 (H-1'). Mientras que el protón del puente de etileno en δ_H 6.11 (H-13') correlaciona exclusivamente con el protón diastereotópico en δ_H 2.93 (H-15'a), revelando el protón H-1' se encuentra en una orientación pseudo ecuatorial (Estructura R; correlaciones NOESY selectas).



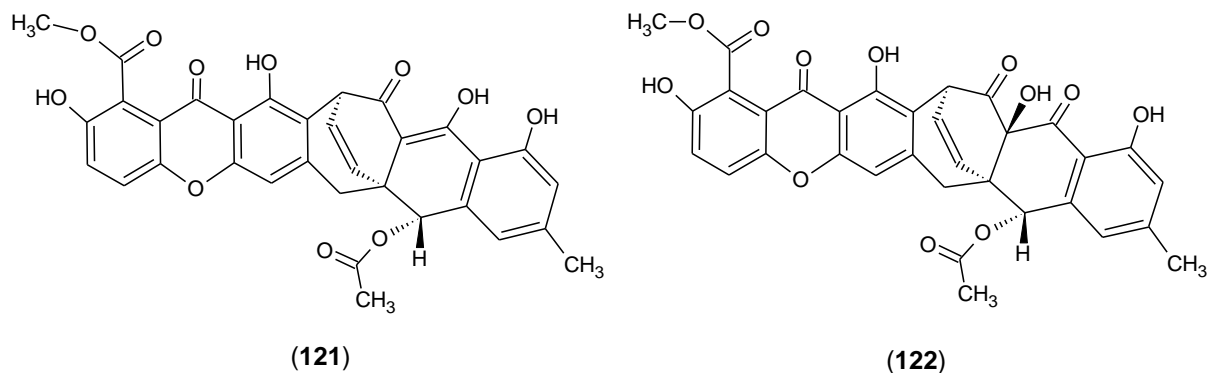
R

Adicionalmente, el protón en δ_H 6.00 (H-1') presenta una correlación en el espacio con δ_H 6.11 (H-13') y 6.91 (H-3'). Y a su vez, los protones del metilo en δ_H 2.39 (H-16') muestran correlaciones con los protones en δ_H 6.91 (H-3') y 6.80 (H-5'), lo que confirma de nueva cuenta que la posición del metilo C-16' se encuentra entre los protones H-3' y H-5' soportado sobre C-4' (Estructura S).

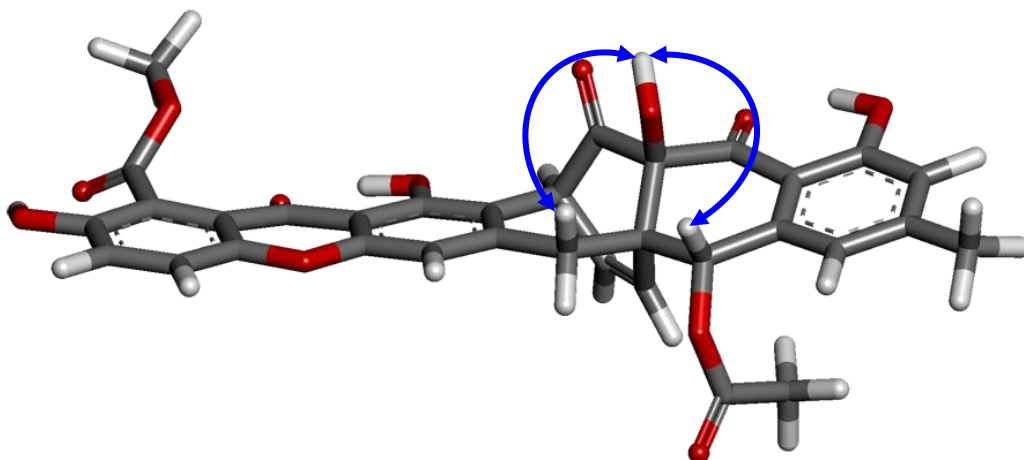


S

De manera general, los espectros de RMN de las cremoxantonas A (**121**) y B (**122**) presentan una gran similitud. La principal diferencia en el espectro RMN- ^{13}C de **121** con **122** radica en la sustitución de la señal del carbono cuaternario sp^2 en δ_C 105.2 (C-9') por una señal a campo alto en δ_C 81.4 asociada a un carbono sp^3 base de oxígeno en la cremoxantona B (**122**). En tanto que en el espectro de RMN- 1H se observa en δ_H 4.35 la presencia de una señal simple que integra para un protón intercambiable con D_2O . Por su parte, en el espectro HMBC se aprecia que el carbono en δ_C 81.4 (C-9') de la cremoxantona B (**122**) mantiene la mismas correlaciones que el carbono C-9' del compuesto (**121**), por lo que se deduce que la cremoxantona B (**122**) es el análogo hidroxilado en C-9' de la cremoxantona A (**121**).



El espectro NOESY de **122** efectuado en CDCl_3 proporciona información similar a la del compuesto **121** en cuanto a la posición del hidrógeno H-1', por lo que se infiere una configuración idéntica a la establecida para la cremoxantona A (**121**). Sin embargo, este experimento realizado en CDCl_3 no permitió observar ninguna correlación a larga distancia con el protón del alcohol en C-9' que permitiera deducir la configuración en el carbono C-9'. Por lo tanto se realizó el experimento NOESY en $\text{DMSO}-d_6$, en donde el hidrógeno H-9' se aprecia como una señal fina en δ_{H} 7.66 que mantiene una correlación en el espacio con H-1' y H-15'b. Esta información permite proponer que el hidroxilo sobre C-9' se encuentra en una orientación pseudo axial y que H-1' se orienta en la cara opuesta al puente de etileno (Estructura T; correlaciones NOESY selectas).



T

Las evidencias espectroscópicas recopiladas permitieron identificar a los compuestos **121** y **122** como las acremoxantonas A (**121**) y B (**122**) previamente descritas en la literatura (Isaka *et al.*, 2009). La configuración de los centros estereogénicos mostrada en **121** y **122** es relativa.

Cuadro 8. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las acremoxantonas A y B (**121** y **122**).

Metabolito	UV λ_{\max} (nm)	IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	MS-IE m/z (int. relativa)
Acremoxantona A (121)	362, 303, 271, 239	3425, 1731, 1641, 1612, 1577, 1220, 1015	564 (1), 552 (2), 517 (12.5), 485 (5), 439 (5), 403 (4), 341 (6), 123 (18), 119 (58), 58 (62), 55 (100), 41 (87), 27 (32)*
Acremoxantona B (122)	272, 234, 222	3443, 1737, 1639, 1433, 1233, 1211	612 [M^+ (1)], 524 (2.5), 492 (2), 432 (4.2), 341 (4), 313 (1.2), 222 (6), 189 (3), 149 (6), 135 (10.5), 119 (13.8), 91 (24.1), 69 (11), 57 (13.2), 43 (9.5), 32 (25)

* El ión molecular no se observó en IE ni en FAB⁺

8.4.2. Caracterización de la xantoquinodina J (**120**) y desacetil xantoquinodina J (**123**)

Los compuestos **120** y **123** se aislaron como sólidos cristalinos de color amarillo intenso solubles en CH_2Cl_2 . El espectro en el UV presenta absorciones intensas en 368, 275 y 216 nm, características de un patrón de conjugación extendido (Yoganathan *et al.*, 2008). Por otra parte, los espectros en el IR (Cuadro 10) de estos compuestos presentan bandas de absorción asociadas con su carácter aromático (ν_{\max} . 1637 cm^{-1}), con la presencia de grupos hidroxilo (ν_{\max} . 3435 cm^{-1}) y carbonilo (conjugado, de acetato y de grupo carboximetilo) (ν_{\max} . ~ 1637 cm^{-1} y ~ 1740 cm^{-1}). Los espectros de masas presentaron iones moleculares con una relación de masa/carga de 614 y 572 lo cual permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ y de $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ para **120** y **123**, respectivamente (Cuadro 10). Estas fórmulas permiten calcular un índice de insaturación de veintiuno y veinte, respectivamente.

Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H de las acremoxantonas A y B (121 y 122).

Posición	Acromoxantona A (121)			Acromoxantona B (122)		
	δ_c (ppm)	Mult. (DEPT)	δ_H (ppm) (mult. J en Hz)	δ_c (ppm)	Mult. (DEPT)	δ_H (ppm) (mult. J en Hz)
1	---	---	---	---	---	---
2	150.7	C	---	150.6	C	---
3	122.3	CH	7.41 (d, $J=9.25$)	122.2	CH	7.42 (d, $J=9.15$)
4	125.7	CH	7.34 (d, $J=9.25$)	125.0	CH	7.34 (d, $J=9.3$)
5	152.7	C	---	152.7	C	---
6	113.4	C	---	113.6	C	---
7	118.4	C	---	118.6	C	---
8	180.0	C	---	180.0	C	---
9	107.1	C	---	107.0	C	---
10	157.7	C	---	157.2	C	---
11	117.4	C	---	118.6	C	---
12	146.4	C	---	145.6	C	---
13	109.8	CH	6.48 (s)	109.0	CH	6.68 (s)
14	153.9	C	---	154.2	C	---
15	169.0	C	---	168.8	C	---
16	53.1	CH ₃	3.98 (s)	53.1	CH ₃	3.99 (s)
1'	73.0	CH	6.00 (s)	70.6	CH	6.52 (s)
2'	136.4	C	---	139.3	C	---
3'	123.2	CH	6.91 (s)	118.3	CH	6.50 (s)
4'	147.7	CH	---	149.5	C	---
5'	119.4	C	6.80 (s)	118.1	CH	6.78(s)
6'	161.8	C	---	164.0	C	---
7'	112.7	C	---	110.2	C	---
8'	186.8	C	---	194.7	C	---
9'	105.2	C	---	81.4	C	---
10'	186.1	C	---	204.0	C	---
11'	37.6	CH	4.93 (dd, $J=1.1, 6.6$)	42.7	CH	5.04 (dd, $J=0.9, 6.6$)
12'	131.8	CH	6.48 (dd, $J=6.6, 8.5$)	134.2	CH	6.52 (dd, $J=6.3, 9.0$)
13'	132.9	CH	6.11 (dd, $J=8.5, 1.1$)	129.0	CH	5.95 (dd, $J=9.2, 0.9$)
14'	41.6	C	---	46.1	C	---
15'a	35.2	CH ₂	2.93 (d, $J=17.8$)	32.3	CH ₂	3.05 (d, $J=19$)
15'b			2.80 (d, $J=18.1$)			3.50 (d, $J=18.5$)
16'	22.1	CH ₃	2.39 (s)	22.5	CH ₃	2.39 (s)
17'	170.5	C	---	170.7	C	---
18'	21.1	CH ₃	2.01 (s)	28.3	CH ₃	2.38 (s)
OH-5	---	---	*	---	---	*
OH-10	---	---	12.79 (s)	---	---	12.80 (s)
OH-6'	---	---	---	---	---	---
OH-8'	---	---	11.57 (s)	---	---	11.48 (s)
OH-9'	---	---	---	---	---	4.35 (s)

*No observado en las condiciones experimentales

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (RMN- ^1H y RMN- ^{13}C) [Anexo; Espectros 5-8] y bidimensionales (HMQC, HMBC, COSY y NOESY) permiten establecer que los productos naturales (**120** y **123**) presentan el núcleo estructural de un heterodímero de hidroxantona y oxantrona (Murià, 2007). A continuación se discute en detalle las características principales de los espectros:

Los espectros de RMN- ^{13}C de **120** y **123** presentan señales para 33 y 31 átomos de carbono, respectivamente, en conformidad con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas (Cuadro 11).

En la región aromática de los espectros de RMN- ^1H de los compuestos **120** y **123** se observan dos protones aromáticos *meta* acoplados alrededor de δ_{H} 6.80 (d, $J=1.5$ Hz) y 6.88 (d, $J=1.5$ Hz) y un protón aromático aislado en δ_{H} 6.14 (s). Estas tres señales presentan correlación en los espectros HSQC con tres metinos de carácter aromático alrededor de δ_{C} 119.0 (C-3'), 123.0 (C-5') y 114.2 (C-11), respectivamente (Cuadro 11).

En la zona vinílica de ambos espectros de RMN- ^1H se observan dos pares de señales dobles centradas aproximadamente en δ_{H} 6.13 (dd, $J = 10.5, 3.0$ Hz) y 6.51 (dd, $J = 10.5, 3.0$ Hz) y en δ_{H} 6.17 (dd, $J= 10.3, 2.9$ Hz) y 6.62 (dd, $J= 10.3, 2.2$ Hz) asignables a cuatro hidrógenos vinílicos los cuales muestran correlaciones con la señales alrededor de δ_{C} 123.5, 143.8, 132.5 y 131.8, en sus respectivos espectros HSQC.

En ambos espectros de RMN- ^1H se observan señales asignables a tres metinos ubicados alrededor de δ_{H} 4.90 (dd, $J = 6.6, 1.0$ Hz), 5.35 (*pt*, $J = 2.5$ Hz) y 5.0 (s). Estas tres señales presentan correlación en los espectros HSQC con tres metinos de carácter alifático aproximadamente en δ_{C} 38.0 (C-11'), 74.5 (C-3) y 73.0 (C-1') respectivamente.

Tanto el espectro RMN- ^1H de **120** como en el de **123** en la región cercana a $\delta_{\text{H}} \sim 11$ y ~ 14 muestran cuatro señales simples debidas a la presencia de cuatro grupos hidroxilo quelatados. Estas observaciones permitieron proponer *a priori* que estos grupos debían encontrarse en C-6, C-10, C-6' y C-10'.

A campo alto, los espectros de RMN-¹H presentan dos dobles alrededor de δ_{H} 2.6 (d, $J=18$ Hz) y 2.8 (d, $J=18$ Hz) asignables a un grupo metileno de carácter alifático, los cuales correlacionan con la señal en δ_{C} 35.1 en **120** y δ_{C} 36.0 en **123** en sus respectivos espectros de correlación heteronuclear HSQC.

En el espectro de RMN-¹H de **120** se observan tres señales simples que integran para tres protones, atribuibles a un grupo metil éster en δ_{H} 3.70 (H-16), un grupo metilo sobre anillo aromático en δ_{H} 2.38 (H-16') y a un metilo de grupo acetato en δ_{H} 2.01 (H-18'), cada uno de ellos presenta una correlación en el espectro HSQC con los carbonos en δ_{C} 53.1 (C-16), 22.1 (C-16') y 21.1 (C-18'), respectivamente. Mientras que en el espectro de RMN-¹H de **123** se observan sólo dos señales simples, atribuibles a un grupo metil éster en δ_{H} 3.63 (H-16) y un grupo metilo sobre anillo aromático en δ_{H} 2.39 (H-16').

Finalmente, los carbonos restantes observados en los espectros de RMN-¹³C de **120** se asignaron con base en el análisis del espectro de RMN-¹³C en su modalidad DEPT a cuatro grupos carbonilo en δ_{C} 168.7 (C-15), 170.4 (C-17'), 185.1 (C-8) y 186.4 (C-10') a trece carbonos cuaternarios aromáticos en δ_{C} 99.0 (C-7), 105.4 (C-9), 105.6 (C-9'), 112.5 (C-7'), 114.9 (C-12), 136.3 (C-2'), 147.6 (C-13), 147.8 (C-4'), 154.2 (C-14), 159.8 (C-10), 161.5 (C-6'), 171.0 (C-6) y 185.2 (C-8') y dos a carbonos cuaternarios alifáticos en δ_{C} 41.5 (C-14') y 84.9 (C-2). De acuerdo con los desplazamientos químicos observados, cuatro de los carbonos cuaternarios aromáticos se encuentran unidos a funciones oxigenadas (Cuadro 11). A diferencia del compuesto **120**, el espectro de RMN-¹³C de **123** muestra señales únicamente para tres carbonos de carbonilo en δ_{C} 186.7 (C-10'), 185.3 (C-8') y 185.2 (C-8) mientras que el resto de las señales para carbonos cuaternarios es muy similar al espectro de RMN-¹³C de la xantoquinodina J (**120**).

En el espectro de RMN-¹³C de **123**, la ausencia de la señal del carbonilo en δ_{C} 170.4 (C-17') y del metilo en δ_{C} 21.1 (C-18'), aunada a la ausencia de la señal simple en δ_{H} 2.00 (H-18') como únicas diferencias con los espectros de **120** permiten establecer que el compuesto **123** es el análogo desacetilado en C-1' de la xantoquinodina J (**120**).

En el espectro NOESY la correlación del protón en $\sim\delta_H$ 5.4 (H-3) con la señal en $\sim\delta_H$ 4.9 (H-11'); así como la correlación entre la señal del protón quelatado en $\sim\delta_H$ 11.1 (H-10) con la señal del protón en $\sim\delta_H$ 6.14 (H-11) permiten proponer que tanto la xantoquinodina J (**120**) como su análogo desacetilado (**123**) presentan un arreglo tipo "orto" entre las unidades de hidroxantona y oxantrona, según se muestra en la Figura 7. Asimismo, el espectro NOESY proporciona información adicional sobre la orientación del protón en δ_H 5.97 (H-1') en el espectro de **120** y de su análogo en δ_H 4.65 (H-1') en el espectro de **123**, los cuales muestran correlación con las respectivas señales de los protones diasterotópicos en $\sim\delta_H$ 2.6 (H-15'b) y \sim 2.8 (H-15'a). Mientras que el protón del puente de etileno $\sim\delta_H$ 6.4 (H-13') manifiesta una correlación exclusiva con uno de los protones diasterotópicos $\sim\delta_H$ 2,8 (H-15'a), lo que sugiere que el protón H-1' tiene una orientación pseudo ecuatorial. Este análisis está acorde con la estructura propuesta por Murià (2007) con base en la información derivada del análisis por difracción de rayos X (Figura 9).

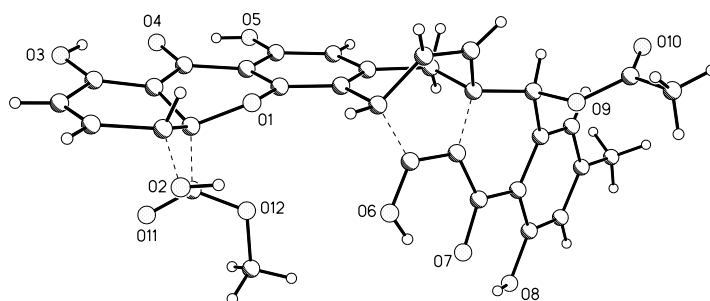
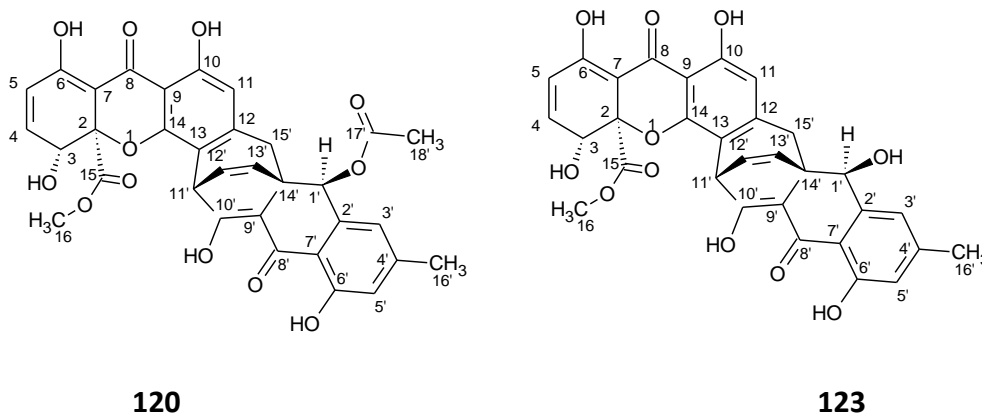


Figura 9. Vista estereoscópica de la xantoquinodina J (**120**) [tomado de Murià, 2007].



Cuadro 10. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las xantoquinodinas (**120** y **123**).

Metabolito	UV λ_{\max} (nm)	IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	MS-IE m/z (int.relativa)
Xantoquinodina J (120)	370, 275, 215	3435, 1740, 1637, 1573	614 [M^+ (31)], 582 (78), 555 (100), 521 (91), 505 (40), 495 (27), 477 (37), 467 (22), 380 (29), 360 (19), 230 (20), 224 (22), 205 (29), 163 (19), 121 (25), 55 (27), 57 (29), 69 (22), 44 (45), 28 (24), 18 (79)
Desacetil-xantoquinodina J (123)	369, 276, 213	3430, 1740, 1640, 1575	540 (1.4), 523 (2), 466 (1.6), 451 (2), 369 (1.8), 341 (1.9), 300 (4), 231 (8), 164 (6), 136 (13), 127 (7), 108 (6), 81 (6), 79 (9), 57 (9), 31 (20), 28 (27), 14 (9)*

* El ión molecular no se observó con IE

8.4.3. Caracterización de las acremonidinas A y B (**124** y **125**)

Las acremonidinas **124** y **125** se obtuvieron como sólidos amorfos de color amarillo solubles en CH_2Cl_2 . El análisis sus espectros en el UV muestran máximos de absorción en λ_{\max} 360, 280 y 200 nm y permiten proponer la presencia de grupos cromóforos con un patrón de conjugación extendido (Yoganathan *et al.*, 2008). Los espectros de masa modalidad FAB^+ , de RMN- ^{13}C y ^1H permiten establecer las fórmulas moleculares de $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ (m/z 614) y $\text{C}_{31}\text{H}_{24}\text{O}_{11}$ (m/z 572). En el espectro en el IR se observan bandas de estiramiento O-H (ν_{\max} . $\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$), bandas correspondientes al estiramiento C=O de éster y cetona (ν_{\max} . $1670\text{-}1730 \text{ cm}^{-1}$), de C-O fenólico (ν_{\max} $\sim 1210 \text{ cm}^{-1}$) y bandas en ν_{\max} . $\sim 1610 \text{ cm}^{-1}$ asociadas a la presencia de anillos aromáticos (Cuadro 12).

El análisis exhaustivo de los espectros de RMN unidimensionales (^1H y ^{13}C) [Anexo; Espectros 9-12] y bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) permitieron identificar a los compuestos (**124** y **125**) como las acremonidinas A y B, respectivamente (He *et al.*, 2003).

Cuadro 11. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H de la xantoquinodina J (**120**) y desacetilxantoquinodina J (**123**).

Posición	Xantoquinodina J (120)			Desacetilxantoquinodina J (123)		
	δ_{C} (ppm)	Mult. (DEPT)	δ_{H} (ppm) (mult. J en Hz)	δ_{C} (ppm)	Mult. (DEPT)	δ_{H} (ppm) (mult. J en Hz)
1	---	---	---	---	---	---
2	84.9	C	---	86.2	C	---
3	74.5	CH	5.30 (pt, $J = 2.5$)	75.0	CH	5.39 (pt, $J = 2.3$)
4	143.8	CH	6.51 (dd, $J = 10.5, 3.0$)	147.3	CH	6.62 (dd, $J = 2.2, 10.3$)
5	123.5	CH	6.13 (dd, $J = 10.5, 3.0$)	123.5	CH	6.17 (dd, $J = 10.3, 2.9$)
6	171.0	C	---	163.7	C	---
7	99.0	C	---	100.3	C	---
8	185.1	C	---	185.2	C	---
9	105.4	C	---	105.9	C	---
10	159.8	C	---	160.4	C	---
11	114.2	CH	6.14 (s)	114.3	CH	6.15 (s)
12	114.9	C	---	117.0	C	---
13	147.6	C	---	150.0	C	---
14	154.2	C	---	155.6	C	---
15	168.7	C	---	169.6	C	---
16	53.1	CH ₃	3.70 (s)	52.7	CH ₃	3.63 (s)
1'	73.0	CH	5.97 (1H, s)	73.4	CH	4.65 (s)
2'	136.3	C	---	135.8	C	---
3'	119.4	CH	6.80 (d, $J = 1.5$)	118.4	CH	6.74 (s)
4'	147.8	C	---	148.5	C	---
5'	123.3	CH	6.89 (d, $J = 1.5$)	123.0	CH	6.87 (s)
6'	161.5	C	---	162.7	C	---
7'	112.5	C	---	112.9	C	---
8'	185.2	C	---	185.3	C	---
9'	105.6	C	---	107.5	C	---
10'	186.4	C	---	186.7	C	---
11'	38.1	CH	4.82 (dd, $J = 6.6, 1.0$)	38.4	CH	4.98 (dd, $J = 6.5, 1.3$)
12'	131.8	CH	6.43 (dd, $J = 8.3, 6.8$)	131.2	CH	6.40 (dd, $J = 8.4, 6.5$)
13'	132.5	CH	6.08 (dd, $J = 8.3, 1.0$)	135.8	CH	6.48 (dd, $J = 8.4, 1.3$)
14'	41.5	C	---	43.7	C	---
15'a	35.1	CH ₂	2.79 (d, $J = 18.0$)	36.0	CH ₂	2.77 (d, $J = 18.3$)
15'b			2.69 (d, $J = 18.0$)			2.56 (d, $J = 18.1$)
16'	22.1	CH ₃	2.38 (s)	22.0	CH ₃	2.39
17'	170.4	C	---	---	---	---
18'	21.1	CH ₃	2.01 (s)	---	---	---
OH-3	---	---	*	---	---	5.97
OH-6	---	---	14.18 (s)	---	---	14.25
OH-10	---	---	11.11 (s)	---	---	11.06
OH-1'	---	---	---	---	---	4.6
OH-6'	---	---	11.35 (s)	---	---	11.61
OH-8'	---	---	14.40 (s)	---	---	*

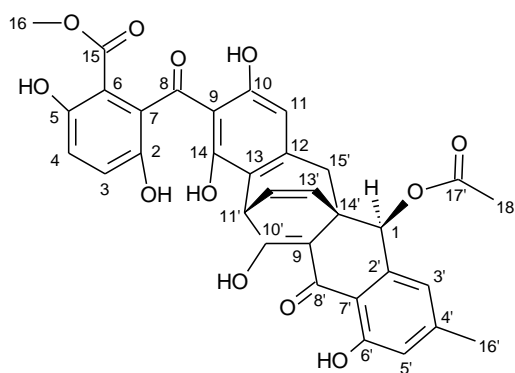
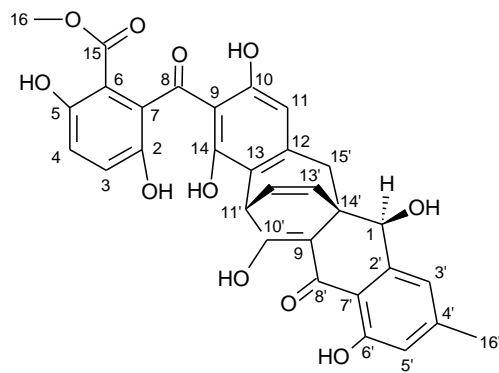
*No observado en las condiciones experimentales

Las acremonidinas A y B (**124** y **125**) son isómeros de las xantoquinodinas **120** y **123**, respectivamente, ya que poseen el mismo peso molecular y fórmula mínima. Las diferencias estructurales radican en que la unidad tipo hidroxantona es reemplazada por una del tipo benzofenona. Este hecho está apoyado por las evidencias espectrales observadas en los experimentos unidimensionales y bidimensionales de RMN. A continuación se describen las diferencias más destacables, entre la xantoquinodina J (**120**) y la acremonidina A (**124**) y entre la desacetilxantoquinodina J (**123**) y la acremonidina B (**125**).

El espectro de RMN-¹³C de la xantoquinodina J (**120**) presenta una señal en δ_C 74.5 (C-3) que corresponde a un hidroximetino que en el espectro HMBC muestra correlaciones con los protones en δ_H 6.51 (dd, $J=10.5, 3.0$ Hz; H-4) y 6.13 (dd $J=10.5, 3.0$ Hz; H-5). Además, en el espectro RMN-¹H la señal en δ_H 5.30 (t, $J=3.0$ Hz; H-3) del hidroximetino (C-3) presenta acoplamiento con los protones en δ_H 6.51 (H-4) y 6.13 (H-5) por lo que se encuentra en la posición vinílica a H-4. En tanto que en el espectro de RMN-¹³C de la acremonidina A (**124**) la señal del hidroximetino es reemplazada por un carbono sp^2 base de oxígeno en δ_C 145.0 (C-2) que mantiene correlaciones con los protones δ_H 6.93 (d, $J=9.1$ Hz; H-3) y 7.05 (d, $J=8.8$ Hz; H-4); mientras que en el espectro RMN-¹H estos protones se encuentran *orto* acoplados y con un desplazamiento químico en $\delta_H \sim 7.0$, lo que confirma su carácter aromático (Cuadro 13).

En analogía con las cremoxantonas A y B (**121** y **122**), los protones H-3 y H-4 en las acremonidinas A y B (**124** y **125**) forman parte de un anillo aromático tetrasustituido, y con base en la diferencia de 18 unidades de masa entre la cremoxantona A (**121**) y la acremonidina A (**124**), esta última está compuesta por una unidad de benzofenona fusionada con otra de oxantrona.

Por su parte, la acremonidina B (**125**) es el análogo desacetilado en C-1' de la acremonidina A (**124**). Con base en estas evidencias las estructuras de los compuestos **124** y **125** se asignaron como se indica a continuación:

**124****125**

Cabe mencionar que todos los datos espectroscópicos de estos productos naturales, se encuentran de acuerdo con los descritos previamente en la literatura (He *et al.*, 2003).

Cuadro 12. Constantes espectroscópicas y espectrométricas de las acremonidinas A y B (124 y 125).

Metabolito	UV λ_{\max} (nm)	IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	MS-FAB ⁺ m/z (intensidad relativa)
Acremonidina A (124)	358, 288, 278, 219	3359, 3025, 2955, 1735, 1680, 1614, 1579, 1464, 1414, 1369, 1217	637 [M+Na ⁺ (5)], 615 [M+H ⁺ (4)], 327 (5), 154 (28), 136 (37), 95 (33), 81 (38), 66 (69), 55 (100), 41 (83), 29 (28)
Acremonidina B (125)	357, 286, 281, 210	3428, 3236, 3049, 2953, 1723, 1616, 1579, 1461, 1415, 1281, 1209	595 [M+Na ⁺ (9)], 573 [M+H ⁺ (6)], 413 (12), 329 (14), 176 (68), 154 (100), 136 (83), 77 (37), 55 (34), 41 (26)

8.5. MONITOREO DE LA PRODUCCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR *Acremonium* sp.

Para comprobar que los policétidos diméricos aislados a partir de las fracciones primarias obtenidas por Murià en el 2007 corresponden a productos naturales y no a compuestos de degradación o transformación debido al tiempo de almacenamiento, se determinaron los perfiles cromatográficos utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Cuadro 13. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C y ^1H de las acremonidinas A y B (124 y 125).

Posición	Acremonidina A (124)			Acremonidina B (125)		
	δ_{C} (ppm)	Mult. (DEPT)	δ_{H} (ppm) (mult. <i>J</i> en Hz)	δ_{C} (ppm)	Mult. (DEPT)	δ_{H} (ppm) (mult. <i>J</i> en Hz)
1	---	---	---	---	---	---
2	145.0	C	---	154.8	C	---
3	120.4	CH	6.93 (d, <i>J</i> = 9.1)	124.5	CH	6.93 (d, <i>J</i> =9.0)
4	125.4	CH	7.05 (d, <i>J</i> = 8.8)	118.5	CH	6.78 (d, <i>J</i> =9.0)
5	155.9	C	---	145.2	C	---
6	128.1	C	---	130.1	C	---
7	109.3	C	---	109.2	C	---
8	198.3	C	---	199.4	C	---
9	109.4	C	---	109.4	C	---
10	156.6	C	---	157.7	C	---
11	110.5	CH	5.77 (s)	109.9	CH	5.69 (s)
12	146.3	C	---	146.3	C	---
13	115.8	C	---	115.0	C	---
14	159.3	C	---	159.4	C	---
15	169.1	C	---	169.6	C	---
16	52.4	CH3	3.61 (s)	52.1	CH3	3.54 (s)
1'	73.1	CH	5.93 (s)	73.1	CH	4.43 (s)
2'	136.4	C	---	141.2	C	---
3'	123.2	CH	6.85 (s)	118.3	CH	6.68 (s)
4'	147.6	C	---	147.4	C	---
5'	119.3	CH	6.78 (s)	121.9	CH	6.69 (s)
6'	161.6	C	---	161.4	C	---
7'	112.7	C	---	111.8	C	---
8'	185.7	C	---	185.4	C	---
9'	105.3	C	---	105.1	C	---
10'	186.6	C	---	187.2	C	---
11'	37.7	CH	4.86 (dd <i>J</i> = 6.7)	37.7	CH	4.79 (dd, <i>J</i> =1.3, 6.4)
12'	132.0	CH	6.44 (dd, <i>J</i> = 8.4, 6.6)	131.6	CH	6.42 (dd, <i>J</i> =6.5, 8.4)
13'	132.2	CH	6.06 (dd, <i>J</i> = 8.3)	133.2	CH	6.38 (dd, <i>J</i> =8.4,1.1)
14'	41.5	C	---	42.8	C	---
15'	34.6	CH2	2.69 (d, <i>J</i> = 17.6) 2.58 (d, <i>J</i> = 19.2)	35.1	CH2	2.43 (d, <i>J</i> =17.8) 2.57 (d, <i>J</i> =17.8)
16'	22.0	CH3	2.35 (s)	21.8	CH3	2.31 (s)
17'	170.5	C	---	---	---	---
18'	21.1	CH3	1.99 (s)	---	---	---
OH-2	---	---	*	---	---	---
OH-5	---	---	10.39 (s)	---	---	---
OH-10	---	---	*	---	---	---
OH-14	---	---	*	---	---	---
OH-6'	---	---	11.58 (s)	---	---	---
OH-10'	---	---	14.17 (s)	---	---	---

*No observado en las condiciones experimentales

Como parámetros de referencia se utilizaron los extractos orgánicos en mediana escala del micelio de *Acremonium* sp., obtenidos del cultivo del microorganismo en CPD incubados por un periodo de 30 y 60 días y empleando como disolventes de extracción CH₂Cl₂ y AcOEt.

El tiempo de retención y el perfil UV-VIS de cada uno de los metabolitos secundarios aislados de las fracciones primarias activas, se comparó con el perfil cromatográfico de los tres extractos derivados de los cultivos en mediana escala. En la Figura 10 se presentan los resultados de esta determinación. De manera general, se aprecia que a la longitud de onda de 272 nm la xantoquinodina J (**120**) es el metabolito secundario más abundante en el extracto orgánico de CH₂Cl₂ del endófito cultivado por 30 días. Por su parte, el extracto análogo de AcOEt muestra que la acremonidina A es el compuesto más abundante.

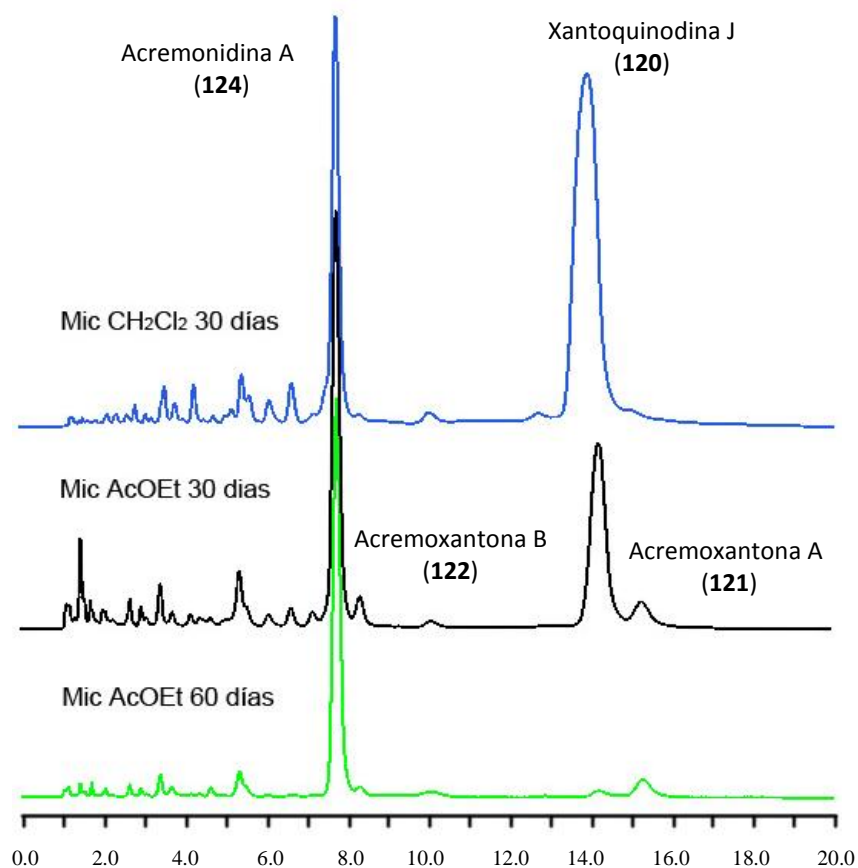
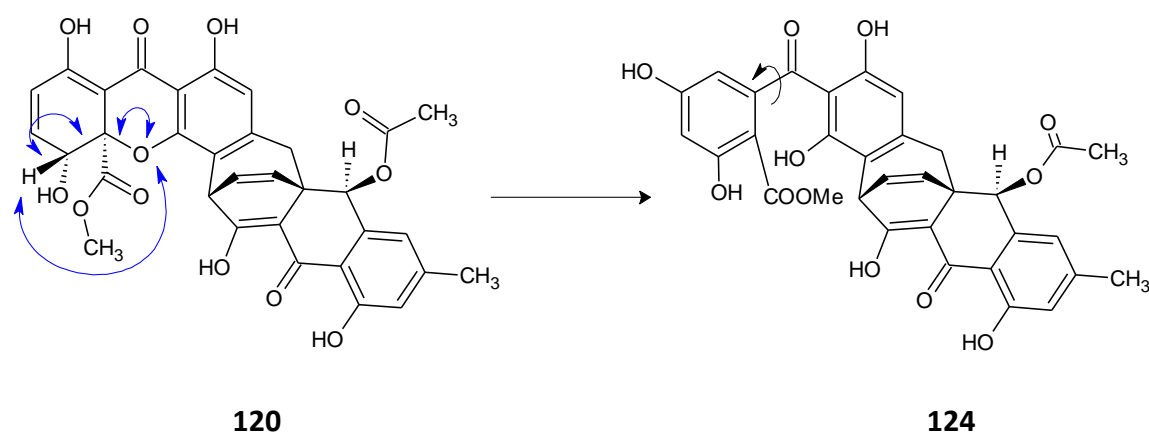


Figura 10. Perfiles cromatográficos (CLAR) de los extractos del micelio de *Acremonium* sp. a 30 y 60 días en cultivos líquidos en caldo papa dextrosa. Sistema de elución isocrático MeCN: H₂O (70:30); $\lambda_{\text{max}}=272$ nm.

Sorprendentemente, la xantoquinodina J (**120**) está prácticamente ausente en el extracto de 60 días de cultivo, obtenido con AcOEt. El pico más intenso corresponde a la acremonidina A (**124**). Esta evidencia sugiere que la xantoquinodina J (**120**) es el precursor de la acremonidina A (**124**). Sin embargo, analizando las estructuras de estos compuestos es posible que la acremonidina A (**124**) no sea un producto natural, sino que su acumulación en el cultivo de 60 días sea consecuencia de la descomposición de la xantoquinodina J (**120**), favorecida por la presencia de agua y del pH ácido del medio de cultivo, como se muestra en seguida:



Para reducir el efecto que pudiera tener el caldo de cultivo en la posible descomposición de la xantoquinodina J (**120**) se realizaron cultivos en medio sólido (PDA), incubando el microorganismo por 20, 30 y 40 días. El monitoreo de la producción de los policétidos diméricos se realizó de nueva cuenta, adquiriendo el perfil cromatográfico de los extractos del micelio, generados con CH_2Cl_2 y concentrados a temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$), a una absorbencia a 365 nm (máximo de absorción de la xantoquinodina J).

A los 20 días de crecimiento se observa la presencia de la xantoquinodina J (**120**) y de la acremonidina A (**124**), mostrando la primera una mayor absorbencia. Por otra parte, a los 30 días de cultivo la xantoquinodina J (**120**) prácticamente se ha agotado, en contraste, la señal correspondiente a la acremonidina A (**125**) crece; asimismo, el pico correspondiente a la cremoxantona B (**122**) se hace perceptible. Con respecto al perfil cromatográfico del cultivo de 40 días de crecimiento, se observa que la xantoquinodina J (**120**) es

prácticamente imperceptible y que la acremoxantona A (**121**) parece ser el constituyente mayoritario (Figura 11).

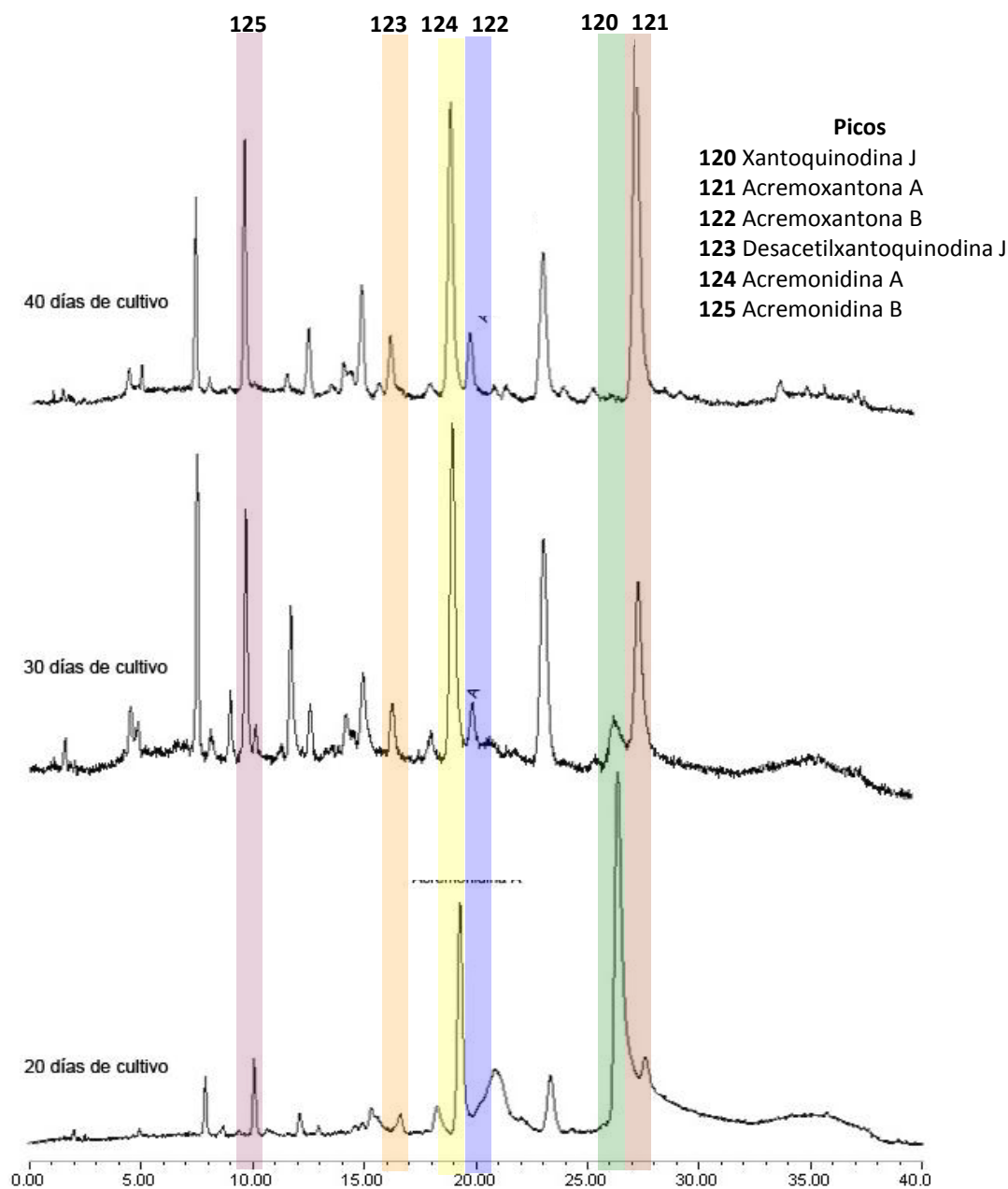


Figura 11. Perfil cromatográfico (CLAR) de los extractos del micelio de *Acremonium* sp. a los 20, 30 y 40 días, en cultivos sólidos en papa-dextrosa-agar. Sistema de elución con gradiente: MeCN:H₂O 25:75 → 50:50 en 5 min → 65:35 a los 30 min → MeCN 100% a los 35 min, manteniéndose hasta 40 min; λ_{\max} 365 nm.

Estos nuevos resultados sugieren que la xantoquinodina J (**120**) es precursora de la acremonidina A (**124**) y esta a su vez intermediario en la biogénesis de la acremoxantona A (**121**). Esta hipótesis es apoyada por algunos estudios realizados, con marcaje con deuterio, en la biogénesis de un derivado de xantona de origen fúngico, la cloromonilicina (**126**), en el cual se determinó que existe un intermediario clave; la benzofenona monilifenona (**127**), que proviene a su vez de la ruptura oxidativa de una antraquinona, el crisofanol (**128**) (Figura 12) [Kachi y Sassa, 1986; Sassa, 1991].

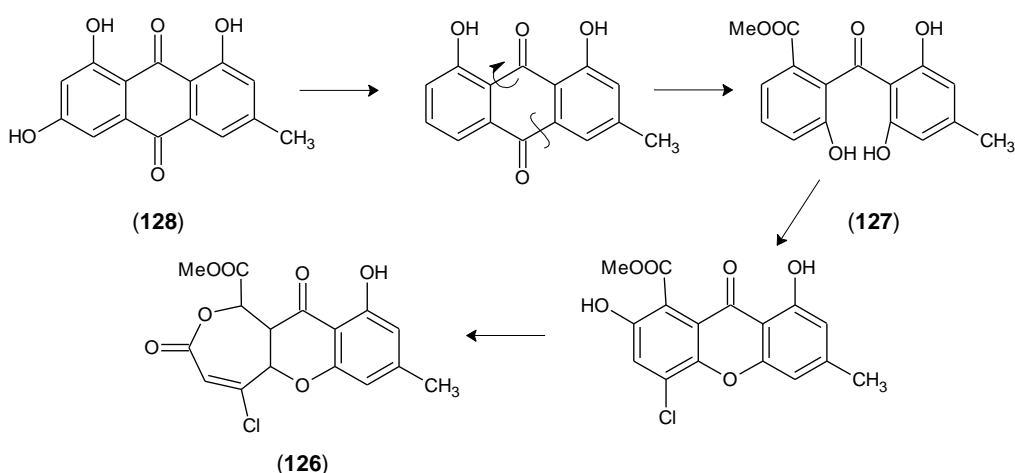
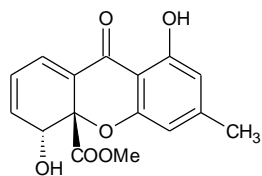
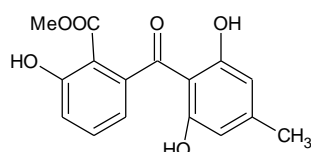


Figura 12. Biogénesis propuesta para la cloromonilicina (**126**) [modificado de Sassa, 1991].

Los estudios realizados por Kawahara y colaboradores (1994), muestran que los compuestos del tipo dihidroxantona como la nidulalina A (**129**) pudieran ser precursores de las benzofenonas. La nidulalina A (**129**) es un metabolito secundario producido por el hongo *Emericella nidulans* y fue aislado junto con su análogo tipo benzofenona; la nidulalina B (**130**). Los autores sugieren que debido a la isomerización de la nidulalina A (**129**) en la B (**130**), la primera puede ser un intermediario importante en la biosíntesis de las benzofenonas. Sin embargo, en este trabajo no se reporta la presencia de alguna xantona que pudiera presumir el papel de la nidulalina B (**130**) como precursor de xantona.

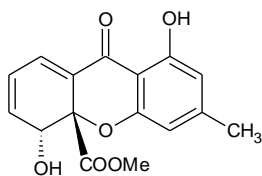


(129)

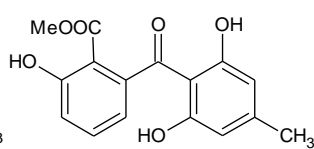


(130)

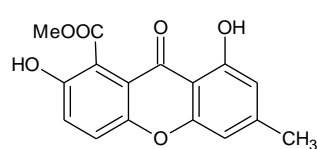
Fujimoto y colaboradores (2006) identificaron que el hongo *Emericella quadrilineata* produce las nidulinas A y B (**129** y **130**) así como las xantonas estructuralmente relacionadas: la pinselina (**131**) y la 1-hidroxi-3-metil xantona (**132**). Lo cual permite relacionar la biosíntesis de las xantonas, hidroxantonas y benzofenonas.



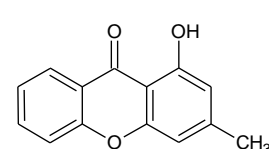
(129)



(130)

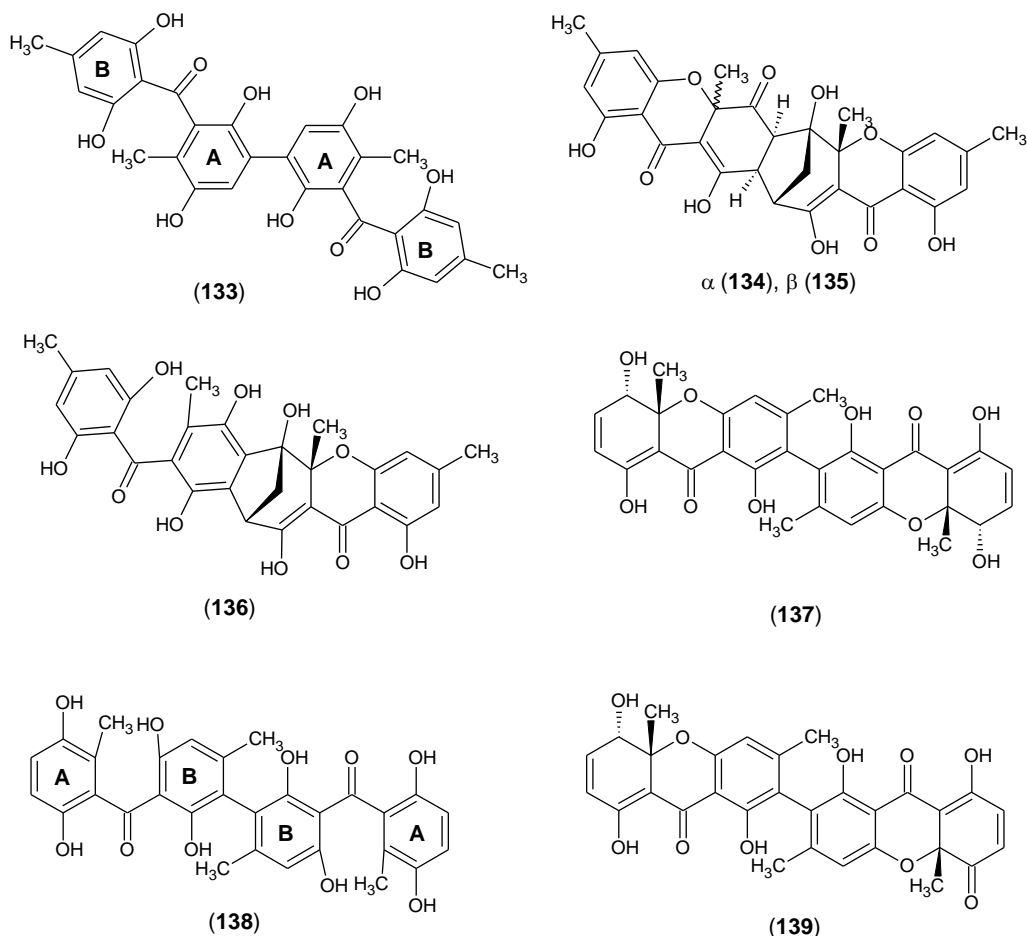


(131)



(132)

Sin embargo, existe evidencia de que las benzofenonas pueden ser las precursoras de las hidroxantonas. Por ejemplo, las microsfaerinas A-D (**133-136**) y las fomalevonas A-C (**137-139**) son otro ejemplo de policétidos de origen fúngico que se presentan como homo y heterodímeros de hidroxantonas y benzofenonas. Los primeros dímeros fueron aislados del hongo fungícola *Phoma* sp. por Shim y colaboradores (2011), en tanto que el segundo grupo de compuestos fueron obtenidos por Yoganathan y colaboradores (2008) del hongo *Microsphaeropsis* sp.



En esta serie de compuestos el precursor es una unidad de benzofenona, que por acoplamiento fenólico forma el homodímero **133** (acoplamiento **A-A**) o **138** (acoplamiento **B-B**). El dímero de hidroxantona **137** puede formarse por adición de cada hidroxilo fenólico del anillo **B** a la correspondiente ligadura de los anillos aromáticos **A**. En tanto que el biciclo(3.2.1)octano en **136** probablemente se forma por acoplamiento fenólico, vía radicales libres, después de que se genera la primera hidroxantona. El posible intermediario **136** le da origen a **134** y **135** tras la adición de un hidroxilo fenólico de **B** a una ligadura del anillo **A** y posteriores pasos de oxidación y reducción.

Lo anterior supone que las benzofenonas pueden ser tanto precursoras de las hidroxantonas como de las xantonas. La tendencia observada en los perfiles cromatográficos de los cultivos en medio sólido, en cuanto al decremento del pico correspondiente a la xantoquinodina J (**120**) y el concomitante incremento del pico de la

acremoxantona A (**121**), no es evidencia suficiente para suponer que la xantoquinodina J (**120**) es el precursor de **121**. Habría que considerar la posibilidad de que el pico (metabolito no identificado hasta el momento) con tiempo de retención 23.5, sea un precursor de la acremoxantona A (**121**). Es indispensable determinar la identidad de este metabolito, así como identificar los posibles monómeros precursores con el fin de esclarecer si los heterodímeros producidos por *Acremonium* sp. se forman independientemente a partir monómeros premodificados o si existe un dímero precursor de los metabolitos restantes.

Finalmente, a manera de ejemplo en la Figura 13 se muestra el perfil cromatográfico del extracto de AcOEt del micelio obtenido del cultivo en CPD incubado por 30 días, adquirido con un gradiente de elución que inició con MeCN:H₂O 25:75 hasta 50:50 en 5 min; posteriormente, se disminuyó la polaridad hasta MeCN:H₂O 65:35 a los 30 min y, por último, se llegó a MeCN 100% a los 35 min, manteniéndolo hasta los 40 min., con una velocidad del flujo de 1mL/min. El desarrollo de este sistema de elución permitió la identificación y la separación eficiente de todos los metabolitos secundarios aislados en el presente proyecto.

8.6. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE *ACREMONIUM* SP.

8.6.1. Efecto de los compuestos puros sobre el crecimiento de oomicetos fitopatógenos

La actividad antioomiceto de los metabolitos secundarios se realizó sobre los cuatro oomicetos fitopatógenos más sensibles al extracto orgánico del micelio y al fungicida comercial metalaxil (*Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici*) utilizando el método de dilución en agar y a concentraciones de 1 y 10 µM.

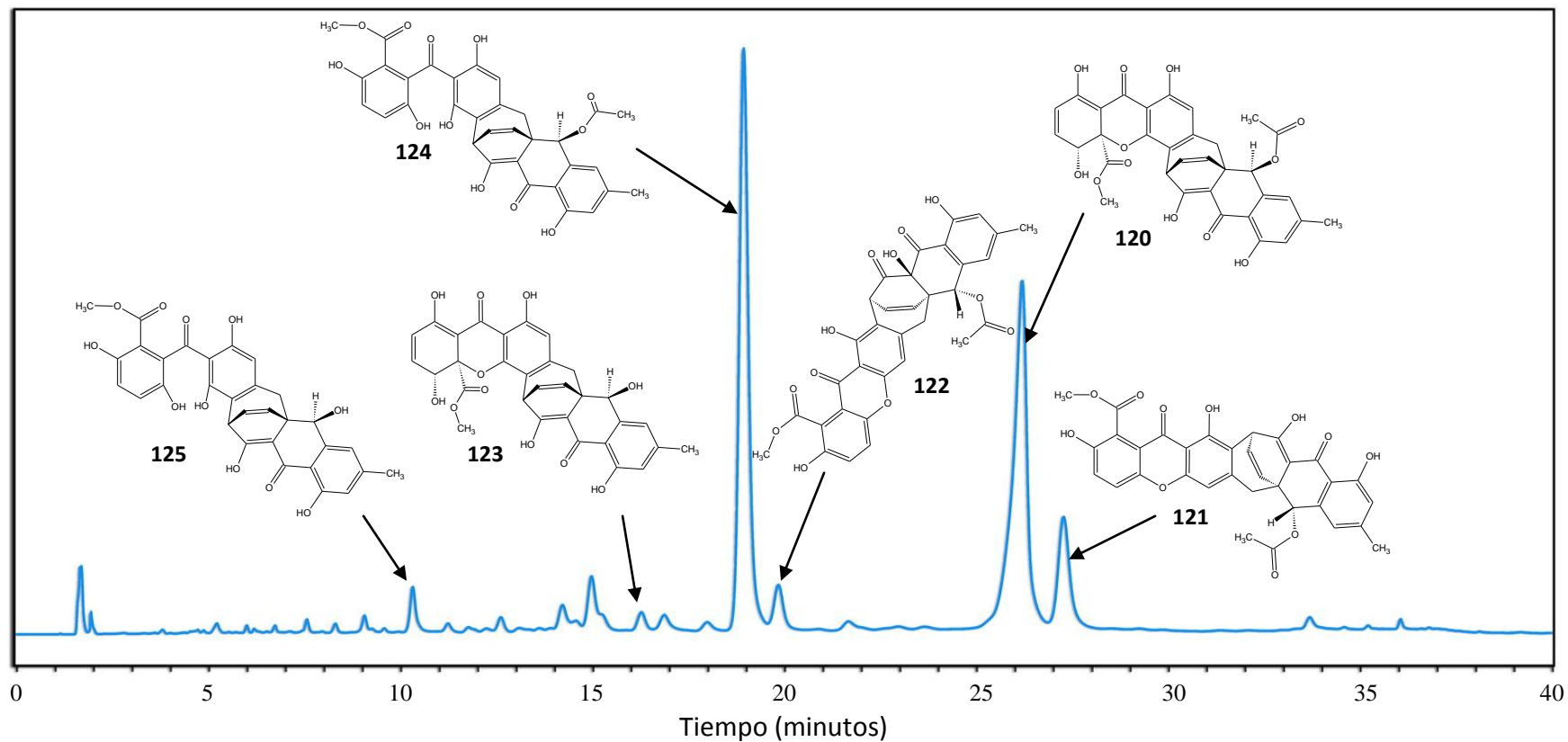


Figura 13. Perfil cromatográfico (CLAR) de los metabolitos secundarios producidos por el hongo endófito *Acremonium* sp. identificados en el extracto de AcOEt del micelio obtenido del cultivo líquido de 30 días de fermentación (CPD). Sistema de elución con gradiente: MeCN:H₂O 25:75 → 50:50 en 5 min → 65:35 a los 30 min → MeCN 100% a los 35 min y constante hasta los 40 min; $\lambda_{\text{max}} = 275$ nm.

En los Cuadros 14 y 15 se presenta el efecto inhibitorio de las xantoquinodinas **120** y **123**, acremonidinas **124** y **125**, y acremoxantonas **121** y **122**, aisladas de *Acremonium* sp. sobre el crecimiento de de las especies indicadas anteriormente. A la concentración de 1 μ M ninguno de los compuestos evaluados presenta inhibición significativa sobre el crecimiento de los microorganismos de prueba. La xantoquinodina J (**120**) evaluada a 10 μ M presenta la mayor actividad inhibitoria sobre los cuatro oomicetos, inhibiendo su crecimiento significativamente por arriba del 55%, seguido por la desacetilxantoquinodina J (**123**) y la acremonidina B (**125**) que muestran, en términos generales, una actividad similar inhibiendo alrededor del 50% el crecimiento de los fitopatógenos evaluados. Por su parte, la acremonidina A (**124**) inhibe significativamente a *Pythium aphanidermatum*, *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici*. La acremoxantona A (**121**) no presentó actividad hacia ninguno de los fitopatógenos de prueba a la máxima concentración evaluada (10 μ M). Por su parte, la acremoxantona B (**122**) muestra actividad inhibitoria significativa únicamente sobre el crecimiento de *Phytophthora parasitica*.

Cuadro 14. Potencial antioomiceto de los metabolitos secundarios aislados del hongo endófito *Acremonium* sp. a la concentración 1 μ M.

Metabolito secundario	% inhibición del crecimiento radial a 1 μ M			
	<i>P. aphanidermatum</i> ^a	<i>P. cinnamomi</i> ^b	<i>P. capsici</i> ^b	<i>P. parasitica</i> ^c
Xantoquinodina J (120)	11.14	7.28	13.48	6.59
Acremonidina A (124)	11.75	0	12.5	5.77
Desacetilxantoquinodina J (123)	0	0	8.61	5.14
Acremonidina B (125)	0	2.58	4.52	1.12
Acremoxantona A (121)	1.75	2.56	8.5	0
Acremoxantona B (122)	5.29	8.86	0.71	18.61
Metalaxil	100*	35.65*	68.29*	100*

^a Calculada a un día de crecimiento ; ^b Calculada a tres días de crecimiento; ^c Calculada a cuatro días de crecimiento; * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). n=4.

Cuadro 15. Potencial antioomiceto de los metabolitos secundarios aislados del hongo endófito *Acremonium* sp. a la concentración 10 μ M.

<i>Metabolito secundario</i>	% inhibición del crecimiento radial a 10 μ M			
	<i>P. aphanidermatum</i> ^a	<i>P. cinnamomi</i> ^b	<i>P. capsici</i> ^b	<i>P. parasitica</i> ^c
Xantoquinodina J (120)	72.42*	57.59*	71.99*	68.86*
Acremonidina A (124)	27.75*	14.25	19.5	19.23
Desacetilxantoquinodina J (123)	56.72*	36.61*	55.02*	49.71*
Acremonidina B (125)	55.52*	26.61*	35.2*	56.18*
Acremoxantona A (121)	10.5	3.7	9.01	5.7
Acremoxantona B (122)	7.24	9.81	9.93	33.33*
Metalaxil	100*	54.56*	100*	100*

^a Calculada a un día de crecimiento ; ^b Calculada a tres días de crecimiento; ^c Calculada a cuatro días de crecimiento; * Valores estadísticamente significativos, ANOVA (P< 0.05). n=4.

8.6.2. Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios aislados

De acuerdo con Strobel y colaboradores (1997) los oomicetos como *Pythium ultimum*, presentan una alta sensibilidad a compuestos anticancerígenos como la leucinostatina y el taxol. Esta característica aunada al rápido crecimiento y fácil manejo de los oomicetos en cultivos *in vitro*, los sitúa como una herramienta práctica para la evaluación preliminar de compuestos con potencial anticancerígeno. Con el objetivo de corroborar dicha aseveración y al mismo tiempo explorar el potencial anticancerígeno de los metabolitos bioactivos producidos por el endófito *Acremonium* sp., se determinó la actividad citotóxica de los extractos orgánicos y compuestos obtenidos sobre líneas celulares cancerosas humanas.

En el cuadro 16 se muestran los resultados de citotoxicidad de los extractos orgánicos del micelio de *Acremonium* sp. derivados de las fermentaciones de 30 y 60 (AcOEt) días, así como de los compuestos puros sobre líneas celulares tumorales de glía de sistema nervioso central (U25), próstata (PC-3), leucemia (K562), colon (HCT-15), mama (MCF-7) y pulmón (SKLU), evaluados a una concentración de 50 μ g/mL. Ambos extractos demostraron un importante efecto inhibitorio sobre el crecimiento de todas las líneas tumorales evaluadas, inhibiendo de manera general su crecimiento en más del 70%.

Los metabolitos secundarios evaluados, también muestran un importante potencial citotóxico a 50 µg/mL. Con excepción del efecto sobre el crecimiento de la línea celular de leucemia (K562), en general todos los metabolitos evaluados inhiben de manera importante el crecimiento las líneas celulares evaluadas. La acremoxantona B (**122**) y la acremonidina B (**125**) inhiben en un 100% el desarrollo celular tumoral de las diferentes líneas evaluadas.

Cuadro 16. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos y metabolitos secundarios de *Acremonium* sp., sobre seis líneas celulares cancerosas humanas y sobre la viabilidad de macrófagos murinos.

Tratamiento/Línea celular	% de inhibición del crecimiento (50 µg/mL)						% viabilidad macrófagos (100 µg/mL)
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	
Exto. Mic. (30 días)	99,91	87,9	70,35	93,41	100	95,54	91.36
Exto. Mic. (60 días)	100	94,08	18,68	100	100	100	98.3
Acremoxantona B (122)	100	100	100	100	100	100	100
Acremonidina B (125)	100	100	100	100	100	100	100
Xantoquinodina J (120)	100	100	64,12	100	100	100	100
Acremoxantona A (121)	100	100	23.7	100	82.1	100	ND
Acremonidina A (124)	100	100	5.6	100	100	100	ND
Desacetil xantoquinodina J (123)	100	100	SA	96.9	92.5	100	ND
Colchicina	62.8	62.6	54.5	78.9	74.6	100	ND

U251=glía de sistema nervioso central; PC-3=próstata; K562=leucemia; HCT-15=colon; MCF-7=mama; SKLU=pulmón; ND=no determinado; SA= sin actividad.

Estos resultados permiten proponer que los metabolitos secundarios producidos por *Acremonium* sp. constituyen compuestos con potencial anticancerígeno. Sin embargo, para establecer su potencia es necesario determinar las CI_{50} de los compuestos puros sobre las líneas tumorales evaluadas y compararlas con la actividad de la camptotecina utilizada como control positivo ($0.024 < IC_{50} < 0.59$).

Cabe mencionar que los ensayos preliminares realizados con el fin de establecer las CI_{50} de los compuestos puros sobre las líneas tumorales evaluadas indican que, en general, éstas se encuentran en un rango de concentraciones entre 5 y 10 µM.

Strobel y colaboradores (1997) sugieren que quizá la sensibilidad de *Pythium ultimum* al anticancerígeno taxol está relacionada con una similitud en la estructura de la β -tubulina de oomicetos y de células de mamíferos. Con base en este antecedente y con la finalidad de establecer una posible correlación entre el potencial antioomiceto demostrado por los compuestos producidos por *Acremonium* sp., y su efecto citotóxico sobre las líneas cancerosas humanas; en el presente trabajo se evaluó la actividad de la colchicina, un fármaco que actúa a nivel de la polimerización de la tubulina (Gigant *et al.*, 2009), sobre el crecimiento de los cuatro oomicetos fitopatógenos ensayados.

La colchicina es inactiva a las concentraciones de 1 y 10 μ M sobre el crecimiento de los cuatro oomicetos de prueba. Por otra parte, en el Cuadro 16 se muestra que este compuesto inhibe significativamente el crecimiento de todas las líneas celulares a una concentración de 125 μ M. Aunque la colchicina inhibe más del 50% el crecimiento de las líneas tumorales, no resultó un buen modelo para establecer una correlación entre potencial antioomiceto y antitumoral debido a que la concentración necesaria para lograr este efecto es 12 veces mayor a la requerida para inhibir un porcentaje similar el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos. Sin embargo, para poder observar una correlación entre la actividad inhibitoria del crecimiento de los oomicetos y el potencial anticancerígeno; es necesario evaluar la capacidad antioomiceto de diferentes antitumorales con distintos mecanismos de acción incluyendo aquellos que actúan a nivel de la β -tubulina, como el taxol.

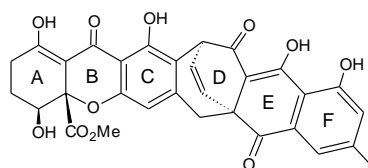
8.6.3. Evaluación de la toxicidad de los extractos orgánicos del micelio y metabolitos secundarios aislados

Con la finalidad de establecer de manera preliminar la toxicidad de los compuestos con actividad antioomiceto y citotóxica producidos por el endófito en estudio, se determinó la toxicidad sobre la viabilidad celular de macrófagos murinos (MTT). En el cuadro 16 se observa que los extractos orgánicos muestran una viabilidad sobre macrófagos mayor al 90 % y los compuestos puros del 100 % a la concentración de prueba que fue de 100

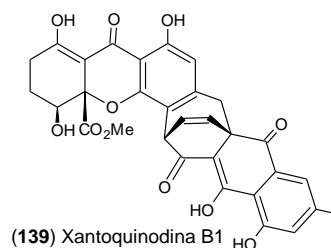
$\mu\text{g/mL}$, y considerando que las CI_{50} preelminares con líneas celulares cancerosas se encuentran en un rango de 5-10 μM posiblemente los policétidos heterodiméricos producidos por el endófito *Acremonium sp.* poseen un futuro anticancerígeno prometorio.

8.7. METABOLITOS SECUNDARIOS ESTRUCTURALMENTE RELACIONADOS A LOS COMPUESTOS DE *ACREMONIUM SP.* Y SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA

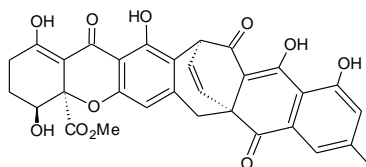
Los primeros metabolitos secundarios constituidos por heterodímeros de octacétidos fusionados por un biciclo(3,2,2)nonano, fueron descritos en 1993 por Tabata y colaboradores, a partir del hongo *Humicola sp.*, aislado de una muestra de suelo. El estudio químico de este microorganismo permitió la caracterización de las xantoquinodinas A1-3 (**136-138**) y B1-3 (**139-141**) (Tabata *et al.*, 1993, 1996).



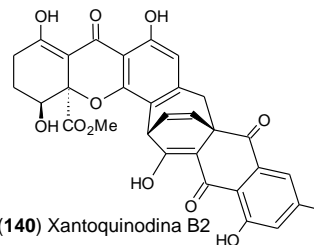
(136) Xantoquinodina A1



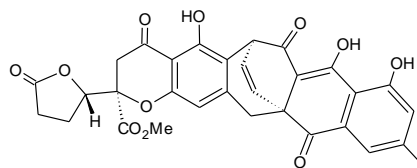
(139) Xantoquinodina B1



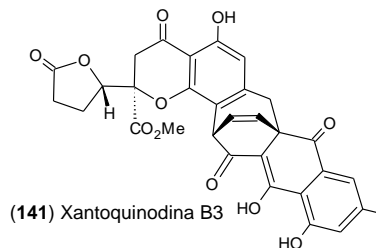
(137) Xantoquinodina A2



(140) Xantoquinodina B2



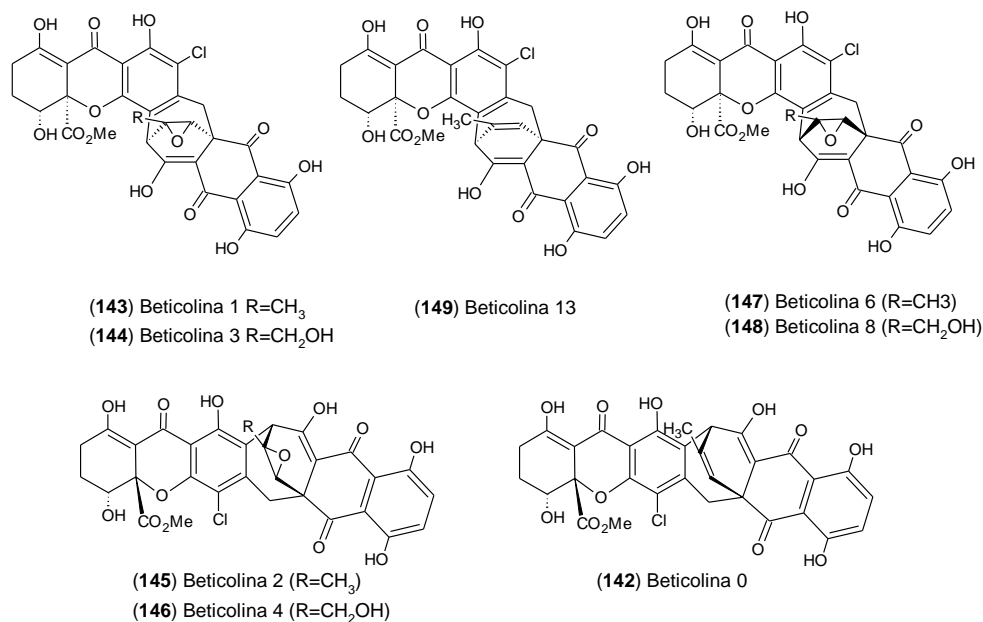
(138) Xantoquinodina A3



(141) Xantoquinodina B3

Por otra parte, del hongo *Cercospora beticola*, un patógeno del betabel, se han identificado ocho heterodímeros; las beticolinas 0-4 (**142-146**), 6 (**147**), 8 (**148**) y 13 (**149**) [Milat y Blein, 1993; Ducrot, 2009].

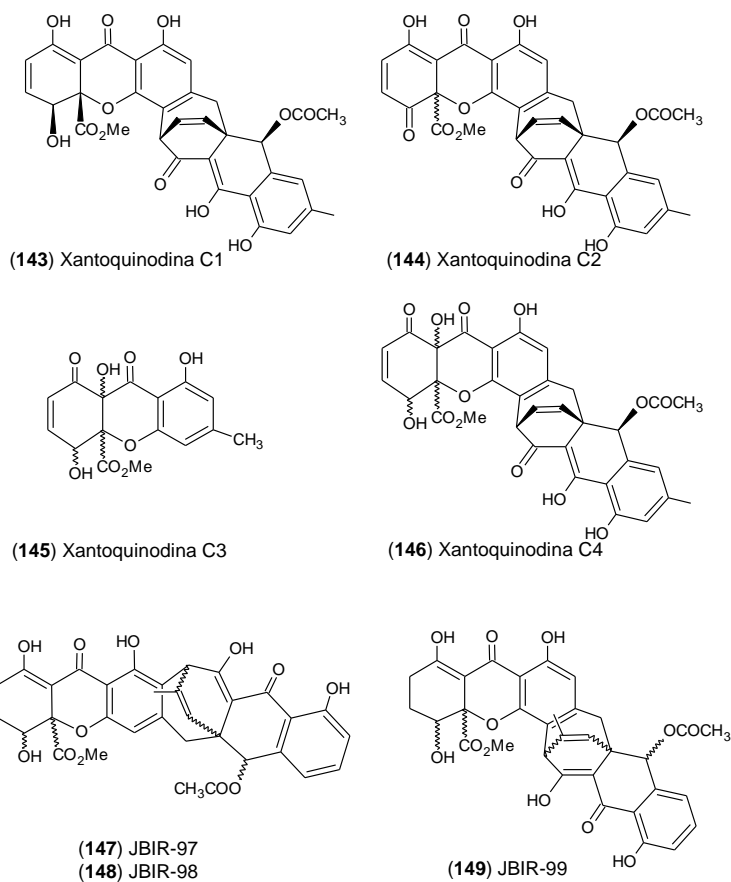
Tanto las beticolinas como las xantoquinodinas han sido aisladas como mezclas de isómeros *orto* y *para* y de epímeros sobre el carbono del residuo carboximetil (C-2). Las beticolinas (**142-149**) y las xantoquinodinas (**136-141**) mantienen intacto el grupo *p*-quinona del anillo E en la antraquinona. Sin embargo, presentan algunas diferencias importantes. Así por ejemplo, las beticolinas de *Cercospora beticola* en contraste con sus análogos producidos por *Humicola* sp., presentan un mayor grado de oxigenación (alcoholes y epóxidos) sobre el puente de etileno del biclcononano, además de un grupo hidroquinona sobre el anillo F. Por otra parte, la principal diferencia estructural en el fragmento de hidroxantona entre las xantoquinodinas (**136-141**) y beticolinas (**142-149**) es la presencia de un átomo de cloro sobre el anillo C.



Las xantoquinodinas de *Humicola* sp. presentan actividad anticoccidiana sobre el protozario *Eimeria* sp. patógeno de pollos (Tabata *et al.*, 1993, 1996). Por otra parte, las beticolinas fueron caracterizadas biológicamente, como fitotoxinas inhibitoras de la

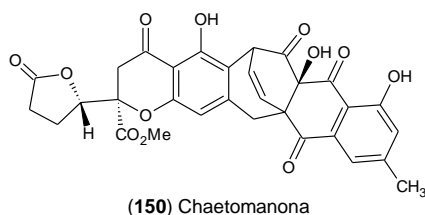
enzima H^+ -ATPasa, cuya actividad se ha adjudicado a su propiedad para formar complejos con magnesio (Mikes *et al.*, 1994). Además, la capacidad de llevar a cabo el equilibrio quinona-hidroquinona ha sido relacionada con su actividad antioxidante la cual es mejor que la de la vitamina E (Rustérucchi *et al.*, 1996).

Existen otros reportes recientes de compuestos tipo xantoquinodina. El primero corresponde a las xantoquinodinas C1-C4 (**143-146**) del hongo fungícola *Acremonium camptosporum*, colectado de los estromas de un pirenomiceto (sordariomiceto) no identificado. Las xantoquinodinas C1, C2 y C4 (**143**, **144** y **146**) presentaron actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* en ensayos de difusión en agar a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Jiao, 2006). Por otra parte, del hongo *Tritirachium* sp., asociado a una esponja de mar, se obtuvieron los compuestos JBIR-97, 98 y 99 (**147-149**), los cuales muestran actividad citotóxica sobre células HeLa (Ueda *et al.*, 2010).

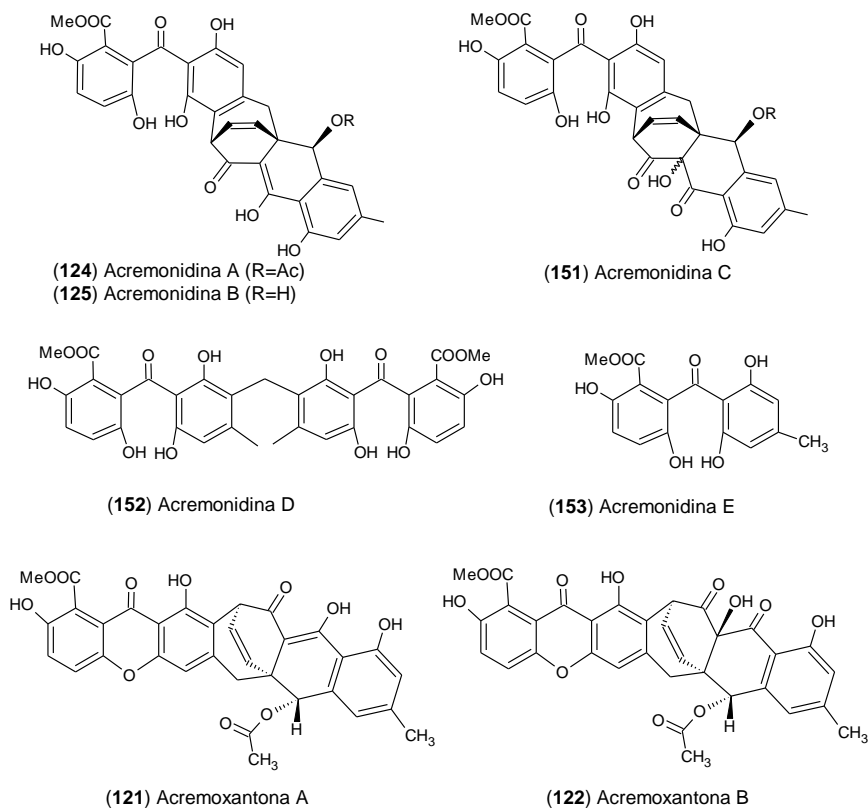


Esta otra clase de xantoquinodinas comparte la característica estructural de poseer una subunidad de oxantrona en lugar de una de antraquinona y sustituido con un grupo acetato. Esta característica es compartida con la xantoquinodina J (**120**), la acremonidina A (**124**) y las acremoxantonas A y B (**121** y **122**), aisladas en el presente proyecto.

Por último, dos especies de hongos del género *Chaetomium* producen compuestos relacionados a las xantoquinodinas. El primero de ellos corresponde a *Chaetomium globosum* aislado de una muestra de suelo, que produce el compuesto chaetomanona (**150**) el cual presentó actividad sobre *Mycobacterium tuberculosis* (Kanokmedhakul *et al.*, 2002). El segundo corresponde al hongo coprófilo *Chaetomium* sp., que produce la xantoquinodina A1 (**136**), la cual presenta actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* (Kingsland y Barrow, 2009).



Otro grupo de metabolitos secundarios estrechamente relacionados son las acremonidinas y las acremoxantonas. He y colaboradores (2003) obtuvieron las acremonidinas A-E (**124**, **125**, **151**, **152** y **153**) de una especie de *Acremonium* aislada en el bosque (los autores no aclaran el origen de la cepa), estos metabolitos presentan moderada actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas susceptibles y resistentes a meticilina como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis*, así como susceptibles y resistentes a vancomicina, siendo la acremonidina A (**124**) el compuesto más activo. Cabe señalar que las acremonidinas A y B (**124** y **125**) también son producidas por el endófito *Acremonium* sp. (endófito 101) aislado de *Bursera simaruba*.



Isaka y colaboradores (2009) obtuvieron de una especie de *Acremonium* anemófila, las acremonidinas A y C (**124** y **151**), y las acremoxantonas A-B (**121** y **122**). La actividad biológica de estos compuestos se realizó evaluando su potencial antibacteriano (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*), fungicida (*Candida albicans*, *Magnaporthe grisea*), antipalúdico (*Plasmodium falciparum*), antituberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y citotóxico sobre tres líneas cancerosas humanas (KB, BC y NCI-H187) y una línea celular no cancerosa (células Vero). De manera general, los compuestos mostraron moderada actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas, únicamente la acremoxantona A (**121**) mostró actividad significativa sobre *Candida albicans*. Los cuatro metabolitos carecen de actividad antituberculosis. La acremoxantona B (**122**) y la acremonidina C (**151**) presentaron notable actividad antipalúdico, y todos los compuestos muestran actividad citotóxica sobre las cuatro líneas celulares. El hongo *Acremonium* sp. (endófito 101) también produce las acremoxantonas A (**121**) y B (**122**).

Finalmente, cabe mencionar que el hongo endófito *Acremonium* sp. aislado de *Bursera simaruba* a diferencia de los microorganismos mencionados anteriormente, es el único capaz de producir tres de los cuatro grupos de compuestos estrechamente relacionados. (xantoquinodinas, acremonidinas y acremoxantonas).

8.8. METABOLITOS SECUNDARIOS DE *BURSERA SIMARUBA* (L.) SARG. (BURSERACEAE)

Bursera simaruba es un árbol que llega a medir hasta 30 m de altura, conocido como palo mulato, chacáh o chaca. Esta especie se distribuye en toda la vertiente del Golfo de México y del Océano Pacífico; desde el sur de Tamaulipas y San Luis Potosí hasta Yucatán y Quintana Roo, y desde Sinaloa hasta Chiapas, desarrollándose en una gran variedad de condiciones ecológicas. En el estado de Quintana Roo está ampliamente distribuido y constituye un elemento primario o secundario de las selvas altas y medianas subperennifolias y medianas subcaducifolias (Cabrera *et al.*, 1982; Gutiérrez Báez *et al.*, 2011).

El palo mulato es utilizado como cerca viva, la madera se utiliza para elaborar mangos de herramientas. Es también utilizado en la península de Yucatán como planta medicinal, además, la resina de este árbol es utilizada como remedio contra la irritación alérgica provocada por *Metopium brownei*.

A partir de la resina de *B. simaruba* se aislaron y caracterizaron seis triterpenos; el lup-20(29)-en-3 β 23-diol, el lupeol, el epilupeol, el epiglutinol, la α -amirina y la β -amirina (Peraza-Sánchez *et al.*, 1995; Nakanishi *et al.*, 2005; Akihisa *et al.*, 2005). Así como, tres lignanos; las metil- β -peltatinas A y B y la picropoligamaina (Nakanishi *et al.*, 2005; Noguera *et al.*, 2004).

Es importante hacer notar que los metabolitos secundarios aislados de éste árbol no tienen, hasta el momento, relación química con los metabolitos producidos por su endófito *Acremonium* sp.

9. CONCLUSIONES

El análisis de las características macroscópicas y microscópicas del hongo endófito 101 aislado de hojas sanas de *Bursera simaruba* permitió establecer que pertenece al género *Acremonium*. El presente proyecto constituye el quinto reporte de una especie del género *Acremonium* como endófito de una planta dicotiledónea.

El estudio químico del extracto orgánico del micelio del hongo endófito *Acremonium* sp. condujo al aislamiento de seis metabolitos secundarios con actividad antioomiceto y citotóxica, de los cuales la desacetilxantoquinodina J (**123**) constituye un metabolito secundario novedoso. Esto pone de manifiesto la importancia de seleccionar microorganismos que habitan en nichos biológicamente diversos como es el de los hongos endófitos; donde las complejas interacciones competitivas que establecen con una gran variedad de bacterias, hongos, oomicetos y la propia planta hospedera, son un factor que impulsa el desarrollo de mecanismos de defensa químicos como los metabolitos secundarios antimicrobianos.

Los extractos orgánicos de *Acremonium* sp. mostraron un mayor potencial antioomiceto que antifúngico sobre los microorganismos fitopatógenos evaluados. Adicionalmente, se observó que aproximadamente la mitad de los oomicetos fitopatógenos utilizados presentan resistencia al metalaxil, fungicida de elección para el tratamiento de estos microorganismos, lo que pone en evidencia la urgencia de prescindir de este agroquímico que lleva más de tres décadas en el mercado.

El estudio químico de las fracciones primarias bioactivas del extracto orgánico del micelio de *Acremonium* sp., permitió el aislamiento y caracterización de un policétido heterodimérico de hidroxantona y oxantrona novedoso, la desacetilxantoquinodina J (**123**) y de cinco metabolitos conocidos; la xantoquinodina J (**120**), las acremonidinas A y B (**124** y **125**), y las acremoxantonas A y B (**121** y **122**).

Se identificó la presencia de todos los compuestos aislados de las fracciones primarias activas en cultivos sólidos y líquidos, poniendo de manifiesto que se trata de productos naturales y no de productos de degradación debidos al tiempo de almacenaje de las fracciones primarias. Además, se corroboró la estabilidad metabólica y viabilidad del hongo endófito *Acremonium* sp., como cepa productora de metabolitos secundarios bioactivos, después de seis años de su aislamiento.

Hasta el momento, esta es la primera ocasión en que son descritos de un sólo microorganismo, metabolitos secundarios de la clase de las xantoquinodinas, acremonidinas y cremoxantonas; y donde puede presumirse una relación en su biogénesis. Además, de constituir el primer reporte de este grupo de compuestos producidos por un hongo endófito.

La xantoquinodina J (**120**) y la desacetilxantoquinodina J (**123**), así como la acremonidina B (**125**) presentaron el mayor potencial antioomiceto a la concentración de prueba que fue de 10 μ M, siendo la xantoquinodina J (**120**) el compuesto más activo y que puede competir con metalaxil, al menos en el control de *Phytophthora cinnamomi*, el principal patógeno del aguacate en México.

Los metabolitos secundarios aislados a partir de *Acremonium* sp. mostraron ser citotóxicos con seis líneas celulares cancerosas humanas a una concentración de 50 μ g/mL, en tanto que, no mostraron toxicidad sobre la viabilidad de macrófagos murinos, evaluados al doble de la concentración, sugiriendo así, un potencial anticancerígeno promisorio.

Con los resultados derivados de la actividad antioomiceto y citotóxica de los metabolitos secundarios producidos por *Acremonium* sp. no es posible establecer una correlación que permita sustentar que los oomicetos puedan servir como un modelo para la evaluación preeliminar de compuestos con potencial anticancerígeno.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar taxonómicamente hasta especie al hongo endófito *Acremonium* sp., empleando la secuencia del RNA ribosomal de la subunidad pequeña (18s).
- Monitorear la producción de los principales metabolitos secundarios producidos por *Acremonium* sp. desde los 10 y hasta los 60 días de crecimiento en cultivos líquidos y sólidos. Identificar los metabolitos secundarios que son producidos en medio sólido y evaluar su actividad antioomiceto y citotóxica.
- Determinar la concentración inhibitoria media de los metabolitos secundarios aislados de *Acremonium* sp., sobre el crecimiento de los oomicetos fitopatógenos evaluados y sobre las líneas tumorales humanas utilizadas.
- Evaluar la actividad antioomiceto de algunos fármacos usados en la terapia contra el cáncer, como el taxol, la camptotecina y la adriamicina, para determinar si existe sensibilidad por parte de los oomicetos a algunos anticancerígenos debida a la similitud de los sitios diana en mamíferos y poder así, establecer su posible utilidad cómo modelo para la evaluación preeliminar de compuestos con potencial anticancerígeno.
- Evaluar la toxicidad ambiental de los policétidos heterodiméricos producidos por el endófito *Acremonium* sp. sobre el pez *Oncorhynchus mykiss*, invertebrados acuáticos como *Daphnia magna* Straus, y algas como *Pseudokirchneriella subcapitata*.
- Establecer de manera preliminar la inocuidad de los compuestos bioactivos aislados mediante la evaluación de su toxicidad aguda (DL₅₀) en ratones, y de su mutagenicidad en bacterias.

11. EPÍLOGO

Al los fitopatógenos...

Diminuto germen embajador de la muerte

¿Eres tú, pequeño amigo,
Simpático argonauta de los vientos
Que golpeado por el brazo de Eolo
Arrojado a la deriva del céfiro
Acogido entre mis brazos,
Quien ahora disipa la paz,
Quien arroba mi sueño?

¿Eres tú pequeño amigo,
Aquella esférula diminuta
Que alimenté con mi calor,
Mi sabia, mi tiempo,
A quien le crecieron garras
Y ahora hiende mi cuerpo?

¿Eres tú, quien con pequeñas uñas desgarras mi cutícula?
¿Es la caída prematura de mis frutos de carne secos
Antaño succulentos, lo que me produce esta tristeza?
¿Eres tú quien cunde este pigmento diabólico
Que perturba el equilibrio metabólico?

¿Eres tú, quien con diminutas herramientas perfora mi carne?
¿Aquél que construye una catedral de esporas
En la mácula clorótica de la muerte bajo mis hojas?
Es tuya esa minúscula maquinaria haustoria
Que succiona mi sabia y me mata de hambre?

¿Has sido enviado desde un lejano país,
Diminuto bandido sideróforo,
Para explotar el metal precioso de mi raíz?
¿O eres un conquistador llegado de otro continente,
Pequeño germen diplomático embajador de la muerte?

...CMG

12. REFERENCIAS

- Agrios G. N. (2005) Plant Pathology. 5^a Ed. El Sevier Academic Press. USA
- Ahmed I., Hussain H., Schulz B., Draeger S., Padula D., Pescitelli G., van-Ree T. y Krohn K. (2011) Three new antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. Eur. J. Org. Chem. 2867-2873
- Aneja M., Gianfagna T. J., Hebbar P. K. (2005) *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 67:304-307
- Akihisa T., Franzblau, S., Ukiya, M., Okuda, H., Zhang, F., Yasukawa, K., Suzuki, T. y Kimura, Y. (2005) Antitubercular Activity of Triterpenoids from Asteraceae Flowers, Biol. Pharm. Bull. 28: 158-160
- Arnone A., Assante G., Bava A., Dallavalle S., y Nasini G. (2009) Acremines H–N, novel prenylated polyketide metabolites produced by a strain of *Acremonium byssoides*. Tetrahedron 65:786-791
- Assante G., Dallavalle S., Malpezzi L., Nasini G., Burruano S. y Torta L. (2005) Acremines A–F, novel secondary metabolites produced by a strain of an endophytic *Acremonium*, isolated from sporangiophores of *Plasmopara viticola* in grapevine leaves. Tetrahedron 61:7686-7692
- Bardsley E., Wegener M. y Tafforeau S. (2006) Field development of Infinito® for late blight control in potatoes. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 59(2-3):281-292
- Beakes G. W., Glockling S. L. & Sekimoto S. (2011) The evolutionary phylogeny of the oomycete “fungi”. Protoplasma. Springer-Verlag
- Begum P., Hashidoko Y. Islam T., Ogawa Y. y Tahara S. (2002) Zoosporicidal activities of anacardic acids against *Aphanomyces cochlioides*. Z. Naturforsch. 57: 874-882
- Bérdy J. (2005) Bioactive Microbial Metabolites. A Personal View. J. Antibiot. 58(1): 1-26, 2005
- Burruano S., Alfonzo A., Lo-Piccolo S., conigliaro G., mondello V., Torta L., Moretti M. y Assante G. (2008) Interaction between *Acremonium byssoides* and *Plasmopara viticola* in *Vitis vinifera*. Phytopathol. Mediterr. 47:122-131

- Buysens S., Heungens K., Poppe J. y Höfte M. (1996) Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. Applied and environmental microbiology. 62(3): 865-871
- Cabrera E., Sousa M., Téllez O. y López A. (1982). Imágenes de la Flora Quintanarroense. Centro de Investigaciones de Quintana Roo, A.C., México, D.F.
- Cohen Y. y Samoucha Y. (1984) Cross resistance to four systemic fungicides in metalaxyl resistant strains of *Phytophthora infestans* and *Pseudoperonospora cubensis*. Plant Disease. 68:137-139
- Dai J., Krohn K., Flörke U., Gehle D., Aust H. J., Draeger S., Schulz B., y Rheinheimer J. (2005) Novel highly substituted biraryl ethers, phomopsines D–G, isolated from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Adenocarpus foliolosus*. Eur. J. Org. Chem. 5100-5105
- Daivdse L. C., Gerritsma M. O., Ideler J., Pie K. y Velthuis G. C. (1988) Antifungal modes of action of metalaxyl, cyprofuram, benalaxyl and oxadixyl in phenylamide-sensitive and phenylamideresistant strains of *Phytophthora megasperma* f. sp. *medicaginis* and *Phytophthora infestans*. Crop Protection. 7:347-355
- Demain A. L. (2009) Antibiotics: natural products essential to human health. Medicinal Research Reviews. 29(6):821-842
- Dubey N.K., Shukla R., Kumar A., Singh P. y Prakash B. (2011) Global scenario on the application of natural products in integrated pest management programmes. En: Natural products in plant pest Management. Ed. Nawal K. Dubey. CABI, UK.
- Ducrot P.-H. (2001) *Cercospora beticola* toxins. NMR studies and chemical behaviour. Chemistry. 4:273-283
- Dzido T. H. y Tuzimski T. (2008) Chambers, sample application, and chromatogram development. In: Thin layer chromatography in phytochemistry. Chromatographic science series. Vol. (99). Eds. Waksmundzka-Hajnos M., Sherma, J. y Kowalska, T. USA
- Eschen L., Draeger T., Teichert A., Wessjohann L., Westermann B., Rrosahl S., y Arnold N. (2009) Antioomycete activity of γ -oxocrotonate fatty acids against *Phytophthora infestans*. J. Agric. Food Chem. 57: 9607-9612
- Faeth S. H. (2002) Are endophytic fungi defensive plant mutualists? OIKOS 98: 25–36.

- Fravel D. R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005. 43:337-359
- Fugelstad J. (2008) Cellulose biosynthesis in oomycetes. (Licentiate thesis) AlbaNova University Centre. Stockholm Sweden
- Fujimoto H., Asai T., Kim Y. O. y Ishibashi M. (2006) Nine constituents including six xanthone-related compounds isolated from two Ascomycetes, *Gelasinospora santiflorii* and *Emericella quadrilineata*, found in a screening study focused on immunomodulatory activity. *Chem. Pharm. Bull.* 54(4):550-553
- Ganguli B. N, Deshmukh, S. K. (2007) *Fungi. Multifaceted Microbes.* Anamaya Publishers. New Delhi.
- Gao F. K., Dai C. C. y Liu X. Z. (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *African Journal of Microbiology Research.* 4(13): 1346-1351
- Gigant B., Cormier A., Dorléans A., Ravelli R. B. y Knossow M. (2009) Microtubule-destabilizing agents: structural and mechanistic insights from the interaction of colchicine and vinblastine with tubulin. *Topics in Current Chemistry.* 286:259-278
- Gisi U., Chin K. M., Knapova G., Kung R., Mohr U., Parisi S., Sierotzki H. Y Steinfeld U. (2000) Recent developments in elucidating modes of resistance to phenilamide, DMI and strobilurin fungicides. *Crop Protection.* 19:863-872
- Glenn A. E., Bacon C. W., Price R., Hanlin R. T. (1996) Molecular phylogeny of *Acremonium* and its taxonomic implications. *Mycologia*, 88(3): 369-383.
- Gloer J. B. (2007) Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. In: *The Mycota IV: Environmental and Microbial Relationships*, 2nd Edition. Kubicek C.P. y Druzhinina I. S. (Eds.). Cap 15. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg
- Gond S.K., Verma V.C., Mishra A., Kumar A. y Kharwar R.N. (2010) Role of fungal endophytes in plant protection. En: *Management of fungal plant pathogens.* Ed. Arun Arya y Analía Edith Perelló. CAB International
- Govers F., y Gijzen M. (2006) Phytophthora genomics: The plant destroyer's genome decoded. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(12):1295-1301
- Govers F., Meijer H.J.G., Tran Ha, Wagemakers L. y Raaijmakers J.M. (2009) Unraveling the senses of *Phytophthora*; Leads to novel control strategies? *Acta Hort.* 834:41-50

- Graupner P. R., Thornburgh S., Mathieson J. T., Chapin E. L., Kemmittc G. M., Brown J. M. y Snipes C. E. (1997) Dihydromaltophilin; A novel fungicidal tetramic acid containing metabolite from *Streptomyces* sp. The Journal of Antibiotics. 50(12):1014-1019
- Gunatilaka L. A. (2006) Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. J. Nat. Prod. 69: 509-526.
- Gutiérrez-Báez C., Ortiz-Díaz J. J., Flores-Guido J. S., Zamora-Crescencio P., Domínguez-Carrasco M. R. y Villegas P. (2011) Estructura y composición florística de la selva mediana subcaducifolia de Nohalal-Sudzal chico, Tekax, Yucatán, México. Foresta Veracruzana. 13(1):7-14
- Guzman G. (1998) Inventorying the fungi of Mexico. Biodiversity and Conservation. 7:369-384
- Hawksworth D. (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revisited. Mycol. Res. 105:1422-1432
- Hausbeck M. K. y Lamour K. H. (2004) *Phytophthora capsici* on vegetable crops: research progress and management challenges. Plant Disease. 88(12):1292-1303
- He H., Bigelis R., Solum E., Greenstein M. y Carter G. (2003) Acremonidins, New polyketide-derived antibiotics produced by *Acremonium* sp., LL-Cyan 416. The Journal of Antibiotics. 56(11): 923-930
- Hoffman A. M., Mayer S. G., Strobel G. A., Hess W. M., Sovocool G. W., Grange A. H., Harper J. K., Arif A. M, Grant D. M. y Kelley-Swift E. G. (2008) Purification, identification and activity of phomodione, a furandione from an endophytic *Phoma* species. Phytochemistry. 69:1049-1056
- Howell C. R. y Stipanovic R. D. (1980) Supression of *Pythium ultimum*-induced damping-off cotton sedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. Phytopathology. 70(8):712-715
- Hollomon D. W. (2009) Fungicides for Plant Diseases. In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester
- Hussain H., Krohn K., Draeger S., Meier K. y Schulz B. (2009a) Bioactive chemical constituents of a sterile endophytic fungus from *Melilotus dentatus*. Rec. Nat. Prod. 3(2): 114-117

- Hussain H., Akhtar N., Draeger S., Schulz B., Pescitelli G., Salvadori P., Antus S., Kurtán T., y Krohn K. (2009b) New bioactive 2,3-epoxycyclohexenes and isocoumarins from the endophytic fungus *Phomopsis* sp. from *Laurus Azorica*. Eur. J. Org. Chem. 749-756
- Huang Z., Cai X., Shao C., She Z., Xia X., Chen Y., Yang J., Zhou S., y Lin Y. (2008) Chemistry and weak antimicrobial activities of phomopsins produced by mangrove endophytic fungus *Phomopsis* sp. ZSU-H76. Phytochemistry. 69:1604-1608
- Hwang B. K., Lee J. Y., Kim B. S. y Moon S. S. (1996) Isolation, structure elucidation, and antifungal activity of a manumycin-type antibiotic from *Streptomyces flaveus*. J. Agric. Food Chem. 44:3653-3657
- Isaka M., Palasarn S., Auncharoen P., Komwijit P. y Jones G. (2009) Acremoxanthenes A and B, novel antibiotic polyketides from the fungus *Acremonium* sp. BCC 31806. Tetrahedron Letters. 50:284-287
- Jiao P. (2006) Chemical investigations of freshwater and fungicolous fungi. (Doctor thesis) University of Iowa.
- Kachi H. y Sassa T. (1986) Isolation of moniliphenone, a key intermediate in xanthone biosynthesis from *Monilinia fructicola*. Agric. Biol. Chem. 50(6):1669-1671
- Kamoun S. (2003) Molecular genetics of pathogenic oomycetes. Eukaryotic Cell. 2(2):191-199
- Kanokmedhakul S., Kanokmedhakul K., Phonkerd N., Soyong K., Kongsaree P. y Suksamrarn A. (2002) Antimycobacterial anthraquinone-chromanone compound and diketopiperazine alkaloid from the fungus *Chaetomium globosum* KMITL-N0802. Plant. Med. 68:834-836.
- Kawahara N., Sekita S., Satake M., Udegawa S. I. y Kawai K. I. (1994) Structures of a new dihydroxanthone derivate, nidulalin A, and a new benzophenone derivate, nidulalin B, from *Emericella nidulans*. Chem. Pharm. Bull. 42(9):1720-1723
- Kingsland S. y Barrow R. (2009) Identification of chaetoviridin E from a cultured microfungus, *Chaetomium* sp. and structural reassignment of chaetoviridins B and D. Aust. J. Chem. 62:269-274
- Knight V., Sanglier J., DiTullio D., Braccili S., Bonner-P., Waters J., Hughes D. y Zhang L. (2003) Diversifying microbial natural products for drug discovery. Appl. Microbiol. Biotechnol. 62:446-458
- Koneman R., 1987. Micología. Prácticas de Laboratorio. Editorial Panamericana, Buenos Aires

- Krohn K., Kock I., Elsässer B., Flörke U., Schulz B., Draeger S., Pescitelli G., Antus S. y Kurtán T. (2007) Bioactive natural products from the endophytic fungus *Ascochyta* sp. from *Melilotus dentatus* - configurational assignment by solid-state CD and TDDFT calculations. *Eur. J. Org. Chem.* 1:123-1129
- Kuck K. H. y Gisi U. (2007) FRAC Mode of Action Classification and Resistance Risk of Fungicides. In: *Modern Crop Protection Compounds*. Eds. W. Krämer y U. Schirmer. Wiley-VCH. Germany:415-432
- Latijnhouwers M., Wit P. y Govers F. (2003) Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology.* 11(10):462-469
- Lee J. Y., Moon S. S. y Hwang B. K. (2003a) Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* Strain MM-B16. *Applied and Environmental Microbiology.* 69(4): 2023-2031
- Lee J. Y., Moon S. S. y Hwang B. K. (2003b) Isolation and in vitro and in vivo activity against *Phytophthora capsici* and *Colletotrichum orbiculare* of phenazine-1-carboxylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* strain GC-B26. *Pest Manag. Sci.* 59:872-882
- Lee J. Y., Sherman D. H. y Hwang B. K. (2004) In vitro antimicrobial and in vivo antioomycete activities of the novel antibiotic thiobutacin. *Pest Manag. Sci.* 64:172-177
- Li J. Y., Strobel G., Harper J., Lobkovsky E., y Clardy J. (2000) Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org. Lett.* 2(6):767-770
- Li J. Y., Strobel G. A. (2001) Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry.* 7:261-265
- Li E., Jiang L., Guo L., Zhang H., y Che Y. (2008) Pestalachlorides A-C, antifungal metabolites from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis adusta*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 16:7894-7899
- Li H. Q., Li X. J., Wang Y. L., Zhang Q., Zhang A. L., Gao J. M. y Zhang X. C. (2011) Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba*. *Biochemical Systematics and Ecology.* (In press):1-4
- Liu L., Liu S., Chen X., Guo L., y Che Y. (2009) Pestalofones A–E, bioactive cyclohexanone derivatives from the plant endophytic fungus *Pestalotiopsis fici*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* 17:606-613

- Loesgen S., Bruhn T., Meindl K., Dix I., Schulz B., Zeeck A., y Bringmann G. (2011) (+)-Flavipucine, the missing member of the pyridione epoxide family of fungal antibiotics. *Eur. J. Org. Chem.* 5156-5162
- Lu H., Zou W. X., Meng J. C., Hu J., Tan R. X. (2000) New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science* 151:67-73
- Macías-Rubalcava M., Hernández B. B., Jiménez E. M., González M. C., Glenn A. E., Hanlin R. T., Hernández O. S. Saucedo G. A., Murià G. J., Anaya A. L. (2008) Naftoquinone spiroketal with allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry* 69: 1185-1196.
- Mead R., Curnow, R.N., Hasted, A. M. (2002) *Statistical methods in agriculture and experimental biology*. 3rd Ed. Chapman and Hall. Crc, Boca Raton, Florida. USA
- Mikes V., Lavernet S., Milat M.-L., Collange E., Pâris M., Blein J.-P. (1994) *Cercospora beticola* toxins. Part VI: preliminary studies of protonation and complexation equilibria. *Biophysical Chemistry*. 52:259-265
- Milat M. L. y Blein J. P. (1993) The yellow toxins produced by *Cercospora beticola*. Part II: isolation and structure of beticolins 3 and 4. *Tetrahedron Letters*. 34(9):1483-1486
- Montesinos E. (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int. Microbiol.* 6:245-252.
- Mueller G. M., Bills, G. F., Foster, M. S. (2004) *Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods*. Elsevier Academia Press.
- Muriá-González M. J. (2007) Búsqueda de actividad antifúngica y fitotóxica en algunos hongos endófitos aislados de hojas de árboles de la selva mediana subperenifolia de Quintana Roo (Tesis de licenciatura). Facultad de Química, UNAM.
- Nakanishi T., Inatomi, Y., Murata, H., Shigeta, K., Iida, N., Inada, A., Murata, J., Farrera, M., Iinuma, M., Tanaka, T., Tajima, S. y Oku, N. (2005) A New and Known Cytotoxic Aryltetralin-Type Lignans from Stems of *Bursera graveolens*, *Chem. Pharm. Bull.* 53: 229-231
- Noguera B., Díaz, E., García, M.V., San Feliciano, A., López-Perez, J.L. e Israel, A. (2004) Anti-inflammatory activity of leaf extract and fractions of *Bursera simaruba* (L.) Sarg (Burseraceae). *Journal of Ethnopharmacology* 92: 129-133
- O'Brien P. A., Williams N. y Hardy G. E. (2009) Detecting Phytophthora. *Critical Reviews in Microbiology*. 35(3):169-181

- Oliveros-Bastidas A. de J. (2008) El fenómeno alelopático. el concepto, las estrategias de estudio y su aplicación en la búsqueda de herbicidas naturales. *Revista Química Viva*. 1(7):1-34
- Onions A. H y Brady B. L. (1987) Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: Biotechnology Handbooks No 1. *Penicillium* and *Acremonium*. Ed. Jonh Peberdy. Plenum Press. New York. 1-12
- Park H. J., Lee J. Y., Moon S. S. y Hwang B. K. (2003) Isolation and anti-oomycete activity of niasol from *Anemarrhena asphodeloides* rhizomes. *Phytochemistry* 64: 997-1001
- Park J. H., Gyung J. C., Hyang B. L., Kyoung M. K., Hack S. J., Seon-Woo L., Kyoung S. J., Kwang Y. C. y Jin-Cheol K. (2005) Griseofulvin from *Xylaria* sp. strain F0010, an endophytic fungus of *Abies holophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15(1):112-117
- Park H. J., Lee J. Y., Hwang I. S., Yun N. S., Kim B. S. y Hwang B. K. (2006) Isolation and antifungal and antioomycete activities of staurosporine from *Streptomyces roseoflavus* strain LS-A24. *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3041-3046
- Peraza-Sánchez S., Peña-Rodríguez L. (1992) Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. *J. Nat. Prod.* 12 1768-1 771
- Peraza-Sánchez S., Salazar-Aguilar N., Peña-Rodríguez L. (1995) A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. *J. Nat. Prod.* 58(2) 271-274
- Phillips A. J., Anderson V. L., Robertson E., Secombes C. J. y Van West P. (2007) New insights into animal pathogenic oomycetes. *Trends in Microbiology*. 16(1):13-19
- Rimando A. M., Duke S. O. (2006) Natural products for pest management. ACS symposium series. American Chemical society. Washington DC USA.
- Rustérucci C., Milat M. L. y Blein J. P. (1996) *Cercospora beticola* toxins. Determination of O_2^- scavenging activity of beticolin-1. *Phytochemistry*. 42(4):979-983
- Russell, P. E. (2005) A century of fungicide evolution. Centenary review. *Journal of Agricultural Science*. 143:11-25.
- Sánchez-Pérez J. L. (2007) Identificación de marcadores asociados a la resistencia del aguacate raza mexicana (*Persea americana* mill. var. *drymifolia*) al oomiceto *Phytophthora cinnamomi* rands. (Tesis de doctorado) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

- Sassa T. (1991) Overproduction of moniliphenone, a benzophenone biosynthetic intermediate of chloromonilicin, by *Monilinia fructicola* and its anthraquinone precursors. *Agric. Biol Chem.* 55(1):95-99
- Saxena S. y Pandey A. K. (2001) Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55:395-403
- Schulz B., Boyle C., Draeger S., Römmert A. K. y Krohn K. (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* 106 (9) : 996-1004
- Schulz B., Boyle, C. (2005) The endophytic continuum. *Review. Mycol. Res.* 109(6): 661-686.
- Seto Y., Takahashi K., Matsuura H., Kogami Y. y Nabeta K. (2007) Novel cyclic peptide, epichlicin, from the endophytic fungus, *Epichloe typhina*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 71(6):1470-1475.
- Shim S. H., Kim J. K., Jang S. y Choi G. (2009) Anti-oomycete activity of furanocoumarins from seeds of *Psoralea corylifolia* against *Phytophthora infestans*. *Plant Pathol. J.* 25(1): 103-107
- Shim S. H., Baltrusaitis J., Gloer J. B., y Wicklow D. T. (2011) Phomalevones A-C: Dimeric and pseudodimeric polyketides from a fungicolous hawaiian isolate of *Phoma* sp. (Cucurbitariaceae). *J. Nat. Prod.* 74(3):395-401
- Shimai T., Islam T., Fukushi Y., Hashidoko Y., Yokosawa R. y Tahara S. (2002) nicotinamide and structurally related compounds Show Halting Activity against zoospores of the phytopathogenic fungus *Aphanomyces cochlioides*. *Z. Naturforsch.* 57: 323-331
- Silva G. H., Telesa H. L., Trevisana E. C., Bolzani V. S., Young M. C., Pfenning L. H., Eberlind M. N., Haddad R., Costa-Neto C. M. y Araújo A. R. (2005) New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. *J. Braz. Chem. Soc.* 16(6B):1463-1466
- Smith K., Evans D. A. y El-Hiti G. A. (2008) Role of modern chemistry in sustainable arable crop protection. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363: 623-637
- Son S.W., Kim H.Y., Choi G.J., Lim H.K., Jang K.S., Lee S.O., Lee S., Sung N.D. y Kim J.-C. (2008) Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *Journal of Applied Microbiology.* 104: 692-698

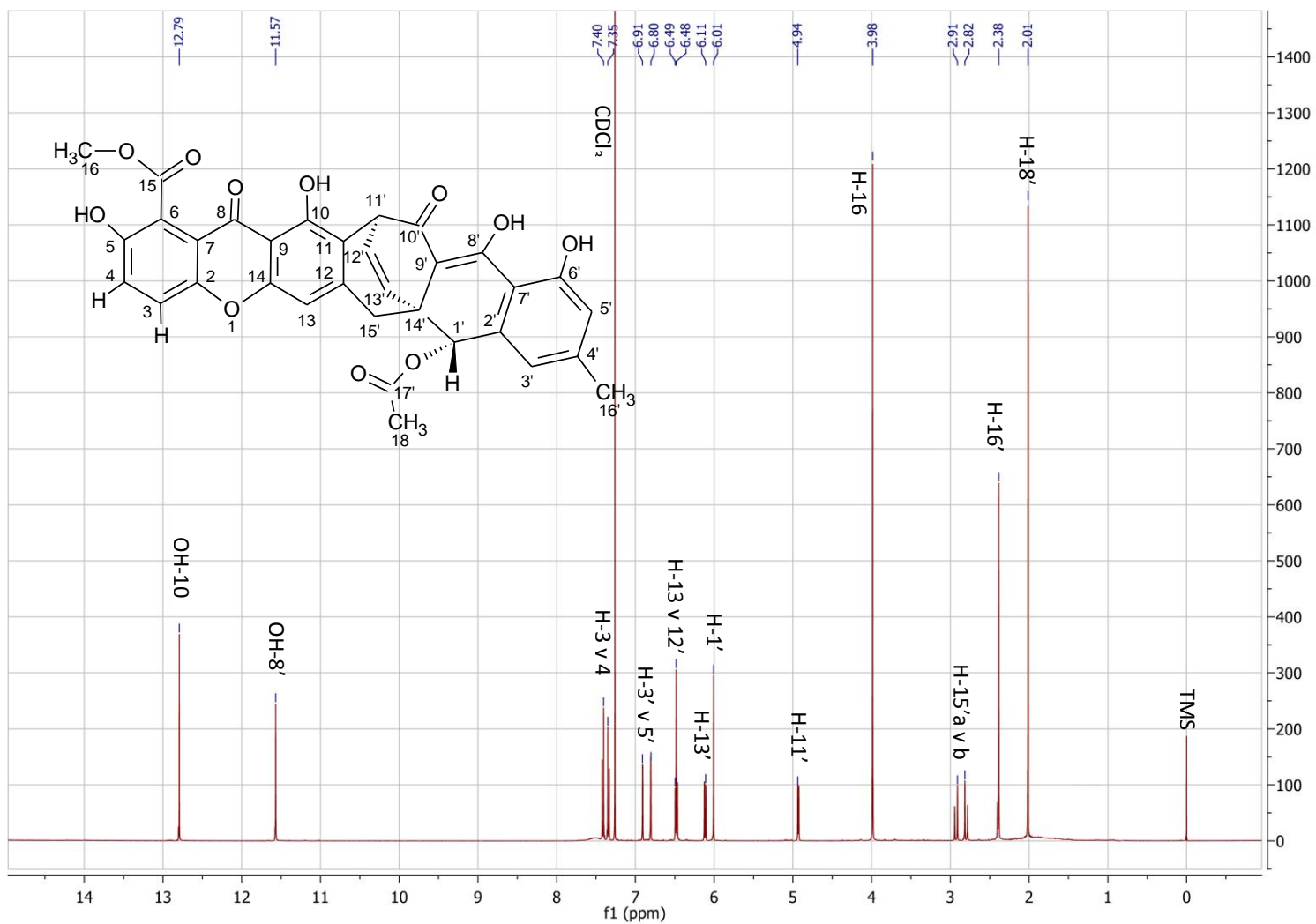
- Song Y. C., Huang W. Y., Sun C., Wang F. W. Y Tan R. X. (2005) Characterization of Graphislactone A as the antioxidant and free radical-scavenging substance from the culture of *Cephalosporium* sp. IFB-E001, an endophytic fungus in *Trachelospermum jasminoides*. *Biol. Pharm. Bull.* 28(3):506-509
- Strange R. N. y Scott P. R. (2005) Plant Disease: A threat to global food security. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:83-116
- Strobel G. A., Torczynski R., y Bollon A. (1997) *Acremonium* sp. a leucinostatin A Producing endophyte of European yew (*Taxus baccata*). *Plant Science.* 128:97-108
- Strobel G., Li J. Y., Sugawara F., Koshino H., Harper J. Y Hess W. M. (1999a) Oocydin A, a chlorinated macrocyclic lactone with potent anti-oomycete activity from *Serratia marcescens*. *Microbiology.* 145: 3557-3564
- Strobel G. A., Miller R. V., Martinez-Miller C., Condrón M. M., Teplow D. B. y Hess W. M. (1999b) Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. *Microbiology.* 145:1919-1926
- Strobel G., Ford E., Worapong J., Harper J. K., Arif A. M., Grant D. M., Fung P. C.W., Chau R. M. W. (2002) Isopestacin, an isobenzofuranone from *Pestalotiopsis microspora*, possessing antifungal and antioxidant activities. *Phytochemistry* 60:179-183
- Strobel G., Daisy, B., Castillo, U., Harper, J. (2004) Natural Products from Endophytic Microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67: 257-268.
- Summerbell R.C., Gueidan C., Schroers H-J., de Hoog G.S., Starink M., Rosete Y. A., Guarro J. y Scott J.A. (2011) *Acremonium* phylogenetic overview and revision of *Gliomastix*, *Sarocladium*, and *Trichothecium*. *Studies in Mycology* 68: 139-162.
- Tabata N., Suzumura Y., Tomoda H., Masuma R., Haneda K., Kishi M., Iwai Y. y Omura S. (1993) Xanthoquinodins, new anticoccidial agents produced by *Humicola* sp. Production, isolation and physico-chemical and biological properties. *The Journal of Antibiotics.* 40(5):749-755
- Tabata N., Tomoda H., Iwai Y. y Omura S. (1996) Xanthoquinodin B3, a New Anticoccidial Agent Produced by *Humicola* sp. FO-888. *The Journal of Antibiotics.* 49(3): 267-271
- Tan R. X., Zou W. X. (2001) Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.*, 18, 448-459.
- Tejesvi M. y Pirttilä A. (2011). Potential of tree endophytes as sources for new drug compounds. En: *Endophytes of forest trees*. Pirttilä A. y Frank C. Springer, USA. 295-311.

- Tyler B. M. (2007) *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete. *Molecular Plant Pathology*. 8(1):1-8
- Ueda J.-Y., Takagi M. y Kazuo S.-Y. (2010) New xanthoquinodin-like compounds, JBIR-97, -98 and -99, obtained from marine sponge-derived fungus *Tritirachium* sp. SpB081112MEf2. *The Journal of Antibiotics*. 63:615-618
- West P. V., Appiah A. A. y Gow N. A. (2003) Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62:99- 113
- Whisson, S. C. (2010) *Phytophthora*. In: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Wicklow D. T., Roth S., Deyrup S. T. y Gloer J. B. (2005) A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol. Res.* 109(5):610-618
- Wu S. H., Chen Y. W., Shao S. C., Wang L. D., Li Z. Y., Yang L. Y., Li S. L., y Huang R. (2008) Ten-membered lactones from *Phomopsis* sp., an endophytic fungus of *Azadirachta indica*. *J. Nat. Prod.* 71:731-734
- Yoganathan K., Cao S., Crasta S., Aitipamula S., Whitton S. R., Ng S., Buss A. D. y Butler M. S. (2008) Microsphaerins A-D, four novel benzophenone dimers with activity against MRSA from the fungus *Microsphaeropsis* sp. *Tetrahedron* 64:10181-10187
- Yoon M. Y., Choi G. J., Choi Y. H., Jang K. S., Park M. S., Cha B. y Kim J.C. (2010) Effect of polyacetylenic acids from *Prunella vulgaris* on various plant pathogens. *Letters in Applied Microbiology* 51:511-517
- Yu H., Zhang L., Li L., Zheng C., Guo L., Li W., Sun P. Y Qin L. (2010). Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*. (165): 437-449.
- Yue Q., Miller C. J., White J. F., y Richardson M. D. (2000) Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae*. *J. Agric. Food Chem.* 48: 4687-4692
- Zhang C. L., Zheng B. Q., Lao J. P., Mao L. J., Chen S. Y., Kubicek C. P. y Lin F. C. (2008a) Clavatul and patulin formation as the antagonistic principle of *Aspergillus clavatonanicus*, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78:833-840
- Zhang H. W., Huang W. Y., Chen J. R., Yan W. Z., Xie D. Q. y Tan R. X. (2008b) Cephalosol: An antimicrobial metabolite with an unprecedented skeleton from endophytic *Cephalosporium acremonium* IFB-E007. *Chem. Eur. J.* 14:10670-10674

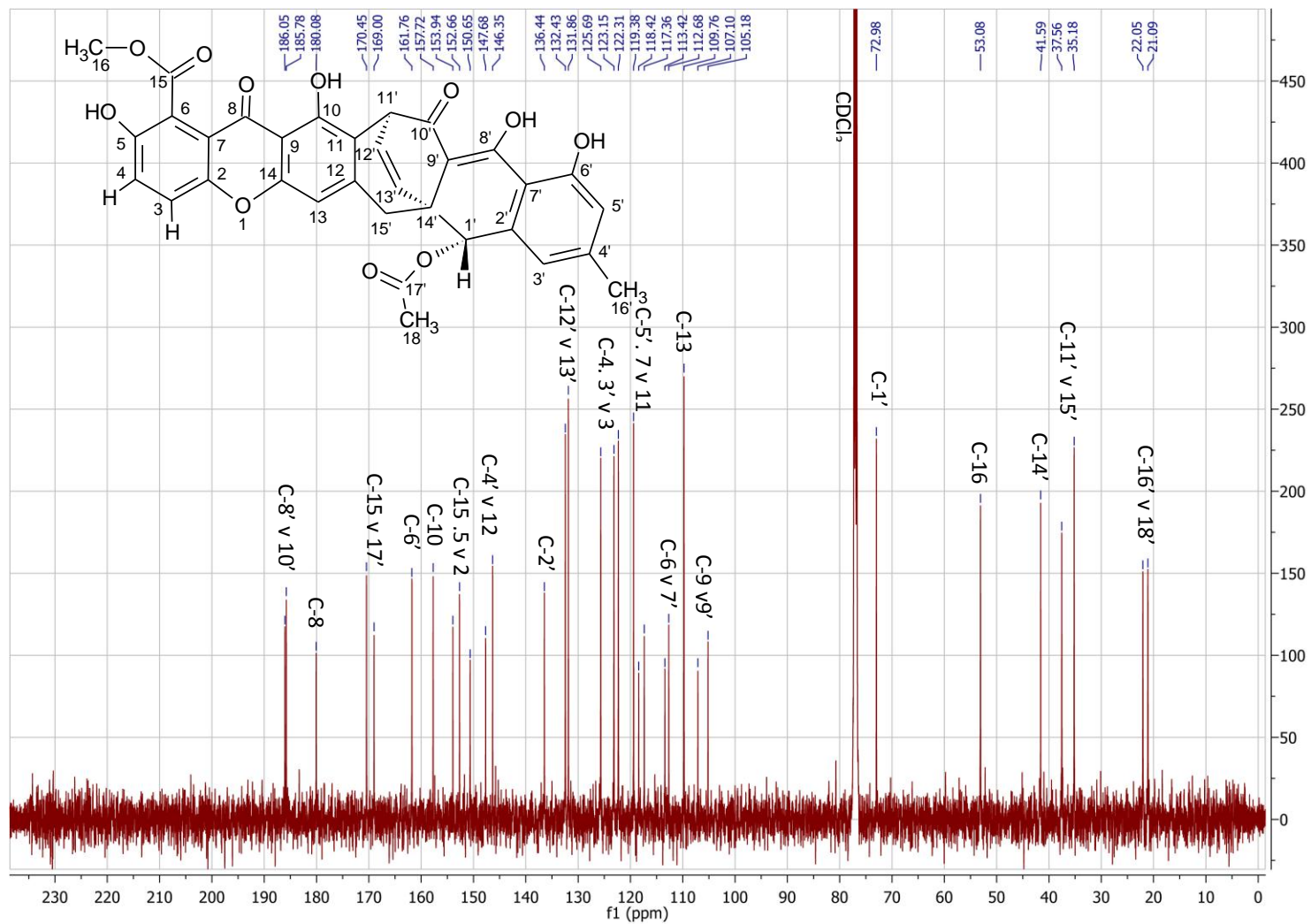
Zhang W., Krohn K., Draeger S., y Schulz B. (2008c) Bioactive Isocoumarins Isolated from the Endophytic Fungus *Microdochium bolleyi*. J. Nat. Prod. 71:1078-1081

Zou W. X., Meng J. C., Lu H., Chen G. X., Shi G. X., Zhang T. Y., y Tan R. X. (2000) Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. J. Nat. Prod. 63:1529-1530

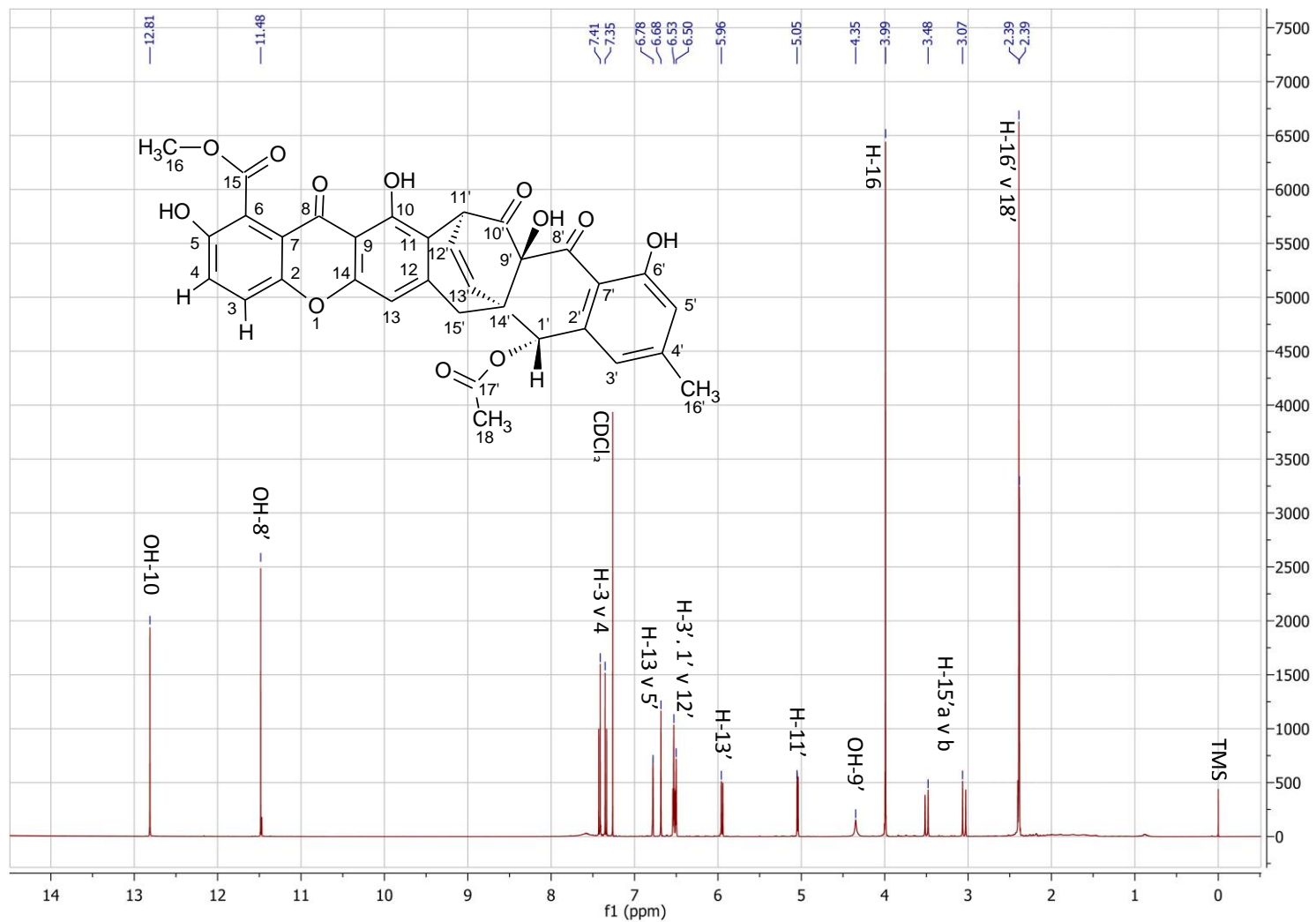
13. ANEXO



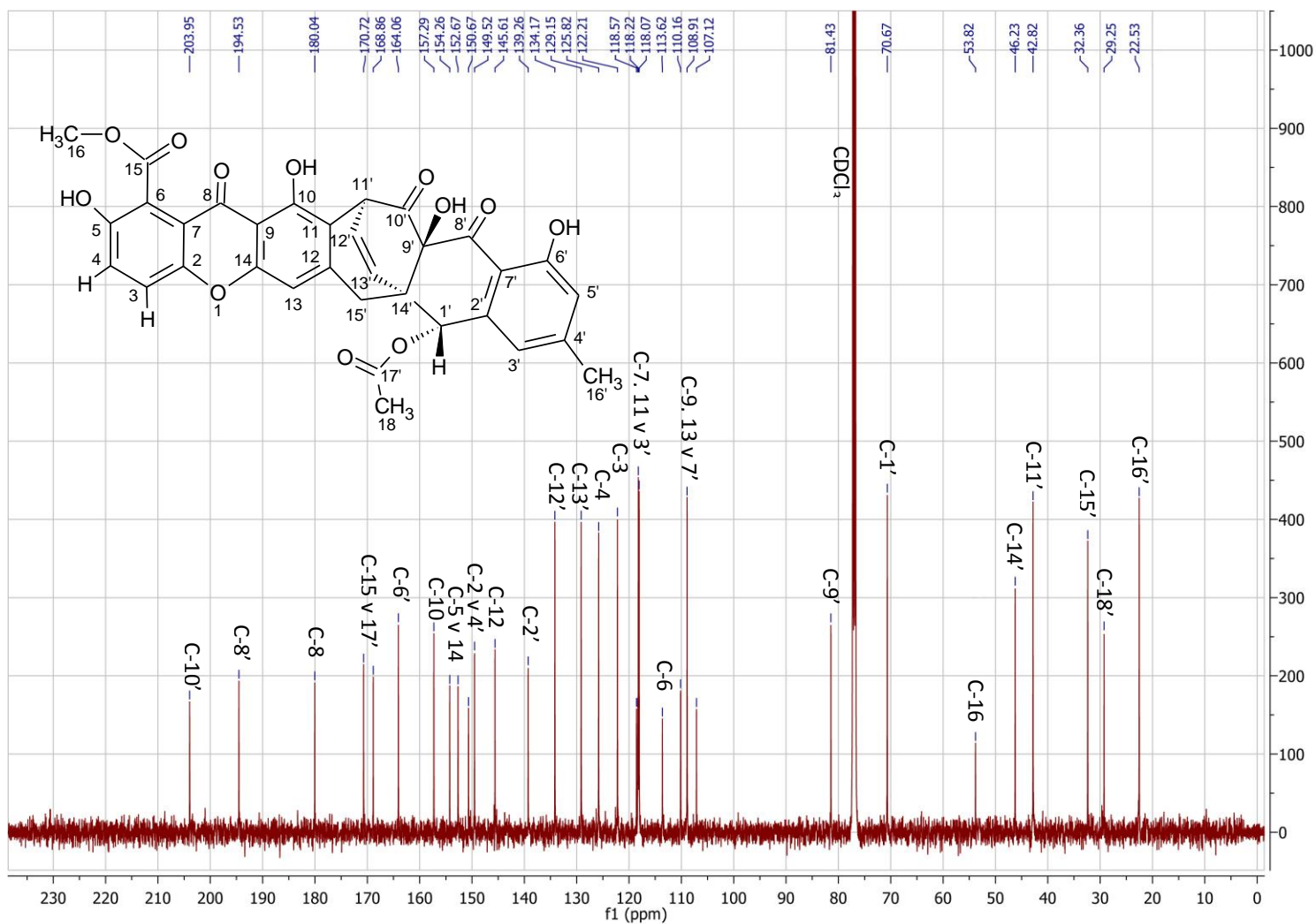
Espectro 1. RMN- ^1H (500 MHz CDCl_3) de la cremoxantona A (**121**)



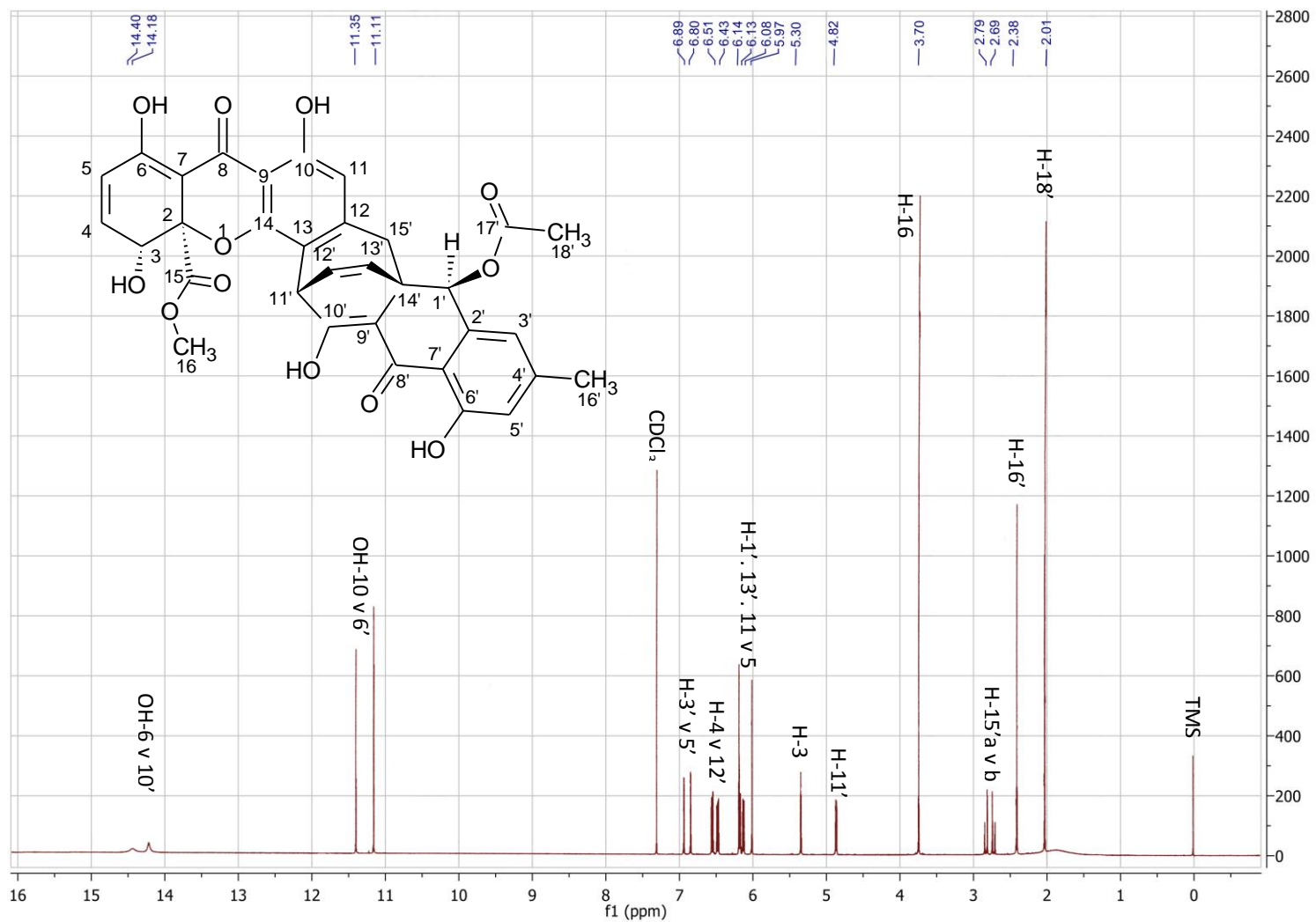
Espectro 2. RMN- ^{13}C (125 MHz CDCl_3) de la acremoxantona A (121)



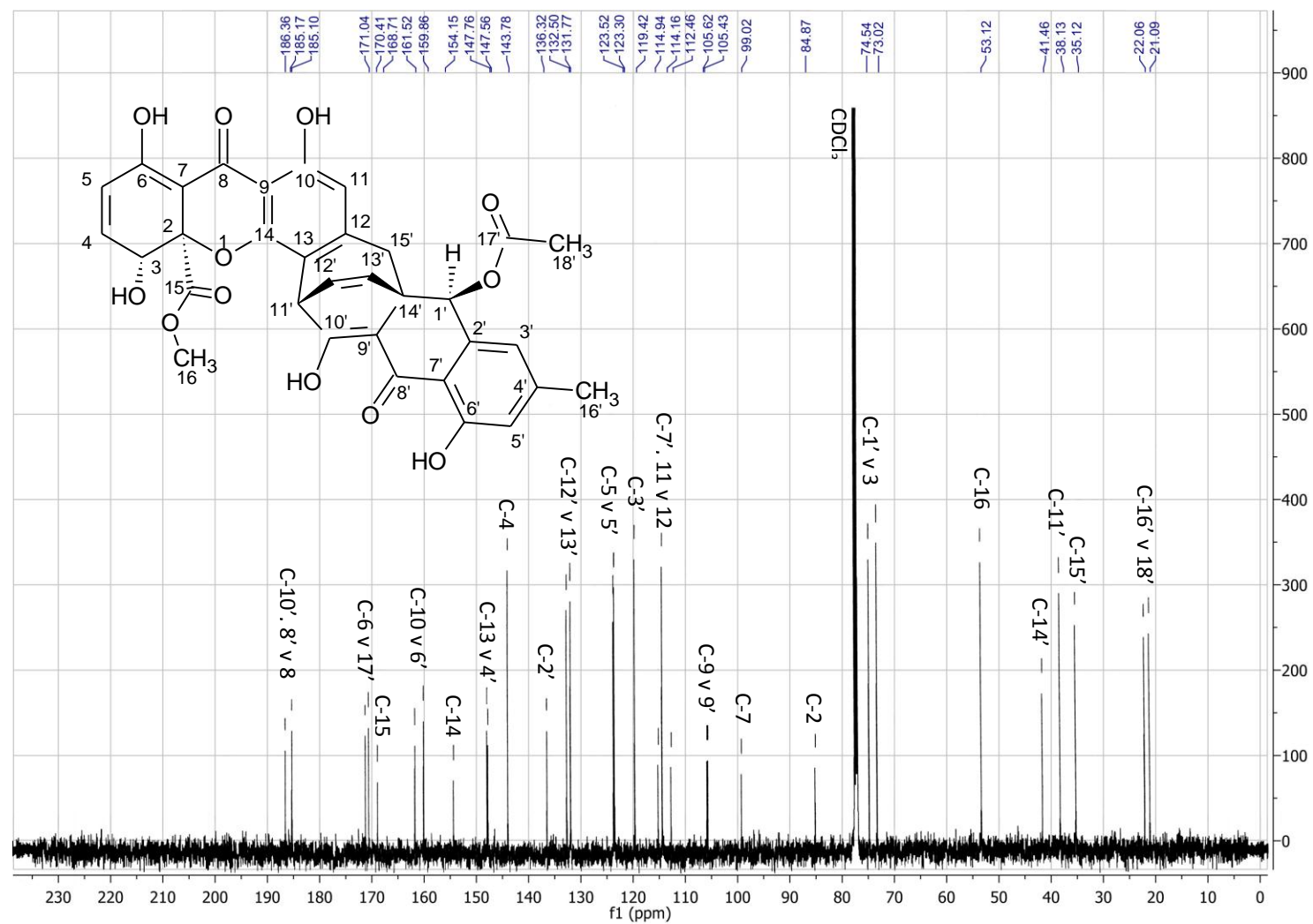
Espectro 3. RMN- ^1H (500 MHz CDCl_3) de la acremoxantona B (122)



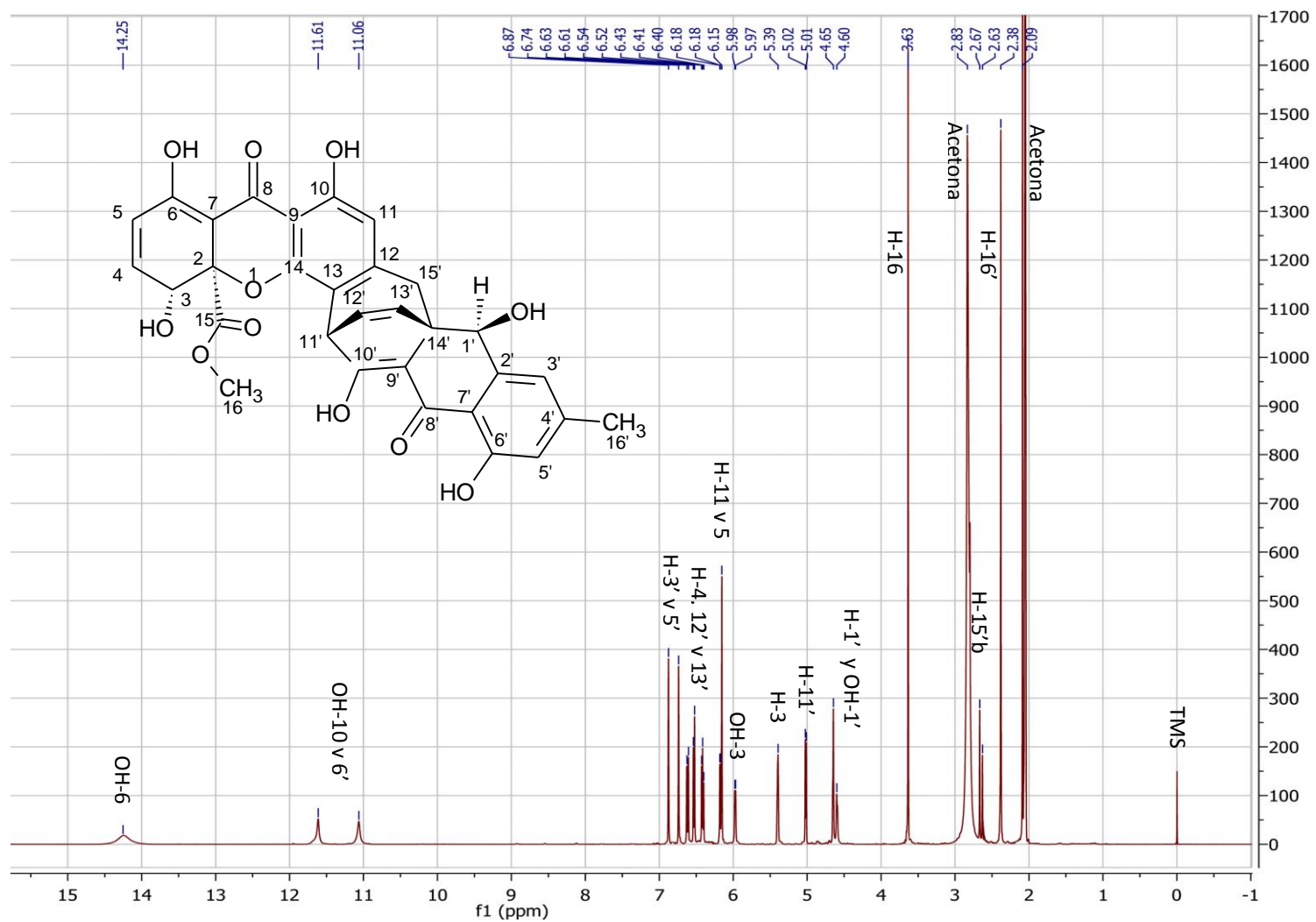
Espectro 4. RMN- ^{13}C (125 MHz CDCl_3) de la acremoxantona B (122)



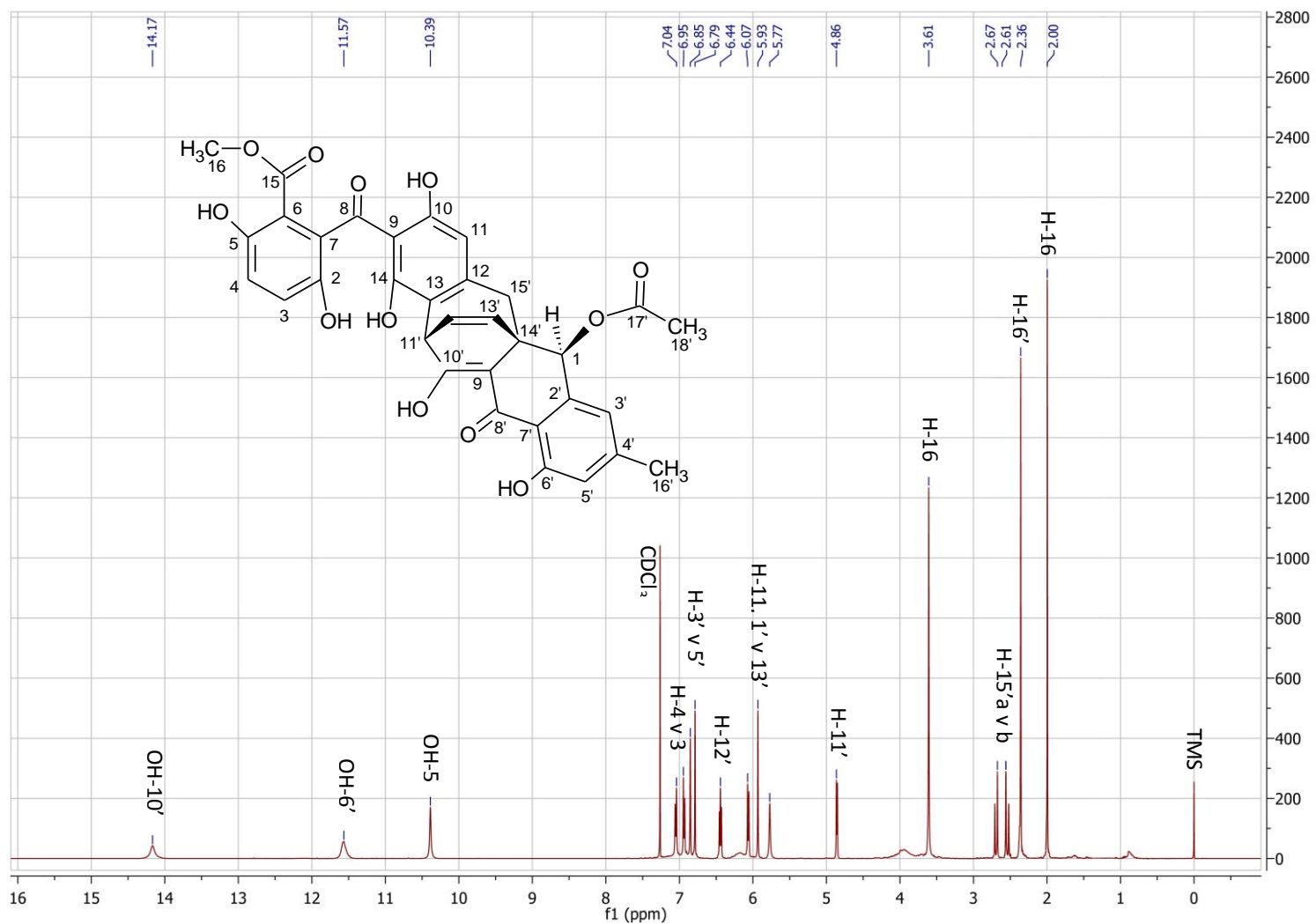
Espectro 5. RMN- ^1H (500 MHz CDCl_3) de la xantoquinodina J (**120**)



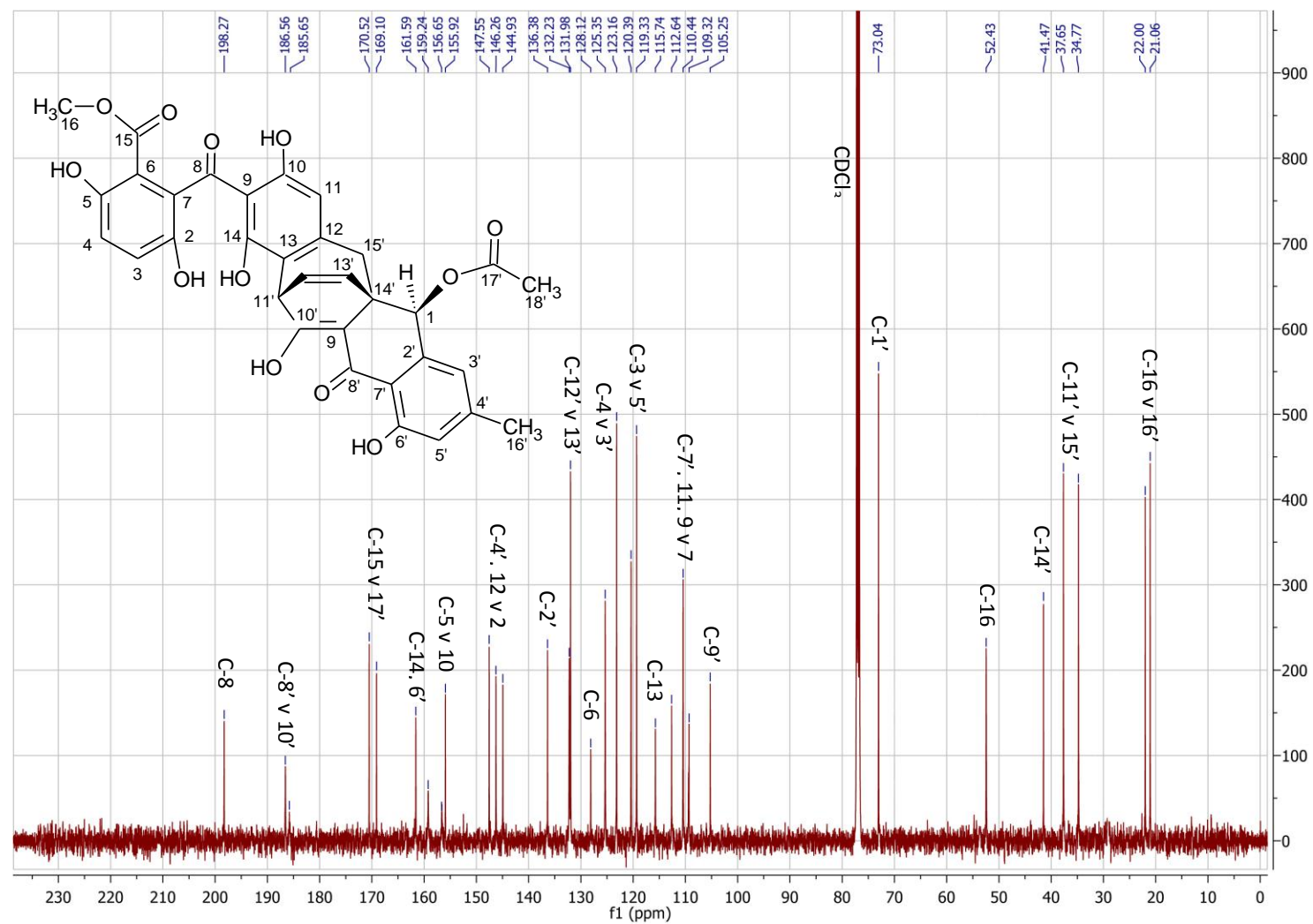
Espectro 6. RMN- ^{13}C (125 MHz CDCl_3) de la xantoquinodina J (120)



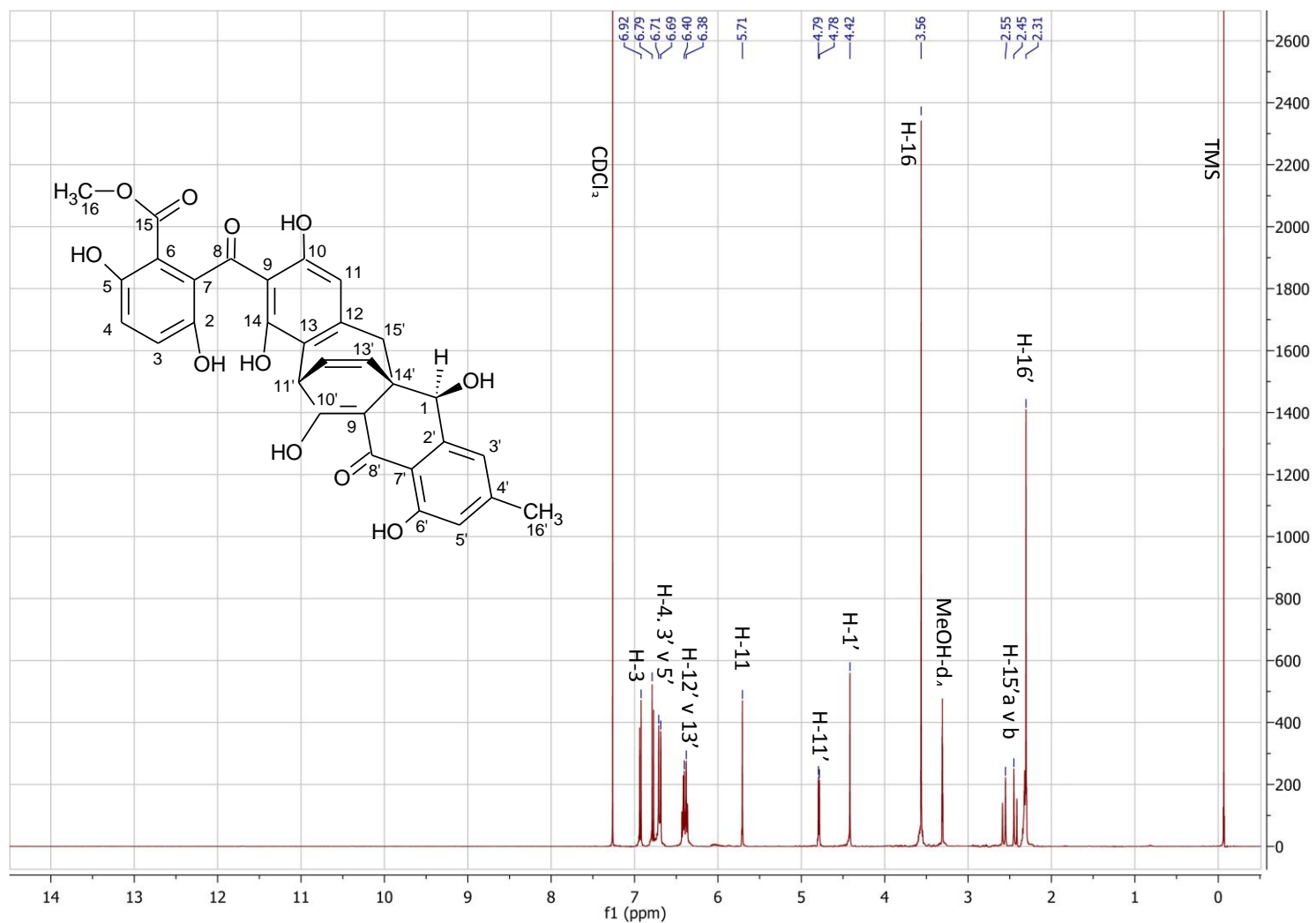
Espectro 7. RMN- ^1H (500 MHz $\text{Acetona-}d_6$) de la desacetil xantoquinodina J (**123**)



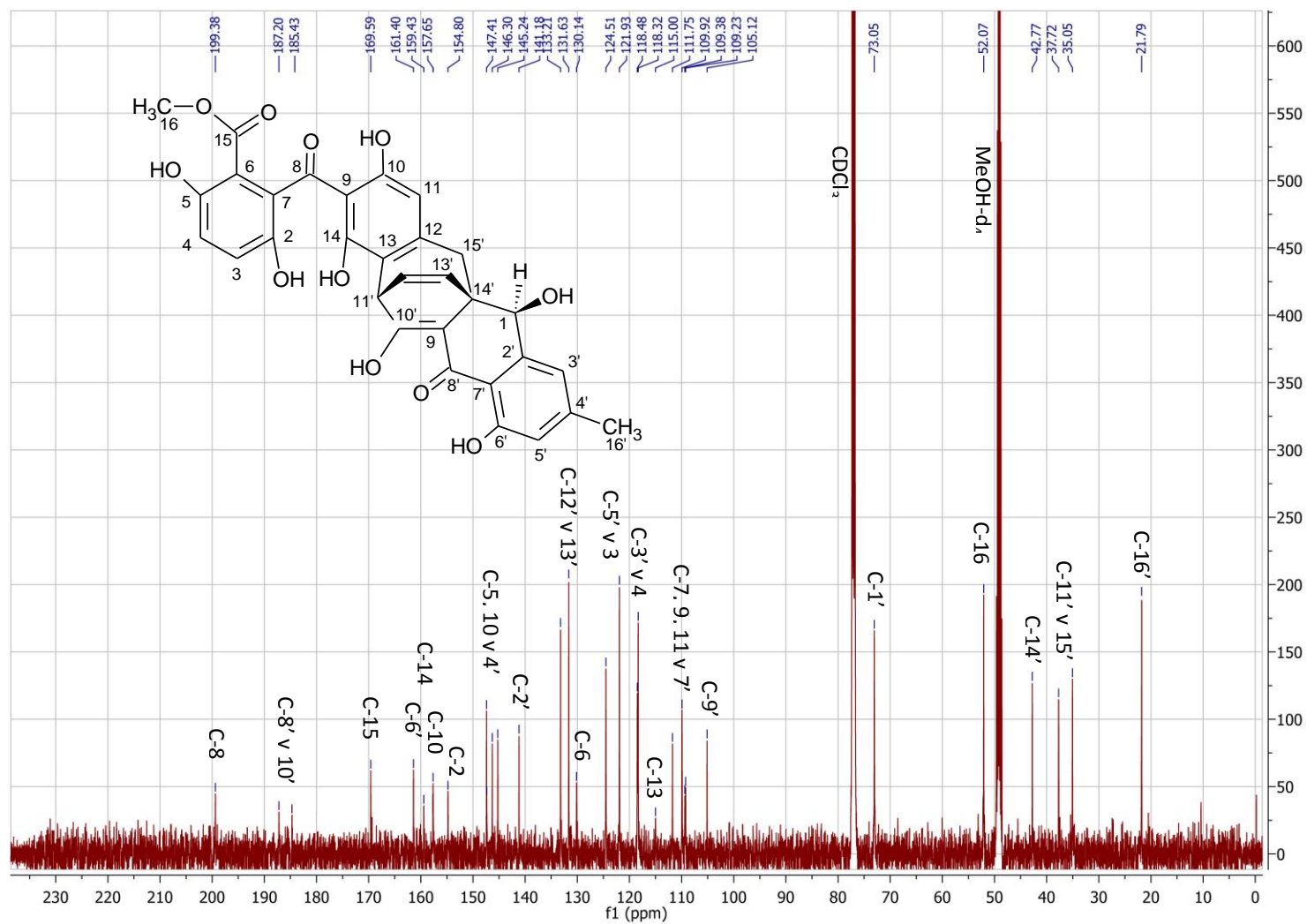
Espectro 9. RMN- ^1H (500 MHz CDCl_3) de la acremonidina A (**124**)



Espectro 10. RMN- ^{13}C (125 MHz CDCl_3) de la acromonidina A (124)



Espectro 11. RMN-¹H (500 MHz CDCl₃ + MeOH-*d*₄) de la acremonidina B (125)



Espectro 12. RMN-¹³C (125 MHz CDCl₃ + MeOH-*d*₄) de la acremonidina B (125)