



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**



**BÚSQUEDA DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA Y FITOTÓXICA EN ALGUNOS
HONGOS ENDÓFITOS AISLADOS DE HOJAS DE ÁRBOLES DE LA SELVA
MEDIANA SUBPERENIFOLIA DE QUINTANA ROO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

Mariano Jordi Murià González

MÉXICO, D.F.

AÑO 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Prof. Maria Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Prof. Jose Manuel Mendez Stivalet
Secretario	Prof. Ana Luisa Anaya Lang
1er. Suplente	Prof. Elena Guadalupe Ramírez López
2º. Suplente	Prof. Jose Fausto Rivera Cruz

Laboratorio de Alelopatía, Instituto de Ecología, UNAM

Asesora:

Dra. Ana Luisa Anaya Lang

Supervisora técnica:

Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Sustentante:

Mariano Jordi Muriá González

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico otorgado a los proyectos *Algunos aspectos de la ecología química de hongos asociados a plantas de Quintana Roo*, proyecto PAPIIT IN217603 y *Papel de los hongos endófitos en la defensa de las plantas*, proyecto PAPIIT IN230107; mismos a los que agradezco la beca que me proporcionaron.

A mis dos asesoras, la Dra. Ana Luisa Anaya Lang y la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, ambas del Instituto de Ecología de la UNAM, por haberme guiado en la realización de la presente investigación, por haberme apoyado y motivado desde mi ingreso al Laboratorio de Aleopatía.

A la Q.A. Blanca Estela Hernández Bautista por su apoyo incondicional durante todo el desarrollo de este proyecto, por hacer que los días más pesados de trabajo fueran llevaderos y agradables.

Al Dr. Manuel Jiménez Estrada del Instituto de Química de la UNAM, por su participación y consejos.

Al Dr. Francisco Hernández Luis por la ayuda proporcionada en la determinación del punto de fusión de los compuestos.

A la M. en C. Aurora Saucedo García por su valiosa ayuda en el trabajo estadístico.

Al Ing. Abel Blancas de la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM por su gran ayuda.

A mi compañero y amigo Claudio Meléndez González por su inestimable apoyo y compañía.

A las laboratoristas, María Teresa Caudillo Estrada y Laura Rodríguez Ávila por la ayuda que me otorgaron.

A mi querida familia que siempre me ha apoyado durante toda mi trayectoria académica.

A Montserrat por aguantarme y animarme cuando las cosas no salían bien.

A Santiago (AEHCM) por ser un grupo que me ha ayudado a liberarme del estrés.

A todos los compañeros del Laboratorio de Aleopatía del Instituto de Ecología de la UNAM con los cuales he pasado gratos momentos.

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a todos ustedes, las personas que estimo, y que me han acompañado durante este trabajo y más. A mi familia, mis amigos, asesoras, compañeros, maestros y, muy particularmente, a Montserrat. A todos, les doy las gracias por haber estado a mi lado siempre que los he necesitado, sin ustedes, el tiempo y trabajo que invertí en este proyecto no hubiera sido tan grato como lo fue, por lo tanto, esta tesis es para ustedes.

	Pagina
INDICE	
LISTA DE CUADROS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
PRÓLOGO	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. La ecología	3
2.1.1. La ecología química	4
2.2. La alelopatía	5
2.3. Las plantas	5
2.4. Los hongos	6
2.4.1. La diversidad de los hongos	7
2.4.2. Los hongos endófitos	7
2.4.3. Relación endófito-planta	8
2.4.4. Evolución de los hongos endófitos	10
2.4.5. Metabolismo secundario de los hongos endófitos	10
3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVOS	32
4.1. Objetivo general	32
4.2. Objetivos particulares	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1. Hongos endófitos	34
5.2. Organismos de prueba	34
5.2.1. Microorganismos fitopatógenos	34
5.2.2. Plantas	35
5.3. Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de los 14 hongos endófitos seleccionados.	35
5.3.1. Selección del medio de cultivo.	35
5.3.2. Obtención de los cultivos en pequeña escala	36

	Pagina
5.4. Obtención de los extractos orgánicos del medio y del micelio de los catorce endófitos	37
5.4.1. Extracción de los micelios.	37
5.4.2. Extracción de los medios de cultivo.	37
5.5. Determinación de la actividad biológica de los extractos obtenidos del medio de cultivo y del micelio de los catorce endófitos	37
5.5.1. Determinación del potencial fungitóxico	37
5.5.2. Determinación del potencial fitotóxico	38
5.6. Cultivo en mediana escala del hongo 101	38
5.7. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico obtenido del micelio del endófito 101.	39
5.7.1. Técnicas cromatográficas generales	39
5.7.2. Fraccionamiento primario	39
5.7.3. Obtención de la xantoquinodina J (69).	39
5.8. Caracterización de la xantoquinodina J (69).	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
6.1. Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de los catorce hongos endófitos seleccionados.	42
6.2. Obtención de los extractos orgánicos del medio y del micelio de los catorce endófitos	43
6.3. Determinación de la actividad biológica de los extractos obtenidos del medio de cultivo y del micelio de los catorce endófitos	45
6.4. Hongo seleccionado para el fraccionamiento biodirigido	48
6.5. Fermentación a mediana escala y obtención de los extractos	48
6.6. Fraccionamiento biodirigido del extracto activo del hongo endófito 101	49
6.7. Fraccionamiento primario del extracto del micelio obtenido de la fermentación a mediana escala.	50
6.8. Aislamiento del metabolito secundario mayoritario presente en la fracción primaria XII del extracto del micelio del endófito 101.	51

	Página
6.9. Caracterización de la xantoquinodina J (69).	51
6.10. Determinación del potencial aleloquímico de la Xantoquinodina J (69).	66
6.11. Metabolitos secundarios de <i>Bursera simaruba</i>	68
7. CONCLUSIONES	70
8. PERSPECTIVAS	72
9. EPÍLOGO	73
10. REFERENCIAS	74
11. ANEXO (ESPECTROS)	83
Espectro 1. Espectro de IR (pastilla de KBr) de la xantoquinodina J (69)	84
Espectro 2. Espectro de masas (IE) de la xantoquinodina J (69)	85
Espectro 3. RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69)	86
Espectro 4. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69)	87
Espectro 5. Espectro HSQC (500 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69)	88
Espectro 6. Acercamiento del espectro HSQC de la xantoquinodina J (69)	89
Espectro 7. Espectro DEPT (125 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69)	90
Espectro 8. Espectro COSY (500 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69)	91
Espectro 9. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69)	92
Espectro 10. Espectro HMBC (500 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69)	93

LISTA DE CUADROS

	Pagina
Cuadro 1.1. Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.	12
Cuadro 5.1. Clave de los endófitos trabajados y su planta hospedera	
Cuadro 5.2. Medios de cultivo seleccionados para el desarrollo de los microorganismos.	35
Cuadro 5.3. Condiciones óptimas para el cultivo del endófito 101.	39
Cuadro 5.4. Fraccionamiento primario del extracto orgánico obtenido del micelio del endófito 101 cultivado a mediana escala en condiciones estáticas.	40
Cuadro 6.1. Medios elegidos para realizar los cultivos	43
Cuadro 6.2. Rendimiento de los extractos del micelio y el medio de cultivo obtenidos en las fermentaciones en condiciones estáticas y en agitación.	44
Cuadro 6.3. Efecto de los extractos del micelio obtenidos de los cultivos en agitación sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).	46
Cuadro 6.4. Efecto de los extractos del medio obtenidos de los cultivos en agitación sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).	46
Cuadro 6.5. Efecto de los extractos del micelio obtenidos de los cultivos estáticos sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).	47
Cuadro 6.6. Efecto de los extractos del medio obtenidos de los cultivos estáticos sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).	47
Cuadro 6.8. Rendimiento de las fracciones primarias obtenidas.	50
Cuadro 6.9. Xantoquinodina J (69) aislada del extracto del micelio del hongo endófito 101.	52
Cuadro 6.10. Constantes espectroscópicas de IR, de UV y espectrométricas de la xantoquinodina J (69).	53
Cuadro 6.11. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) y de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de la xantoquinodina J (69).	54
Cuadro 6.12. Concentraciones inhibitorias medias de la Xantoquinodina J (69) y el testigo positivo (Captan ®) para los microorganismos fitopatógenos.	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1. La relación entre el huésped (hongo endófito) y el hospedero (planta) está definida por el equilibrio entre sus defensas.	9
Figura 6.1. Efecto de los extractos del micelio y el medio de cultivo del hongo endófito 101 sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.	49
Figura 6.2. Efecto de los extractos del micelio y el medio de cultivo del hongo endófito 101 sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.	51
Figura 6.3. Estructura de la xantoquinodina J (69).	64
Figura 6.4. Vista estereoscópica de la xantoquinodina J (69).	65
Figura 6.5. Inhibición causada por el extracto miceliar del hongo 101, la fracción XII y la xantoquinodina J (69) sobre los organismos de prueba	66
Figura 6.6. Estructuras de una xantoquinodina (xantoquinodina B1) y una beticolina (xantoquinodina 13).	67
Figura 6.7. Metabolitos secundarios encontrados en <i>Bursera simaruba</i>	69
Figura 7.1 Xantoquinodina J (69) (C: gris, H: blanco, O: rojo)	71

PRÓLOGO

SIMBIOSIS

Aquel día... se aprovechó de mi momento de debilidad. Estaba yo plantada en medio aquel verde espacio, aguardando algo, con angustiosa calma. Mi vida se va en esperar. Un hombre y una mujer que parecían embriagados de amor se me acercaron esa tarde y ahí, justo enfrente de mi, ignorándome, se besaron apasionadamente, aprovecharon la penumbra que nos cubría para acariciarse metiendo sus manos bajo la ropa, quería dejar de ver pero me era imposible, me quede hipnotizada con aquel ir y venir de besos, risas y gemidos apagados. Me había distraído de ellos tan solo un momento cuando sentí una punzada de dolor que tuve que tragarme porque no pude gritar, la navaja del hombre me había penetrado y fue cuando todo comenzó, a la vista de esos dos. El germen entró sin que yo lo deseara.

Palpitas dentro de mí, siento como me abarcas lentamente y creces, me irradas con tu vida nueva pero a la vez me consumes, rasgando mis entrañas para alimentarte con mi carne (si es que así le puedo llamar a esta materia fibrosa y dura). Por un lado me das fuerza para aguantar las inclemencias del tiempo: las tempestuosas lluvias, el penetrante frío del norte y el abrasador sol de verano; me renuevas en las enfermedades, me levantas airosa de entre mis depredadores, soy yo y más, somos juntos algo nuevo y mejor.

Te bebes diariamente toda mi sangre, he dejado que me tomes y arranques pedazos de mi esencia para después llenar los huecos con la tuya, consiguiendo así vivir un poco más, ver cosas que no podría haber visto de otra manera; no sé si agradecerte o recriminarte esta invasión. Yo no te esperaba, sin embargo tu pequeña espora se metió en mí y germinó dolorosa y plazeramente en mi seno, revolucionando mi entorno, dimensionándolo, dándole una profundidad que no sospechaba. Ahora, me haces darme cuenta de lo intrincadas que son las relaciones en las que nos encontramos inmersos: una red más compleja que la tela de una araña, sin embargo alguien nos ve y le parece tan sencillo.

Ahora siento tu compañía pero sé que es hipócrita, porque cuando envejezca tomarás ventaja de mi falta de fuerza y comenzarás a tomar lo que quede de mí, sé también que enfermaré por tu culpa, que cuando muera te alimentarás de mí como las hienas de una

gacela, mis entrañas serán tu manjar y me consumiré como una fruta que se seca bajo el sol, y tú, que ahora abarcas mi cuerpo, quedarás libre para ir a poner tu simiente en otras que no lo esperan.

Ahora me das buena vida a costa de la savia que te bebes, mis hojas son más lustrosas que antes y contigo la espera es más leve. Cuando lo que busco llegue, estarás aquí y me ayudarás a recibirlo.

Todavía no sé si amarte u odiarte mientras pueda hacer alguna de las dos, mientras llega mi hora, la que desde ése día esperaba y no llegó, llegaste tu primero, mi pequeño microorganismo quitinoso.

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo se llevó a cabo dentro del proyecto “Algunos aspectos de la ecología química de hongos asociados a plantas de Quintana Roo” PAPIIT-UNAM IN217603 (Anaya y González, 2005), cuyo principal objetivo fue la investigación sobre las especies de hongos que se asocian con algunas plantas de la selva y comunidades de la vegetación secundaria de este estado de la República, y tratar de discernir qué clase de asociaciones se establecen entre ambos tipos de organismos. En este proyecto se colectaron las hojas de algunas especies de árboles y arbustos de la Reserva Ecológica El Edén, Q. Roo, en dos épocas distintas del año (lluvias y secas), con el fin de aislar los hongos endófitos asociados con ellas. Se realizaron diversos bioensayos de antagonismo entre los endófitos aislados y se seleccionaron los que presentaron mayor potencial antagónico.

El mencionado proyecto contribuyó al conocimiento del potencial antagónico de los hongos endófitos aislados, el cual, como se comprobó, está directamente relacionado con el potencial aleloquímico de los mismos. Los hongos mas antagónicos y /o sus metabolitos secundarios bioactivos, podrían ser investigados desde el punto de vista de su potencial como controles biológicos de plagas y/o el desarrollo de nuevos agroquímicos y fármacos. Otra contribución científica importante de este proyecto, fue el descubrimiento de nuevos géneros y especies de hongos endófitos, lo que permitió ampliar el conocimiento sobre la diversidad de hongos que habitan en las selvas bajas y medianas de la Península de Yucatán.

Para el presente trabajo, se utilizaron catorce de los hongos endófitos, aislados durante la colecta en época de lluvias del mencionado proyecto, seleccionados por su potencial antagónico. Con estos endófitos se realizaron cultivos de los cuales se obtuvieron extractos orgánicos, tanto del medio de cultivo como del micelio de cada uno de ellos, y éstos fueron ensayados biológicamente con el fin de determinar su potencial antifúngico y fitotóxico. Con base en los resultados de estos bioensayos, se seleccionó un hongo endófito para realizar un cultivo a mediana escala, obtener sus extractos y realizar un fraccionamiento biodirigido con objeto de obtener los compuestos responsables de su actividad biológica.

Como hipótesis del presente trabajo, se estableció que el criterio utilizado para seleccionar los 14 hongos endófitos, más los resultados obtenidos en los bioensayos con los

extractos orgánicos de los mismos, nos conducirían a aquellas especies cuyos metabolitos bioactivos los convierten en agentes potenciales de regulación del crecimiento o plaguicidas de origen natural. Por lo tanto, su principal objetivo fue determinar el potencial aleloquímico de los catorce hongos endófitos mediante la evaluación del efecto de los extractos orgánicos de su micelio y medio de cultivo, sobre el crecimiento de la raíz de cuatro plantas de prueba y el crecimiento radial de dos hongos (Eumycota) y dos fungoides fitopatógenos (Oomycota). Se realizó además, un estudio químico biodirigido del endófito que presentó el mayor potencial aleloquímico, con el fin contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes de control de plagas y enfermedades y/o al desarrollo de nuevos fármacos

2. ANTECEDENTES

2.1. La ecología

El término ‘ecología’ fue acuñado por Ernst H. Haeckel (1834-1919) quién empleó el vocablo *oekologie* (del griego *oikos* que significa casa o lugar donde se vive). La ecología se refiere a las relaciones entre los seres vivos y su ambiente biótico y abiótico. Asimismo, la ecología se refiere tanto a las relaciones entre individuos de una misma población como a aquellas entre individuos de distintas poblaciones. Todas estas interacciones se llevan a cabo dentro de los sistemas ecológicos o ecosistemas (Margaleff, 1980)

La ecología como ciencia, surge como una importante rama de la biología en los años sesenta del siglo pasado. Su origen, no obstante, es mucho más remoto, aunque difuso; si bien los cazadores de la prehistoria entreveían las relaciones entre los seres vivos y su ambiente, algunos investigadores piensan que la ecología nace cuando los griegos comenzaron a desarrollar su historia natural.

Cuando la ecología investiga las relaciones recíprocas entre un organismo, población o especie con factores concretos de su ambiente (humedad, temperatura, luz, salinidad, nivel de nutrimentos y factores bióticos), se habla entonces de autoecología o ecología de las especies. Desde el enfoque autoecológico, la ecología describe las características del medio y la forma como responden los organismos a ellas (adaptación).

Cuando la ecología investiga los sistemas formados por individuos de muchas especies (comunidades), en el seno de un ambiente de características definidas e implicados en un proceso dinámico y continuo de interacción, ajuste y regulación, se habla entonces de sinecología (Anaya, 2003).

Un carácter particular de la ecología es que combina elementos de otras disciplinas con sus propios puntos de vista. El mayor desarrollo en el conocimiento sobre la ecología se logra cuando investigadores de diversas disciplinas realizan estudios conjuntos, tanto en el campo como en el laboratorio.

El conocimiento del entramado ecológico nos ayuda a la resolución de muchos problemas de carácter ecológico que el mundo enfrenta en la actualidad, mismos que, por lo general, hemos causado los seres humanos por ignorancia o menosprecio de las delicadas y complejas interrelaciones entre los organismos y el ambiente.

2.1.1. La ecología química

Paralelamente a los compuestos metabólicos primarios (aminoácidos, proteínas, carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos, ácidos carboxílicos, etc.) se origina otro tipo de compuestos que, por sus características particulares y específicas, se denominan compuestos o metabolitos secundarios (MS). El metabolismo secundario se refiere a los fenómenos químicos que suceden en los organismos para dar lugar a compuestos orgánicos que parecieran no participar en el crecimiento y desarrollo de los individuos que los producen, estos compuestos son llamados metabolitos secundarios (MS). Los MS, a diferencia de los metabolitos primarios que son comunes a todos los seres vivos, están distribuidos de manera más limitada entre distintos grupos taxonómicos y algunas de sus funciones están siendo reveladas poco a poco, mientras otras permanecen aun desconocidas (Buchanan et al. 2000). Los metabolitos primarios y los secundarios no pueden distinguirse a partir de sus precursores moleculares, estructuras químicas u orígenes biosintéticos, por lo que es necesaria una definición funcional: los metabolitos primarios son aquellos involucrados en la nutrición y en los procesos metabólicos esenciales, los MS, en general, son aquellos con mayor importancia en las relaciones ecológicas (Buchanan et al. 2000)(Mann, 1987).

Actualmente, se conocen cientos de miles de MS y gracias a la continua evolución de los organismos y a las interacciones bióticas dentro y entre especies, las vías metabólicas que dan origen a los MS se modifican dando origen a nuevos compuestos. Entre los principales grupos de MS se encuentran los fenilpropanos, acetogeninas, terpenoides, esteroides y alcaloides, entre otros.

A mediados del siglo pasado, a partir de los estudios de Fraenkel (1959) sobre las relaciones planta-insecto, se puso claramente en evidencia la importancia ecológica de los MS al mediar las relaciones químicas entre los organismos. Por otro lado, se sabe que la importancia metabólica de algunos compuestos secundarios puede ser grande, pero también, que su utilización es variable, lo cual hace difícil la comprensión del papel que desempeñan (Seigler, 1977).

En la actualidad sabemos que todos los organismos producen diversos MS que al ser liberados al ambiente repercuten en las condiciones de éste, así como en el crecimiento, salud y conducta de otros organismos, dando origen a las diversas relaciones químicas entre los seres vivos; estas relaciones son justamente el objeto de estudio de la ecología química. Anaya (2003) afirma que la ecología química puede avanzar dentro de un equilibrio “ideal” entre la ciencia básica – generando información sobre los complejos y sofisticados mecanismos de relación química entre los organismos- y la ciencia aplicada – buscando un manejo de los recursos bióticos mas adecuado y menos dañino para el ambiente.

2.2. **La alelopatía**

Como parte de la ecología química, encontramos a la ciencia de la alelopatía, la cual se ocupa de estudiar cualquier proceso donde estén involucrados los MS producidos por plantas, algas y microorganismos, que al ser liberados al ambiente afectan el crecimiento y desarrollo de otros sistemas biológicos (IAS, 1996).

Algunas interacciones alelopáticas fueron descritas desde la época de los griegos, sin embargo, hace apenas aproximadamente 50 años, las investigaciones sobre alelopatía logran enmarcar conceptualmente a esta compleja ciencia, particularmente por el descubrimiento de la importancia ecológica de los MS y por el desarrollo de nuevas tecnologías que facilitan el aislamiento, purificación y caracterización de estos productos naturales (Anaya, 2003).

2.3. **Las plantas**

El reino Plantae engloba a los organismos eucariotas (con núcleo verdadero) pluricelulares autótrofos, que presentan celularidad de tipo "vegetal" (células con pared celular y cloroplastos), organizada en tejidos con especialización funcional.

El proceso de la fotosíntesis es crucial para la vida en nuestro planeta. Las plantas al llevarlo a cabo producen y reciclan el oxígeno; al fijar el carbono del CO₂ controlan la cantidad de este gas (cuyo incremento es uno de los principales factores causantes del calentamiento global) y producen glucosa y almidón; a partir de estos dos, fabrican otros compuestos primarios que son la base que sustenta todas las redes tróficas.

Las plantas han desarrollado innumerables relaciones con otros seres vivos, inclusive con el ser humano; el desarrollo de la humanidad está íntimamente ligado a su relación con las plantas. La revolución neolítica, que incluye el paso de nómada a sedentario en el ser humano, la construcción de las primeras aldeas, la incorporación de nuevas técnicas y materiales artesanales y un desarrollo profundo de la cultura humana, se debió en gran parte al descubrimiento de la agricultura. La relación hombre-agricultura determina el inicio de las grandes civilizaciones, conocidas como civilizaciones fluviales debido a que se asentaron en fértiles riveras (Brom, 1993). Desde la aparición del hombre las plantas se han utilizado como alimento, material de construcción, combustible o medicina. En la actualidad sabemos incluso que los simios y otros animales son capaces de buscar plantas para curarse (Anaya y Espinosa, 2006).

2.4. **Los hongos**

Los hongos se agrupan dentro de un reino muy amplio y diverso (Fungi) y poseen un estilo de vida muy particular. Tienen una gran distribución sobre la biósfera, desde los desiertos hasta los helados polos, ya que son capaces de aprovechar exitosamente muchos y diferentes hábitats. Los hongos son organismos con formas muy variables y adaptaciones muy versátiles que les permiten enfrentarse con las condiciones cambiantes del medio en que viven (Isaac. 1992).

El reino de los hongos está formado por microorganismos eucarióticos, heterótrofos (carecen de clorofila), de gran importancia por el papel ecológico que desempeñan, particularmente en el proceso de descomposición de la materia orgánica muerta y, por lo tanto, en el ciclaje de nutrientes dentro de los ecosistemas. Viven como saprófitos (descomponiendo restos de plantas y animales), como parásitos obligados o biótrofos (solo pueden vivir y reproducirse en el organismo hospedero), parásitos facultativos o hemibiótrofos (cuando pueden vivir y reproducirse aunque su hospedero ya no esté vivo) o como simbioses (viviendo en asociación con otros organismos beneficiándose mutuamente) (Sullia y Shantharm, 1998). Su forma de alimentación es muy característica y se realiza por absorción de los nutrientes después de que las enzimas que secretan descomponen o “digieren” los distintos alimentos de los que dependen. Los hongos desempeñan un papel fundamental en los ecosistemas, son grandes descomponedores y,

además, el tipo de hongos existentes en el suelo puede determinar el tipo de plantas y, como consecuencia, el tipo de animales que viven en una comunidad.

El cuerpo de los hongos, por lo general llamado talo (cuerpo vegetativo o soma), puede constar de una sola célula, en el caso de las levaduras (hongos levaduriformes), o de un grupo de células, cuando se trata de otra clase de hongos cuyo talo está formado por filamentos ramificados llamados hifas que se agrupan en una masa llamada micelio (hongos filamentosos). Los hongos pueden reproducirse a través de esporas, tanto sexual como asexualmente (hongos mitospóricos).

Se ha descubierto que los hongos están más emparentados con los animales que con las plantas. Las paredes de las células de los hongos están formadas del mismo material que el exoesqueleto de los insectos, la quitina, a diferencia de la pared celular de las plantas que en la mayoría están formadas de celulosa; el glucógeno es el carbohidrato que almacenan los hongos al igual que los músculos y el hígado de los animales, por el contrario, en las plantas el carbohidrato almacenado es el almidón (Alexopoulos, 1997; Baldauf, 1993; Patterson, 1992; Ruiz-Herrera, 1992; Barr 1992).

Los hongos son fábricas formidables de compuestos químicos y esta característica los ha puesto al servicio de la industria para elaborar muchos e importantes fármacos y otras sustancias químicas

2.4.1. La diversidad de los hongos

La diversidad de los hongos es muy amplia, los micólogos calculan que existen millones de ellos y que sólo se conoce aproximadamente un 5%; se habla de 1.5 millones de especies según cálculos conservadores, sin embargo se menciona la posibilidad de que tan solo los hongos asociados a plantas podrían llegar a 1.62 millones de especies. El grupo de los hongos endófitos contribuye a un cálculo más aproximado del total de especies fúngicas, considerando la relación promedio entre hongos asociados a plantas y éstas (Hawksworth, 2001). En México se calcula que desconocemos el 96.5% de las especies de hongos de nuestro país (Guzmán, 1998).

2.4.2. Los hongos endófitos

La palabra endófito quiere decir “dentro de la planta” y ha sido utilizada para referirse a bacterias, hongos, algas e insectos sin importar la relación que los huéspedes

guardan con la planta. Sin embargo, por lo general, se refiere a microorganismos que colonizan los órganos de las plantas sin causar un daño aparente, más específicamente, muchos micólogos utilizan el término endófito para referirse a los hongos que pasan la mayor parte de su ciclo vital dentro de su hospedero sin causar síntomas aparentes de enfermedad, aunque algunos sean fitopatógenos potenciales.

El primer hongo endófito fue descrito en 1903 por E.M. Freeman (Freeman, 1904), sin embargo su ubicuidad no fue reconocida completamente hasta finales del siglo XX. Los hongos endófitos, aunque pertenecen a diversos grupos taxonómicos, en su gran mayoría pertenecen al grupo de los ascomicetos. En general, los microorganismos endófitos pueden localizarse en espacios intracelulares, intercelulares o en el tejido vascular (Schulz y Boyle, 2005).

Schulz et al. (1999) y Schulz y Boyle (2005) mencionan que no existen interacciones neutras entre endófitos y hospederos, sino que estas interacciones constituyen un balance de antagonismos, no relacionado con el órgano de la planta que es infectado. Hay siempre un grado de virulencia de parte del hongo endófito, mientras que las defensas de la planta limitan el desarrollo de los hongos invasores y de la enfermedad.

Dentro de los hongos endófitos podemos hacer una separación en tres grupos ecológicos: las micorrizas, los balansiaceos (endófitos de los pastos) y los endófitos no balansiaceos (endófitos de las plantas leñosas) (Schulz y Boyle, 2005).

El estudio de los endófitos ha cobrado importancia recientemente, entre otras cosas, porque se ha propuesto el uso de algunos de ellos como agentes de biocontrol (Isaac. 1992). Los más estudiados corresponden a los balansiaceos pues tienen mayor importancia económica que los no balansiaceos, además los endófitos de los pastos son menos diversos que aquellos de plantas leñosas (Schulz y Boyle, 2005).

2.4.3. Relación endófito planta

La investigación de la relación entre los endofitos y las plantas está apenas en sus comienzos, sin embargo hay algunos aspectos conocidos. El hongo puede obtener de la planta protección y alimentos mientras que la planta podría obtener de los endófitos compuestos que promuevan su crecimiento, incrementen su resistencia a los estreses bióticos y abióticos, modifiquen la anatomía de la raíz o contribuyan directamente a la nutrición mineral de la planta. Los hongos podrían proteger a la planta de la herbivoría y

defenderla de algunos patógenos a través de un incremento de defensas que posiblemente estaría relacionado con la producción de MS por parte de los hongos, pero también es posible que el estrés que en la planta genera la colonización por el endófito provoque que ésta aumente su producción de metabolitos de defensa o cambie la calidad del contenido químico de la planta, lo que favorece que ésta pueda sobrellevar las condiciones adversas. Este mismo razonamiento puede aplicarse a las reacciones de defensa de la planta contra los patógenos y herbívoros.

En cuanto a la protección que los hongos reciben de la planta, si bien es cierto que estar dentro de la misma aísla a los endófitos del medio externo, también es verdad que el medio interno puede llegar a ser agresivo ya que una planta puede contener docenas de especies distintas de hongos endófitos los cuales deben competir entre si; además se encuentran las defensas químicas de la planta que los endófitos deben enfrentar (Faeth, 2002; Schulz y Boyle, 2005).

Algunos hongos endófitos pueden mejorar la adaptabilidad ecológica de la planta, estableciendo así una interacción con su hospedera cercana a la simbiosis, aunque esta convivencia casi simbiótica es muy compleja, porque aunque la relación es benéfica por un lado, por el otro puede ser perjudicial. Se conocen casos de antagonismo entre huésped y hospedero; el equilibrio que se establece entre las defensas de ambos organismos marca la diferencia entre una relación mutualista y una patogénica (Figura 1.1) (Isaac, 1992; Tan y Zou, 2001).

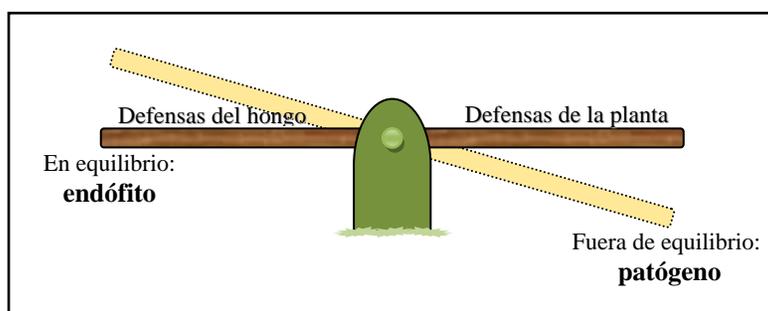


Figura 1.1. La relación entre el huésped (hongo endófito) y el hospedero (planta) está definida por el equilibrio entre sus defensas.

La interacción entre la planta y el hongo es, en alto grado, una interacción química. Muchos MS producidos por hongos endófitos se han aislado en cultivos *in vitro*, no obstante, cabe destacar que el único MS que se ha demostrado que se sintetiza dentro del

hospedero es la rugulosina de un endófito de *Pinus sylvestris*, esto quizás se deba a que, como se mencionó antes, la colonización por parte de los endófitos no balansiaceos es limitada y la concentración de sus metabolitos dentro de la planta puede ser muy pequeña para detectarse (Schulz y Boyle, 2005).

La especificidad de los hongos endófitos hacia su planta hospedera es variada, mientras algunos endófitos pueden ser aislados de diferentes especies de plantas hospederas, en distintos sitios con condiciones ambientales diferentes, otros hongos muestran una alta especificidad y solo pueden ser aislados en plantas de una misma familia y hasta de una sola especie. La especificidad en la colonización de ciertos tejidos no es tan clara, a veces se han aislado hongos de órganos específicos, pero otras veces esta especificidad no se observa (Isaac. 1992).

2.4.4. Evolución de los hongos endófitos

La evolución de los hongos endófitos puede seguirse desde la época en que las plantas colonizaron los ambientes terrestres, ya que la asociación planta-hongo data de esas épocas (Gunatilaka, 2005). Cabe decir que el estudio evolutivo de los hongos es muy difícil debido a que difícilmente se fosilizan (Audersirk, 1997). Existen varias teorías en relación al origen de los endófitos; una de ellas sostiene que los endófitos son fitopatógenos que han perdido su patogenicidad, también se ha propuesto que algunos endófitos son hongos causantes de enfermedades que se encuentran en estado latente, y la tercera hipótesis afirma que son hongos oportunistas. Dada la gran diversidad y plasticidad de estos organismos, se puede pensar que las tres posibilidades son reales. La mayoría de los datos que existen en la literatura, coincide en que los hongos endófitos están íntimamente relacionados con los fitopatógenos (Schulz y Boyle, 2005).

2.4.5. Metabolismo secundario de los hongos endófitos

Dada su importancia aplicada, los químicos orgánicos llevan mucho tiempo trabajando con los MS o productos naturales y han estudiado profundamente las propiedades de los compuestos fitoquímicos desde 1850. La investigación en el área de los productos naturales ha estimulado el desarrollo de nuevas tecnologías para la separación de compuestos, métodos espectroscópicos para elucidar estructuras y rutas químicas sintéticas que ahora constituyen la base de la química orgánica contemporánea. El interés por los MS

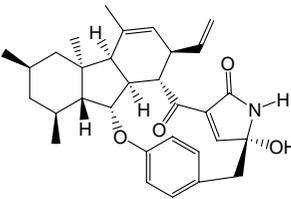
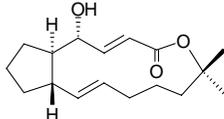
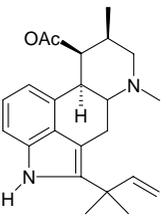
no solo es académico, el ser humano les ha dado una utilidad desde siempre y muchos de ellos han cobrado una importancia económica notable como aceites, ceras, gomas, fibras, esencias, fármacos, saborizantes, etc. Además se ha encontrado en ellos una fuente muy grande de compuestos bioactivos y se ha comprobado su importante papel ecológico, lo cual provocó que el interés en estas sustancias recibiera mas atención por parte de los biólogos (Buchanan et al. 2000).

La producción de MS por los hongos es una de sus características principales y de hecho, sintetizan una gran variedad de estos compuestos. Los MS son aptos para ingresar a los sistemas vivientes, interactuar con un receptor o blanco molecular, cambiar la estructura de éste y penetrar a las células donde pueden afectar diversos procesos fisiológicos. Esta es la razón de su actividad biológica y/o farmacológica. Hasta ahora, de todos los microorganismos que han sido estudiados, los hongos son aquellos de los cuales se ha obtenido el mayor número de MS (Guanatilaka, 2005). Al comparar la cantidad de MS aislados de endófitos con aquellos aislados del suelo se encontró que el porcentaje de compuestos con actividad fungicida y herbicida era mayor en los hongos endófitos que en los del suelo. Por esta razón, los endófitos como fuente de productos naturales resultan prometedores, pues aunque anteriormente la búsqueda de MS se realizaba con hongos de un muestreo al azar recientemente se está considerando el nicho ecológico que ocupan los hongos que van a estudiarse, ya que los MS que el microorganismo sintetiza están relacionados con el papel que éste desempeña en su medio; de esta manera cobra relevancia la interacción hongo-planta y la competencia entre los endófitos dentro de su hospedero (Schulz et al, 2002).

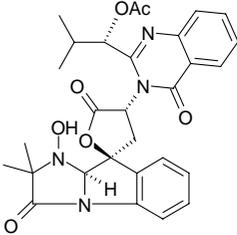
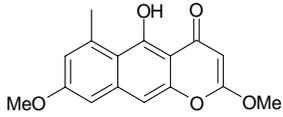
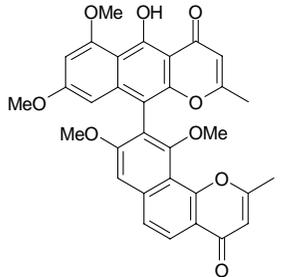
El papel que desempeñan los MS de muchos endófitos dentro de la planta es aun dudoso pues como se mencionó, su concentración dentro del hospedero puede ser muy baja, más baja aun que la concentración a la que se ha demostrado actividad biológica en ensayos *in vitro*, sin embargo eso no quiere decir que no desempeñen una función dentro de la planta y por lo tanto un papel ecológico (Schulz y Boyle, 2005).

El Cuadro 1.1 muestra algunos de los MS que han demostrado una clara actividad biológica, aislados de los hongos endófitos (Gunatilaka, 2006).

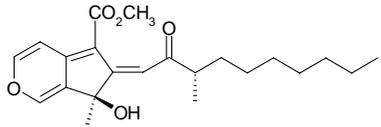
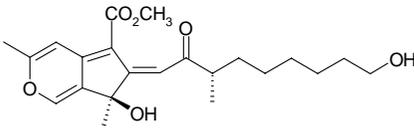
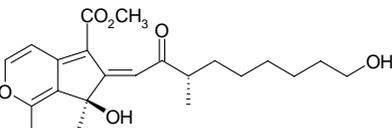
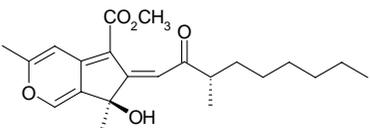
Cuadro 1.1. Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Acremonium zeae</i> (NRRL 13540) (Hypocreales mitosporico)</p>	<p><i>Zea mays</i> L. (Poaceae)</p>	 <p>1 Pirrocidina A</p>	<p>Antifúngico, antibacteriano</p>	<p>Wicklow, 2005 He, 2002</p>
<p><i>Aspergillus clavatus</i> cepa H-037 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Taxus mairei</i> y <i>Torreya grandis</i> (Taxaceae)</p>	 <p>2 Brefeldina A</p>	<p>Antifúngico, antiviral, anticancer, controlador de hierbas</p>	<p>Betina, 1992 Vurro, 1998 Zhu, 2000</p>
<p><i>Aspergillus fumigatus</i> CY018 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>3 Fumigaclavina C</p>	<p>Antifúngico; micotoxina</p>	<p>Liu, 2004 Cole, 1977</p>

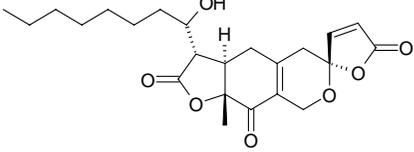
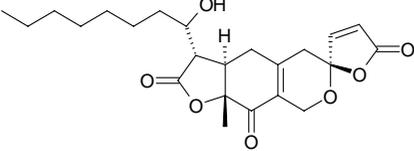
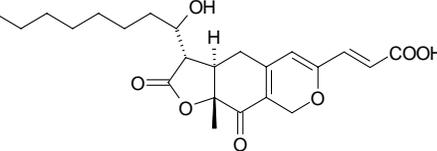
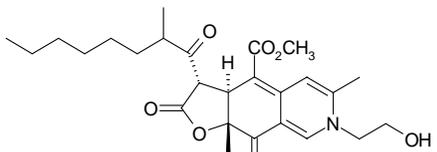
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Aspergillus fumigatus</i> CY018 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>4 Fumitremorgina C</p>	<p>Antifúngico; micotoxina</p>	<p>Liu, 2004 Cole, 1977</p>
<p><i>Aspergillus niger</i> IFB-E003 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)</p>	 <p>5 Rubrofusarina B</p>  <p>6 Fonsecinona A</p>	<p>Citotóxico; inhibidor de xantina oxidasa</p> <p>Antifúngico; inhibidor de xantina oxidasa</p>	<p>Song, 2004</p>

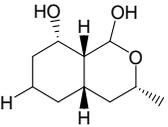
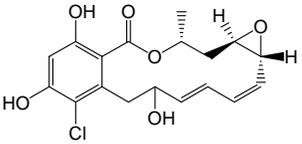
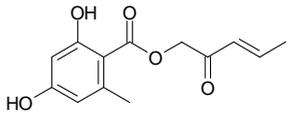
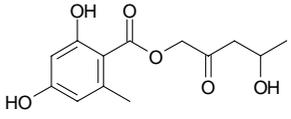
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Aspergillus parasiticus</i> RDWD1-2 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Sequoia sempervirens</i> (Taxodiaceae)</p>	 <p>7 Sequoiatona C</p>	Tóxico de <i>Artemia salina</i>	<p>Stierle, 2001 Stierle, 2003</p>
		 <p>8 Sequoiatona D</p>	Tóxico de <i>Artemia salina</i>	
		 <p>9 Sequoiatona E</p>	Tóxico de <i>Artemia salina</i>	
		 <p>10 Sequoiatona F</p>	Tóxico de <i>Artemia salina</i>	

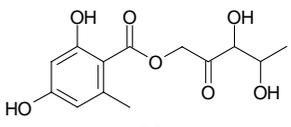
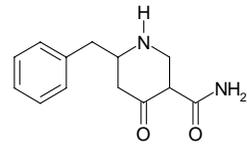
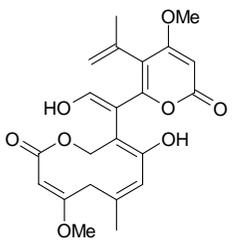
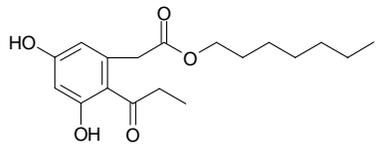
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Aspergillus parasiticus</i> RDWD1-2 (Trichocomaceae)</p>	<p><i>Sequoia sempervirens</i> (Taxodiaceae)</p>	 <p>11 Sequoiamonascina A</p>	<p>Tóxico de <i>Artemia salina</i>, citotóxico</p>	<p>Stierle, 2001 Stierle, 2003</p>
		 <p>12 Sequoiamonascina B</p>	<p>Tóxico de <i>Artemia salina</i></p>	
		 <p>13 Sequoiamonascina C</p>	<p>Tóxico de <i>Artemia salina</i></p>	
		 <p>14 Sequoiamonascina D</p>	<p>Tóxico de <i>Artemia salina</i></p>	

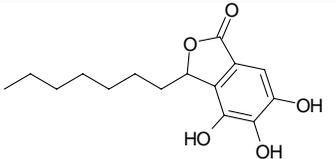
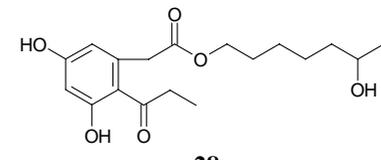
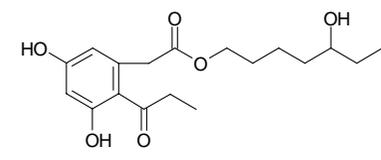
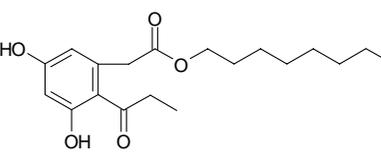
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Botrytis sp.</i> (Sclerotiniaceae)	<i>Taxus brevifolia</i> (Taxaceae)	 <p>19 8-dihidroramulosina</p>	Antibiótico	Stierle, 1998
<i>Chaetomium chiversii</i> CS-36-62 (Chaetomiaceae)	<i>Ephedra fasciculata</i> (Ephedraceae)	 <p>20 Radicol</p>	Citotóxico, inhibidor de Hsp90	Turbyville, 2006
<i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae)	<i>Ephedra fasciculata</i> (Ephedraceae)	 <p>21 Globosumona A</p>	Citotóxico	Bashyal, 2005
		 <p>22 Globosumona B</p>		

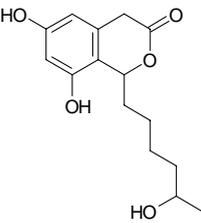
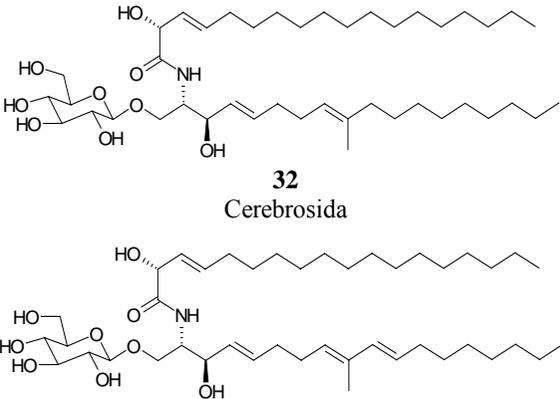
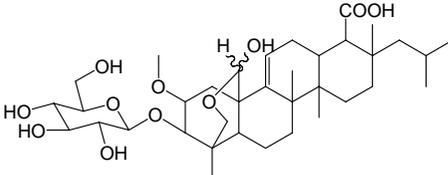
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Chaetomium globosum</i> (Chaetomiaceae)	<i>Ephedra fasciculata</i> (Ephedraceae)	 <p>23 Globosumona C</p>	Citotóxico	Bashyal, 2005
<i>Cladosporium herbarum</i> IFB-E002 (Mycosphaerellaceae)	<i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)	 <p>24 Aspernigrina A</p>  <p>25 Orlandina</p>	Citotóxico, inhibidor de xantina oxidasa	Cutler, 1979 Ye, 2005 Hiort, 2004
<i>Cytospora</i> sp. CR 200 (Valsaceae)	<i>Conocarpus erecta</i> (Combretaceae)	 <p>26 Citosporona B</p>	Antifúngico; citotóxico	Brady, 2000 Xu, 2004

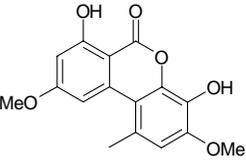
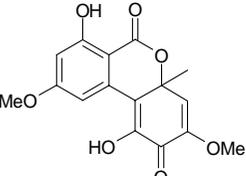
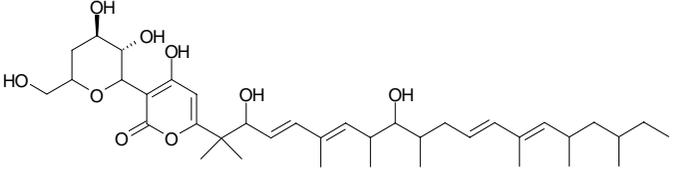
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Cytospora</i> sp. CR 200 (Valsaceae)</p>	<p><i>Conocarpus erecta</i> (Combretaceae)</p>	 <p>27 Cytosporona E</p>	<p>Antibacteriano</p>	<p>Brady, 2000</p>
<p><i>Dothiorella</i> sp. cepa HTF3 (Botryosphaeriaceae)</p>	<p><i>Aegiceras corniculatum</i> (Myrsinaceae)</p>	 <p>28 Dotiorelona A</p>  <p>29 Dotiorelona B</p>  <p>30 Dotiorelona C</p>	<p>Citotóxico</p> <p>Citotóxico</p> <p>Citotóxico</p>	<p>Xu, 2005</p>

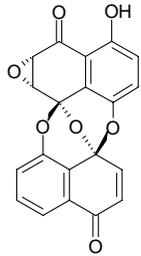
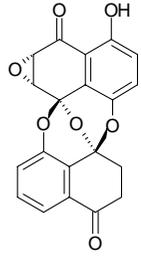
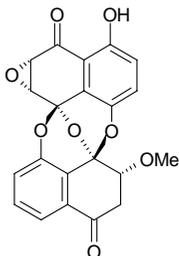
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Dothiorella sp.</i> cepa HTF3 (Botryosphaeriaceae)</p>	<p><i>Aegiceras corniculatum</i> (Myrsinaceae)</p>	 <p>31 Dotiorelona D</p>	<p>Citotóxico</p>	<p>Xu, 2005</p>
<p><i>Fusarium sp.</i> IFB-121 (Hypocreales mitosporico)</p>	<p><i>Quercus Variabilis</i> (Fagaceae)</p>	 <p>32 Cerebrosida</p> <p>33 Fusarusida</p>	<p>Antibacteriano, inhibidor de xantina oxidasa</p> <p>Antibacteriano, inhibidor de xantina oxidasa</p>	<p>Shu, 2004</p>
<p><i>Hormonema sp.</i> ATCC 74360 (Dothioraceae)</p>	<p><i>Juniperus communis</i> (Cupressaceae)</p>	 <p>34 Enfumafungina</p>	<p>antifungico</p>	<p>Pelaez, 2000</p>

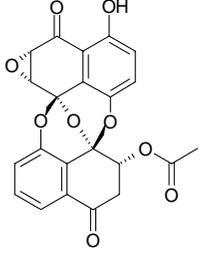
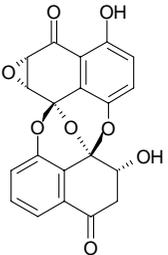
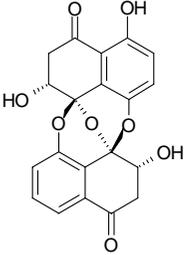
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Microsphaeropsis olivacea</i> (Ascomycota mitosporico)	<i>Pilgerodendron uviferum</i> (Cupressaceae)	 <p>35 Grafislactona A</p>  <p>36 Botrallina</p>	<p>Inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE) antioxidante, secuestrador de radicales libres;</p> <p>Inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE)</p>	<p>Song, 2005 Hormazahal, 2005</p>
<i>Microsphaeropsis</i> sp. cepa NRRL 15684 (Ascomycota mitosporico)	<i>Buxus sempervirens</i>	 <p>37 Lactona S 39163/F-I</p>	Antimicrobiano, antiviral	Tscherter, 1988

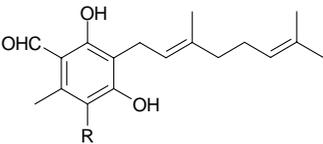
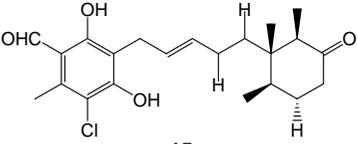
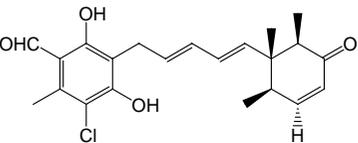
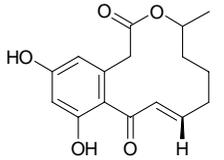
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Mycelia sterilia</i> (Ascomycota)</p>	<p><i>Atropa belladonna</i> (Solanaceae)</p>	 <p>38 Preusomerina G</p>	<p>Antibacteriano, Antifúngico, inhibidor de FTPasa</p>	
		 <p>39 Preusomerina H</p>	<p>Antibacteriano, Antifúngico</p>	<p>Krohn, 2001 Singh, 1994</p>
		 <p>40 Preusomerina I</p>	<p>Antibacteriano, Antifúngico</p>	

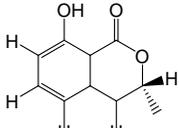
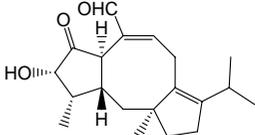
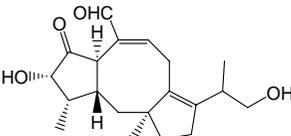
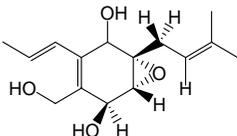
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Mycelia sterilia</i> (Ascomycota)</p>	<p><i>Atropa belladonna</i> (Solanaceae)</p>	 <p>41 Preusomerina J</p>	<p>Antibacteriano, antifúngico</p>	<p>Krohn, 2001 Singh, 1994</p>
		 <p>42 Preusomerina K</p>	<p>Antibacteriano, antifúngico</p>	
		 <p>43 Preusomerina L</p>	<p>Antibacteriano, antifúngico</p>	

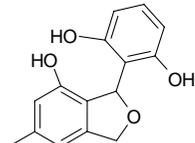
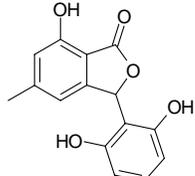
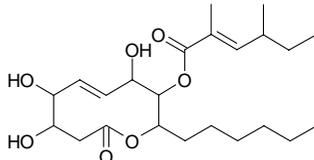
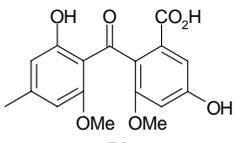
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Nectria galligena</i> (Nectriaceae)</p>	<p><i>Malus domestica</i> (Rosaceae)</p>	 <p>44 Coletoclorina B</p>	<p>Inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE), inhibidor de α-glucuronidasa</p>	<p>Gutierrez, 2005</p>
		 <p>45 Ilicolina C</p>	<p>Inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE), inhibidor de α-glucuronidasa</p>	
		 <p>46 Ilicolina E</p>	<p>Inhibidor de acetilcolinesterasa (AChE), inhibidor de α-glucuronidasa</p>	
		 <p>47 α,β-dehydrocurvularin</p>	<p>Citotóxico; inhibidor de germinación y de crecimiento radicular y epicotilar</p>	

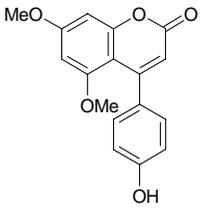
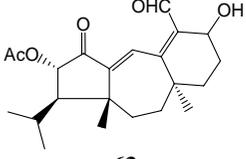
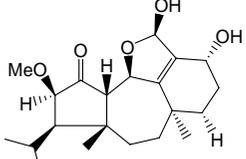
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Penicillium janczewskii</i> (Trichocomaceae)	<i>Prumnopitys andina</i> (Podocarpaceae)	 <p>51 Meleina</p>	Antibacteriano, antiviral, fitotóxico	Schmeda-Hirschmann, 2005 Dai, 2001 Krohn, 1997 Parisi, 1993 Kusano, 2000 He, 200
<i>Periconia sp.</i> OBW-15 (Halosphaeriaceae)	<i>Taxus cuspidata</i> (Taxaceae)	 <p>52 Periconicina A</p>  <p>53 Periconicina B</p>	Antimicótico, inhibidor del crecimiento radicular y de la elongación del hipocótilo. (a bajas conc. acelerador del crecimiento radicular)	Kim, 2004 Shin, 2005
<i>Pestalotiopsis jesteri</i> (Amphisphaeriaceae)	<i>Fragraea bodenii</i> (Gentianaceae)	 <p>54 Jesterona</p>	Antifúngico, antimicótico	Li, 2001

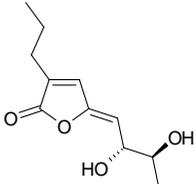
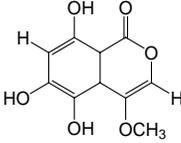
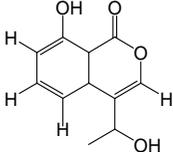
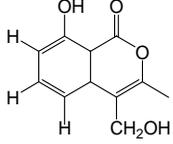
Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<i>Pestalotiopsis microspora</i> (Amphisphaeriaceae)	<i>Terminalia morobensis</i> (Combretaceae)	 <p>55 Pestacina</p>  <p>56 Isopestacina</p>	<p>Antimicótico, antioxidante</p> <p>Antifúngico, antioxidante</p>	Harper, 200356 Li, 2001
<i>Phomopsis sp.</i> (Valsaceae)	<i>Erythrina crista-galli</i> (Fabaceae)	 <p>57 Fomol</p>	Antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, ligeramente citotóxico	Weber, 2004
<i>Rhizoctonia sp.</i> Cy064 (Hymemomycetes mitosporico)	<i>Cynodon dactylon</i> (Poaceae)	 <p>58 Acido rizoctonico</p>	Antibacteriano débil	Ma, 2004

Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fúngica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
<p><i>Streptomyces aureofaciens</i> CMUAc130 (Streptomycetaceae)</p>	<p><i>Zingiber officinale</i> (Zingiberaceae)</p>	 <p>62 5,6-dimetoxi-4-(p-metoxi-fenil)cumarina</p>	<p>Antifúngico</p>	<p>Taechowisan, 2005</p>
<p>Hongo no identificado CR115</p>	<p><i>Daphnopsis americana</i> (Thymelaeaceae)</p>	 <p>63 Guanacastepeno A</p>  <p>64 Guanacastepeno I</p>	<p>Antibacteriano</p> <p>Antibacteriano</p>	<p>Brady, 2000 Brady, 2001 Singh, 2000</p>

Cuadro 1.1. (Continuación) Principales metabolitos bioactivos aislados de hongos endófitos.

Cepa fungica	Planta(s) hospedera (familia)	producto(s) natural(es)	Actividad biológica	Referencia
Hongo no identificado Cepa SWS 2611L (DAOM 229664)	<i>Picea glauca</i> (Pinaceae)	 <p>65 6,7-dihidroxi-2-propil-2,4-octadien-4-olida</p>	Tóxico para línea celular CF-1 de <i>Choristoneura fumiferana</i> (Tortricidae)	Findlay, 2003
		 <p>66 5,6,8-trihidroxi-4-(1'-hidroxietil) isocumarina</p>	Ligeramente tóxico para línea celular CF-1 de <i>Choristoneura fumiferana</i> (Tortricidae)	
		 <p>67 Sescandelina</p>	Ligeramente tóxico para línea celular CF-1 de <i>Choristoneura fumiferana</i> (Tortricidae)	
		 <p>68 Sescandelina B</p>	Ligeramente tóxico para línea celular CF-1 de <i>Choristoneura fumiferana</i> (Tortricidae)	

3. HIPÓTESIS

El criterio de preselección de microorganismos con potencial antagónico y/o alelopático, junto con los resultados derivados de las evaluaciones *in vitro* de los extractos orgánicos de los hongos endófitos seleccionados, constituyen un camino metodológico adecuado para detectar especies que producen compuestos cuya bioactividad los convierte en agentes potenciales para el desarrollo de reguladores del crecimiento o plaguicidas de origen natural.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Con base en los antecedentes anteriores, los objetivos generales de la presente investigación son los siguientes:

- a. Determinar el potencial aleloquímico de los catorce hongos endófitos aislados de algunas plantas tropicales de la reserva ecológica El Edén en Quintana Roo, que mostraron un fuerte potencial antagónico, mediante la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de la raíz de cuatro plantas de prueba y el crecimiento radial de dos hongos (Eumycota) y dos fungoides fitopatógenos (Oomycota).
- b. Realizar el estudio químico biodirigido del endófito que presente el mayor potencial aleloquímico, con el fin de aislar e identificar los principales compuestos que determinan su bioactividad y, de esta manera, contribuir al posible desarrollo de nuevos agentes de control de plagas y enfermedades y/o al desarrollo de nuevos fármacos.

4.2. Objetivos particulares

A fin de cumplir con los objetivos primordiales planteados, se formularon los siguientes objetivos particulares:

- a. Establecer las condiciones óptimas de crecimiento de los catorce hongos endófitos, mediante la realización de fermentaciones en pequeña escala, verificando el desarrollo de los microorganismos en diferentes medios de cultivo y diferentes condiciones de incubación.
- b. Obtener los extractos orgánicos a partir del medio de cultivo y del micelio de cada uno de los endófitos.

- c. Evaluar la actividad antifúngica de los extractos orgánicos utilizando el método de dilución en agar y como microorganismos de prueba dos hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani*, y dos fungoides fitopatógenos: *Phytophthora parasitica* y *Phytophthora capsici*.
- d. Evaluar el posible efecto fitotóxico de los extractos orgánicos de los catorce endófitos, determinando su actividad sobre el crecimiento de la raíz de *Amaranthus hypochondriacus* L. (Amaranthaceae), *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae) var. Pomodoro, *Echinochloa crus-galli* L. (Beauv.) (Poaceae) e *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae).
- e. Cultivar en mediana escala (32 L) el endófito que presente el mayor potencial aleloquímico y obtener los extractos orgánicos del mismo, a partir del medio de cultivo y del micelio, verificando su bioactividad mediante los bioensayos indicados en los incisos 3 y 4.
- f. Aislar los aleloquímicos responsables de la bioactividad de los extractos orgánicos, a través de un estudio químico biodirigido.
- g. Determinar cuantitativamente la actividad fungitóxica y fitotóxica de los principales metabolitos aislados de las fracciones activas.
- h. Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y de difracción de rayos X.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Hongos endófitos

Los catorce hongos endófitos utilizados en este trabajo, no están completamente identificados ya que no formaron estructuras reproductivas, por lo que se utilizarán las claves de las morfoespecies para referirse a ellos.

En la Cuadro 5.1 se muestran las claves de los endófitos y las plantas de las que fueron aislados.

Cuadro 5.1. Clave de los endófitos trabajados y su planta hospedera

Hongos endófitos trabajados	
Clave del hongo	Plantas hospederas*
110 BP (<i>Muscodor</i> sp.)	B,C
AHC	Ah
CHB	Ch
55	M
131	S
1 CB (<i>Guignardia mangiferae</i>)	B,C,Ch,L,M,Z
LD1	L
PC (<i>Xylaria</i> sp.)	P
AEC	Ae
53 (<i>Pestalotiopsis</i> sp.)	M
LH	L
10 (<i>Colletotrichum</i> sp)	B,C,M,S
7 (<i>Phomopsis</i> sp.)	C,M
101	B

*(Ae= espinas de *Acacia sedillense*; Ah= hojas de *Acacia sedillense*; B= *Bursera simaruba*; C=*Callicarpa acuminata*; Ch=*Chrysophillum mexicana*; L=*Lonchocarpus castilloi*; M=*Metopium brownei*; P=*Pteridium aquilinum*; S=*Sebastiania adenophora*; Z=*Zuelania guidonia*)

5.2. Organismos de prueba

5.2.1. Microorganismos fitopatógenos

Como microorganismos de prueba se utilizaron cuatro fitopatógenos con importancia agrícola en nuestro país: dos hongos fitopatógenos: *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani* (Eumycota) y dos fungoides (Oomycota): *Phytophthora capsici* y *Phytophthora parasitica*.

5.2.2. Plantas

Se utilizaron semillas de *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), *Echinochloa crus-galli* (zacate tardo), *Lycopersicon esculentum* (jitomate) e *Ipomoea tricolor* (ipomea). Las semillas de amaranto se obtuvieron en el Mercado de Tulyehualco, Mexico, D.F; las de zacate tardo se colectaron de plantas cultivadas en el invernadero del Insituto de Ecología (UNAM); las de tomate se compraron en “Semillas Berentsen”, Celaya, Guanajuato, Mexico y las de *I. tricolor* fueron colectadas e identificadas en Huichapan, Hidalgo por la Dra. Ana Luisa Anaya.

5.3. Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de los 14 hongos endófitos seleccionados.

5.3.1. Selección del medio de cultivo.

Se probaron distintos tipos de medios con objeto de encontrar aquellos en los que se desarrollaran de manera óptima los 14 hongos seleccionados así como los cuatro microorganismos de prueba. En la Cuadro 5.2 se enlistan los medios utilizados.

Los medios sólidos se utilizaron en cajas de Petri colocando en el centro de las mismas, el inóculo respectivo. Los inóculos se obtuvieron con un sacabocado estéril de 5mm de diámetro con el cual se obtuvo la muestra directamente del micelio del endófito creciendo sobre papa-dextrosa-agar (PDA). El desarrollo de todos los hongos y fungoides se siguió durante el tiempo de cultivo en cada medio y se compararon los resultados para elegir el medio idóneo.

Cuadro 5.2. Medios de cultivo seleccionados para el desarrollo de los microorganismos.

Medios utilizados para crecer los hongos trabajados	
Medio	Composición
Papa dextrosa agar (PDA) deshidratado (comercial)	Infusion de papa (MERCK)(200g) Dextrosa (20g) Agar (15g) Agua destilada (1L)
PDA utilizando puré de papa comercial	Infusión de puré de papa (200g) Dextrosa (20g) Agar (15g) Agua destilada (1L)

Cuadro 5.2. (continuación) Medios de cultivo seleccionados para el desarrollo de los microorganismos.

Medios utilizados para crecer los hongos trabajados	
Medio	Composición
PDA de papas frescas	Infusión de papa fresca (200g) Dextrosa (20g) Agar (15g) Agua destilada (1L)
Caldo de papa dextrosa (CPD)de papas frescas*	Infusión de papa fresca (200g) Dextrosa (20g) Agua destilada (1L)
CPD con extracto de levadura utilizando papas frescas*	Infusión de papa fresca (200g) Dextrosa (20g) Extracto de levadura (5g) Agua destilada (1L)
Caldo sabouraud*	Peptona de carne (5g) Peptona de caseína (5g) Dextrosa (20g) Agua destilada (1L) pH=5.7
Jugo de ocho verduras*	Jugo V-8 (180mL) Carbonato de calcio (2g) Agua destilada (820mL) pH=5.5

* Medios utilizados únicamente con los hongos endófitos

5.3.2. Obtención de los cultivos en pequeña escala

Las fermentaciones en pequeña escala (1 L) para cada endófito se realizaron utilizando como medios de cultivo los anteriormente mencionados y verificando el desarrollo del hongo endófito en condiciones de agitación y estáticas. Los cultivos en agitación se incubaron por un periodo de 15 días y los estáticos por 30 días a una temperatura de incubación de 28 °C.

Para realizar las fermentaciones estáticas se utilizaron matraces de 2 L conteniendo 1 L de medio de cultivo. El inóculo colocado en cada uno de los matraces, consistió de cuatro cortes circulares del micelio del hongo correspondiente realizados con un sacabocado estéril de 5mm de diámetro sobre el micelio del endófito creciendo en PDA. Las fermentaciones en agitación se realizaron en dos matraces de 1 L conteniendo cada uno

500 mL del medio inoculado de la forma mencionada. El producto de cada fermentación se filtró a través de cuatro capas de gasa, con el fin de separar el micelio del medio de cultivo.

5.4. **Obtención de los extractos orgánicos del medio y del micelio de los catorce endófitos**

5.4.1. Extracción de los micelios.

El micelio húmedo se sometió a un proceso de maceración con 1.5 L de diclorometano (CH_2Cl_2) durante tres días; esta maceración se repitió tres veces. Inmediatamente después y con el mismo procedimiento, se realizaron tres extracciones más con acetato de etilo (AcOEt). Los extractos resultantes se filtraron, se secaron sobre sulfato de sodio anhidro y se concentraron al vacío utilizando un evaporador rotatorio. Los extractos obtenidos con CH_2Cl_2 y con AcOEt se compararon por cromatografía en capa fina (ccf) después de lo cual se unieron para cada uno de los hongos.

5.4.2. Extracción de los medios de cultivo.

Los extractos de los medios de cultivo se obtuvieron mediante sucesivas particiones orgánicas empleando los mismos disolventes que en las maceraciones (CH_2Cl_2 y AcOEt). La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío en un evaporador rotatorio. Los extractos obtenidos con CH_2Cl_2 y con AcOEt se compararon por cromatografía en capa fina (ccf) después de lo cual se unieron para cada uno de los hongos.

5.5. **Determinación de la actividad biológica de los extractos obtenidos del medio de cultivo y del micelio de los catorce endófitos**

5.5.1. Determinación del potencial fungitóxico

La determinación cuantitativa del potencial antifúngico de los extractos orgánicos de los endófitos en estudio, se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre el crecimiento radial de los cuatro microorganismos fitopatógenos de prueba: *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora capsici* y *Alternaria solani*. Los bioensayos se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro y la concentración de prueba fue 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como control positivo se utilizó el fungicida comercial captán

(Anaya, *et al.*, 2003). El crecimiento radial fue analizado con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) modelo I ($\alpha=0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD.

5.5.2. Determinación del potencial fitotóxico

La determinación cuantitativa del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos (CH_2Cl_2 -AcOEt), se realizó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de cuatro especies de plantas de prueba: *Amaranthus hypochondriacus* (Amaranthaceae), *Echinochloa crus-galli* (Poaceae), *Lycopersicon esculentum* (Solanaceae) e *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae) utilizando el método en caja de Petri (Anaya *et al.*, 1995; 2003). Estas especies son representantes de semillas de dicotiledóneas y monocotiledóneas.

La evaluación del potencial fitotóxico sobre *Ipomoea tricolor* solo se realizó con las fracciones obtenidas del extracto del micelio del hongo 101 cultivado en condiciones estáticas, sustituyendo a *Echinochloa crus-galli*.

Los ensayos de fitotoxicidad se realizaron utilizando una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y como control positivo se empleó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D). Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía, (ANOVA) modelo I ($\alpha=0.05$) y una prueba de contrastes de Tukey HSD.

5.6. Cultivo en mediana escala del hongo 101

Se realizó una fermentación estática del hongo 101 según las condiciones óptimas ensayadas para este hongo (Cuadro 5.3). En cinco garrafones de vidrio con capacidad para 18 L se colocaron 6.5 litros del medio de cultivo en cada uno, los garrafones se taparon con un tapón de gasa y se esterilizaron en autoclave. En condiciones estériles, cada garrafón se inoculó con cinco cortes del micelio del endófito 101 realizados con un sacabocados estéril de 10 mm de diámetro. La fermentación se dejó estática a una temperatura de 28°C durante un periodo de 30 días.

Terminada la fermentación se decantó el medio de cultivo (32 L) y fue concentrado a presión reducida en la planta piloto del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Estando separados el micelio y el medio de cultivo (este último, concentrado) se obtuvieron los extractos orgánicos de CH_2Cl_2 y AcOET de igual manera en que se hizo con

las fermentaciones en pequeña escala y así mismo se evaluó su actividad biológica tanto en hongos como en semillas.

Cuadro 5.3. Condiciones óptimas para el cultivo del endófito 101.

Condiciones Óptimas de Crecimiento	
Medio de cultivo	Papa - dextrosa
Temperatura de incubación	28 °C
Período de incubación	30 días
Condiciones de cultivo	Estático

5.7. Fraccionamiento biodirigido del extracto orgánico obtenido del micelio del endófito 101.

5.7.1. Técnicas cromatográficas generales

El extracto orgánico obtenido del micelio del cultivo a mediana escala del hongo 101 se fraccionó mediante cromatografía de adsorción en columna abierta, empleando gel de sílice como adsorbente. Los análisis cromatográficos en capa fina se realizaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio recubiertas de gel de sílice y varios sistemas de elución (Hex-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂ y CH₂Cl₂-MeOH), como agente cromogénico se empleó una disolución de sulfato cérico (12g sulfato cérico, 22mL ácido sulfúrico y 350g de hielo); para obtener el desarrollo del color fue necesario calentar cada cromatofolio por dos minutos aproximadamente a 110 °C (Ghisalberti, 1993; Stahl, 1969).

5.7.2. Fraccionamiento primario

El extracto orgánico activo obtenido del micelio del cultivo a mediana escala del hongo 101 se fraccionó en columna abierta utilizando 1,427g de gel de sílice, obteniéndose un total de 180 fracciones de 200mL cada una. Aquellas fracciones que presentaron características cromatográficas similares se combinaron dando como resultado 14 fracciones primarias (ver Cuadro 5.4)

5.7.3. Obtención de la xantoquinodina J (69).

De la fracción activa XII (4.896 g), precipitó espontáneamente un sólido amorfo de color amarillo el cual fue purificado por sucesivas recristalizaciones por par de disolventes

utilizando diclorometano y metanol hasta obtenerlo puro como sólido cristalino de color amarillo.

Cuadro 5.4. Fraccionamiento primario del extracto orgánico obtenido del micelio del endofito 101 cultivado a mediana escala en condiciones estáticas.

Fraccionamiento primario del extracto del micelio del endofito 101			
Fracciones	Eluyente/(proporción)	Fracciones reunidas	Clave
1-10	Hexano (Hex)	1-6	I
		7-9	II
11-16	Hex-CH ₂ Cl ₂ (9:1)	10-21	III
17-22	Hex-CH ₂ Cl ₂ (8:2)		
23-29	Hex-CH ₂ Cl ₂ (7:3)	22-28	IV
30-43	Hex-CH ₂ Cl ₂ (6:4)	29-33	V
		34-35	VI
		36-62	VII
44-51	Hex-CH ₂ Cl ₂ (1:1)	63-78	VIII
52-61	Hex-CH ₂ Cl ₂ (4:6)		
62-67	Hex-CH ₂ Cl ₂ (3:7)		
68-73	Hex-CH ₂ Cl ₂ (2:8)		
74-79	CH ₂ Cl ₂		
80-118	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (99:01)	79-94	IX
119-124	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (98:02)	95-127	X
125-140	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (97:03)	128-169	XI
141-149	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (96:04)		
150-157	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (95:05)		
158-170	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1)		
171-175	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (7:3)	170-175	XII
176-177	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (1:1)	176-177	XIII
178-182	MeOH	178-182	XIV

5.8. Caracterización de la xantoquinodina J (69).

El punto de fusión se determinó en un aparato BÜCHI Melting Point B-540b y se describe sin corregir. La rotación óptica se registró en un polarímetro digital JASCO DIP

360. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RNM ^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 y los desplazamientos químicos (δ) se asignaron en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) empleado como referencia interna. El espectro en el infrarrojo (IR) se registró en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer, modelo 599B, en pastilla de KBr. El espectro en el ultravioleta (UV) se registró en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, modelo 202. El espectro de masas se registró en un aparato JEOL JMS-AX505 HA mediante introducción directa a 70 eV. El análisis de difracción de rayos X se efectuó en el Instituto de Química, en un difractómetro Nicolet R3m.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinación de las condiciones óptimas para el crecimiento de los catorce hongos endófitos seleccionados.

Los hongos endófitos y los microorganismos fitopatógenos de prueba se cultivaron en diferentes medios de cultivo, con la finalidad de establecer las condiciones óptimas de crecimiento.

El medio de papa-dextrosa es un medio ampliamente utilizado para el crecimiento de hongos fitopatógenos y en el presente trabajo resultó ser muy adecuado para el crecimiento de las endófitos, los cuales, como se mencionó, están estrechamente relacionados con los primeros (Ulloa, M. Hanlin, R 1978). El medio sabouraud es frecuentemente utilizado para realizar cultivos de mohos y levaduras (DIFCO, 1994). El medio preparado con jugo ocho verduras (V8) es un medio muy utilizado en el cultivo rutinario de hongos (Ulloa, M. Hanlin, R 1978). Considerando que el medio papa-dextrosa es ideal para los fitopatógenos se quiso probar alguna variante por lo cual se utilizó el caldo de papa-dextrosa con extracto de levadura.

Al comparar los cultivos líquidos encontramos que el mayor crecimiento miceliar de los endófitos se dió en las fermentaciones con caldo de papa-dextrosa (CPD) y caldo saboureau, el crecimiento del micelio fue evidentemente menor al realizarse la fermentación en CPD con extracto de levadura utilizando papas frescas, por lo cual este medio fue descartado; en los cultivos realizados con medio V8 el crecimiento fue prácticamente nulo al completar los tiempos asignados por lo que éste también fue descartado.

Para decidir entre la utilización de medio de papa-dextrosa o de sabouraud, fue determinante la extracción orgánica realizada a ambos medios de cultivo sin inocular (controles). Del CPD se obtuvieron 5 mg de extracto mientras que del caldo saboureau se obtuvieron 18 mg. Ya que los compuestos provenientes del medio de cultivo constituyen una contaminación para los extractos de los hongos es preferible que el medio presente el menor aporte de compuestos al extracto obtenido, por esta razón se eligió al CPD como el medio idóneo para realizar los cultivos en medio líquido (Cuadro 3.1).

Los microorganismos fitopatógenos no crecieron bien en las cajas de Petri con PDA comercial, sin embargo, al utilizar medio de papa preparado con papas frescas y con puré

de papa, tanto fitopatógenos como endófitos mostraron un buen crecimiento y no se observaron diferencias en el tamaño ni forma de las colonias. No obstante, un aspecto que resultó evidente fue la diferencia en la transparencia del medio; mientras que el medio de papa preparado con puré era muy turbio, aquel preparado con papas frescas era translúcido, lo que facilitaba la medición del crecimiento radial de las colonias; por esta razón, se decidió utilizar el PDA a partir de papas frescas (Cuadro 6.1).

Cuadro 6.1. Medios elegidos para realizar los cultivos

<i>Cultivos en medio líquido</i>	<i>Cultivos en medio sólido</i>
Caldo de papa-dextrosa (CPD) utilizando papas frescas	Papa-dextrosa-agar (PDA) utilizando papas frescas

6.2. Obtención de los extractos orgánicos del medio y del micelio de los catorce endófitos

En la Cuadro 6.2 se presenta la cantidad de extracto obtenido del medio y del micelio en condiciones estáticas y de agitación para cada uno de los endófitos cultivados en CPD. Hay que destacar que en general, las condiciones de agitación promovieron una mayor cantidad de extracto, además se pudo observar que la cantidad de micelio producido en estas condiciones fue mayor al generado en condiciones estáticas exceptuando el caso del endófito 101 que prácticamente no creció al ser sometido a agitación. De acuerdo con los resultados obtenidos en el inciso 3.1 y en el presente apartado, es posible afirmar que, con la excepción de uno solo de los endófitos, las condiciones óptimas para el crecimiento y producción de extracto de los mismos fue la utilización del caldo de papa-dextrosa en cultivos agitados, aunque ésta no debe tomarse como una regla que deba cumplirse para todos los endófitos puesto que cada uno tiene sus particularidades.

Cuando el medio se agita, se incrementa su aireación, lo cual promueve la oxigenación de los organismos que en él se encuentran; por ello, es posible que el crecimiento fuera mayor bajo condiciones de agitación, y por lo mismo, se produjera mayor cantidad de extracto.

Como se puede observar, el rendimiento de los extractos del micelio obtenidos en condiciones estáticas es mayor que el del medio en la mitad de los endófitos y viceversa, es

mayor en el medio de los otros 7 hongos. En cambio, en condiciones de agitación, el rendimiento de los extractos del micelio es mucho mayor en la mayoría de los endófitos.

Cuadro 6.2. Rendimiento de los extractos del micelio y el medio de cultivo obtenidos en las fermentaciones en condiciones estáticas y en agitación.

Endófito	<i>RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS (mg/L)</i>			
	Condiciones			
	Estático		Agitación	
	Micelio	Medio	Micelio	Medio
110BP	14	12	16	16
AHC	10	12	14	22
CHB	4	8	23	18
55	4	37	236	27
131	3	18	269	120
1CB	23	32	262	60
LD1	521	21	168	124
PC	53	58	38	82
AEC	81	161	31	37
53	152	42	134	28
LH	7	105	328	33
10	278	53	218	149
7	1068	36	437	54
101	920	63	ND	ND

Es notoria la producción de los extractos del micelio obtenidos en condiciones estáticas de los endófitos 7, 101 y LD1. En estos tres casos gran parte del extracto está conformado por una fase aceitosa, sobre todo en 7. Los extractos obtenidos de las fermentaciones en agitación de estos mismos hongos contienen en mucha menor proporción la fase aceitosa, mientras que la fase sólida aparentemente no varía, esto muestra que la mayor oxigenación y el movimiento constante, probablemente afectan el metabolismo de los hongos los cuales producen mayor o menor cantidad y calidad de metabolitos. Dependiendo el endófito, los extractos del medio y micelio pueden compartir la mayoría de sus componentes o pueden ser distintos, lo mismo sucede entre los extractos obtenidos de fermentaciones agitadas y estáticas, además se observó, como en el caso del aceite antes mencionado, que no todos los componentes de los extractos se verán afectados de igual manera por las condiciones a las que se somete al hongo, mientras la producción de unos metabolitos puede verse promovida por efecto de la agitación, la de otros puede permanecer igual o disminuir.

6.3. Determinación de la actividad biológica de los extractos obtenidos del medio de cultivo y del micelio de los catorce endófitos

Para cada condición de extracción (agitación y estática) y cada fuente de origen de los extractos (medio de cultivo y micelio) se presentan los resultados obtenidos de cada uno de los hongos endófitos en los bioensayos con microorganismos fitopatógenos y semillas (Cuadros 6.3, 6.4, 6.5 y 6.6).

Los resultados muestran en general, que los extractos tienen mayor actividad fitotóxica que fungitóxica, a pesar de que sobre los microorganismos fitopatógenos se probaron a mayor concentración.

De los extractos obtenidos de los micelios en agitación, solo destaca por su actividad fungitóxica el endófito LD1 superando el 50% de inhibición sobre el crecimiento de los dos fungoides fitopatógenos (*P. parasitica* y *P. capsici*). En el caso de las semillas vemos que los hongos AHC, 131, AEC y 10 tienen muy buena actividad inhibitoria sobre las semillas. Para el extracto del medio en agitación, LD1 vuelve a mostrar una actividad superior al 50% frente a los fungoides, al igual que AHC y PC, este último inhibiendo totalmente el crecimiento de estos microorganismos; en el caso de las semillas vemos que 131 y 10 presentan una fuerte bioactividad. Debido a la escasa cantidad de extracto del medio de AHC, no pudo evaluarse su actividad fitotóxica ni compararse con la del micelio. El extracto del medio de cultivo del aislamiento 55 muestra mayor fitotoxicidad que el de su micelio (< 60% y > 40% respectivamente).

Los datos de los bioensayos de los extractos obtenidos de los micelios en condición estática muestran que PC, AEC y 101 tienen una fuerte bioactividad sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos de prueba. El primero y el último son los que presentan mayor actividad inhibitoria sobre los hongos fitopatógenos (aproximadamente 50%), la cual fue la mayor observada en todos los bioensayos de extractos obtenidos en condiciones estáticas del presente trabajo. En el caso de las semillas solo 110BP y AHC muestran una actividad inhibitoria superior a 40%.

Cuadro 6.3. Efecto de los extractos del micelio obtenidos de los cultivos en agitación sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).

HONGO ENDÓFITO	FITOPATÓGENOS				SEMILLAS		
	% de inhibición del crecimiento radial				% de inhibición del crecimiento de la raíz		
	<i>P. capsici</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>	<i>L. esculentum</i>
110 BP	ND	ND	ND	ND	32.51%*	15.28%	46.12%*
AHC	ND	ND	ND	ND	69.85%*	36.92%*	71.86%*
CHB	0.00%	-0.85%	14.12%	9.29%	4.20%	18.63%	20.68%
55	-2.24%	-10.98%	11.37%	7.94%	37.12%*	31.53%*	ND
131	14.33%	14.16%	7.79%	4.25%	76.50%*	71.78%*	64.79%*
1CB	-10.47%	-11.01%	9.26%	11.46%	16.56%	6.65%	13.11%
LD1	61.46%*	55.86%*	5.98%	9.83%	17.41%	11.43%	14.91%
PC	29.10%*	25.63%*	20.63%	19.46%	45.41%*	18.40%	ND
AEC	-0.23%	19.68%	28.29%*	17.92%	51.33%*	45.88%*	64.15%*
53	-4.65%	-4.19%	11.37%	1.43%	37.85%*	26.13%*	35.37%*
LH	-3.98%	0.54%	1.47%	3.55%	43.63%*	34.07%*	57.99%*
10	5.99%	10.61%	12.12%	6.19%	70.56%*	86.27%*	79.45%*
7	-10.24%	-10.72%	5.53%	3.47%	-5.51%	-1.35%	-1.25%

* p < 0.05. Número negativos = estimulación del crecimiento. ND = bioensayos no realizados por problemas con la solubilidad de los extractos o insuficiencia de los mismos.

Cuadro 6.4. Efecto de los extractos del medio obtenidos de los cultivos en agitación sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).

HONGO ENDÓFITO	FITOPATÓGENOS				SEMILLAS		
	porcentaje de inhibición del crecimiento radial				porcentaje de inhibición del crecimiento radicular		
	<i>P. capsici</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>	<i>L. esculentum</i>
110 BP	ND	ND	ND	ND	15.25%	6.60%	57.61%*
AHC	52.05%*	70.75%*	36.48%*	38.25%*	ND	ND	ND
CHB	4.40%	40.57%*	29.68%*	25.44%*	ND	ND	ND
55	-3.33%	8.15%	26.20%*	27.49%*	61.55%*	66.52%*	85.87%*
131	0.00%	66.57%*	25.25%*	6.50%	65.31%*	52.40%*	71.50%*
1CB	7.35%	37.19%*	26.38%*	26.38%*	59.09%*	0.15%	17.76%
LD1	59.82%*	68.75%*	22.58%	18.20%	15.14%	6.54%	42.97%*
PC	100.00%*	100.00%*	24.98%*	29.60%*	58.94%*	9.68%	ND
AEC	-3.36%	-0.93%	19.32%	5.79%	35.47%*	38.45%*	29.91%*
53	12.14%	73.75%*	30.93%*	22.29%	30.84%*	30.60%*	69.11%*
LH	11.11%	100.00%*	28.81%*	11.98%	37.75%*	34.70%*	21.09%
10	21.46%	45.62%*	22.35%	10.58%	92.84%*	93.49%*	80.78%*
7	-6.19%	-4.86%	-1.05%	4.38%	50.90%*	3.36%	ND

* p < 0.05. Número negativos = estimulación del crecimiento. ND = bioensayos no realizados por problemas con la solubilidad de los extractos o insuficiencia de los mismos.

Cuadro 6.5. Efecto de los extractos del micelio obtenidos de los cultivos estaticos sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).

MICELIO ESTATICO							
HONGO ENDÓFITO	FITOPATÓGENOS				SEMILLAS		
	porcentaje de inhibición del crecimiento radial				porcentaje de inhibición del crecimiento radicular		
	<i>P. capsici</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>	<i>L. esculentum</i>
110 BP	ND	ND	ND	ND	41.91%	25.73%	55.95%
AHC	ND	ND	ND	ND	65.49%	38.54%	65.09%
CHB	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
55	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
131	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1CB	-10.47%	-8.18%	13.80%	14.95%	ND	ND	ND
LD1	38.83%*	42.81%*	5.50%	23.11%	22.03%	7.13%	3.18%
PC	30.54%*	100.00%*	50.93%*	45.36%*	38.67%*	19.34%	ND
AEC	60.37%*	68.99%*	33.07%*	28.71%*	26.56%*	39.02%*	25.75%*
53	-6.71%	7.78%	13.73%	4.68%	21.96%	21.53%	4.48%
LH	ND	ND	ND	ND	29.75%*	27.46%*	14.14%
10	33.11%*	-11.33%	16.02%	22.15%	28.83%*	36.08%*	56.18%*
7	-6.02%	-4.65%	0.61%	7.00%	-8.03%	-7.56%	-0.43%
101	65.64%*	65.80%*	47.23%*	52.53%*	7.51%	32.06%*	8.81%

* p < 0.05. Número negativos = estimulación del crecimiento. ND = bioensayos no realizados por problemas con la solubilidad de los extractos o insuficiencia de los mismos.

Cuadro 6.6. Efecto de los extractos del medio obtenidos de los cultivos estaticos sobre el crecimiento radial de microorganismos fitopatógenos (250 µg/mL) y de la raíz de las plantas de prueba (125 µg/mL).

MEDIO ESTATICO							
HONGO ENDÓFITO	FITOPATÓGENOS				SEMILLAS		
	porcentaje de inhibición del crecimiento radial				porcentaje de inhibición del crecimiento radicular		
	<i>P. capsici</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>A. solani</i>	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>E. crus-galli</i>	<i>L. esculentum</i>
110 BP	ND	ND	ND	ND	63.42%*	31.57%*	69.26%*
AHC	ND	ND	ND	ND	78.77%*	49.60%*	76.35%*
CHB	ND	ND	ND	ND	56.95%*	50.66%*	63.97%*
55	-13.03%	-2.59%	22.51%	13.55%	49.71%*	50.73%*	61.46%*
131	0.00%	-2.27%	12.51%	8.67%	ND	ND	ND
1CB	0.00%	26.06%*	27.82%*	24.46%	30.68%*	30.15%*	46.15%*
LD1	9.56%	61.95%*	25.90%*	18.83%	ND	ND	ND
PC	40.33%*	100.00%*	18.76%	33.80%*	38.57%*	30.78%*	60.41%*
AEC	6.76%	34.79%*	3.98%	4.43%	27.13%*	-6.50%	5.41%
53	9.39%	10.37%	18.45%	8.37%	72.60%*	42.39%*	83.28%*
LH	-11.11%	-1.75%	1.25%	5.67%	29.50%*	16.00%	14.61%
10	31.68%*	55.31%*	37.50%*	25.35%*	92.84%*	91.33%*	100.00%*
7	-3.54%	-1.62%	-2.32%	1.04%	53.09%*	62.11%*	78.59%*
101	26.87%*	67.10%*	29.52%*	9.01%	32.27%*	15.53%	80.01%*

* p < 0.05. Número negativos = estimulación del crecimiento. ND = bioensayos no realizados por problemas con la solubilidad de los extractos o insuficiencia de los mismos.

En los extractos del medio en condiciones estáticas, el endófito PC destaca entre todos los demás por su actividad inhibitoria sobre los fungoides fitopatógenos, particularmente sobre *Phytophthora parasitica* la cual es inhibida 100% (el extracto del micelio en condición estática también lo inhibe 100%). Los extractos en condiciones estáticas de LD1 y 10 presentan una buena actividad sobre *P. parasitica* (62% y 67% respectivamente).

En el caso de las plantas de prueba, los extractos del medio en condición estática de 110BP, AHC, CHB, 55, PC, 53, 10 y 7 inhiben en general más del 50% del crecimiento de la raíz de las tres especies. El endófito 101 inhibe 80% la raíz de jitomate.

Con base en los resultados obtenidos de todos los bioensayos, los hongos que, en general, mostraron mayor bioactividad son: 10, AHC, 101 y PC.

6.4. Hongo seleccionado para el fraccionamiento biodirigido

El endófito 101 fue seleccionado como el hongo idóneo para realizar la fermentación a mediana escala tomando en cuenta varios factores: 1) el alto rendimiento en la producción del extracto del micelio; 2) el hongo creció mucho mejor en condiciones estáticas, lo que excluyó la necesidad de contratar el servicio para escalar la fermentación en condiciones de agitación; 3) la importante bioactividad de sus extractos de micelio y medio sobre los microorganismos fitopatógenos de prueba (particularmente sobre los hongos); 4) el micelio presentó mayor actividad antifúngica que el medio (Figura 6.1).

6.5. Fermentación a mediana escala y obtención de los extractos

Puesto que el hongo endófito 101 no creció bajo agitación, se realizó la fermentación a mediana escala de manera estática manteniendo las condiciones óptimas de temperatura y medio de cultivo (ver Cuadro 5.3)

Como resultado de la fermentación se obtuvo una gran cantidad de extracto de micelio (50.68 g) y muy poca del medio (314 mg). Con base en estos resultados, el extracto del micelio se seleccionó para realizar el fraccionamiento biodirigido.

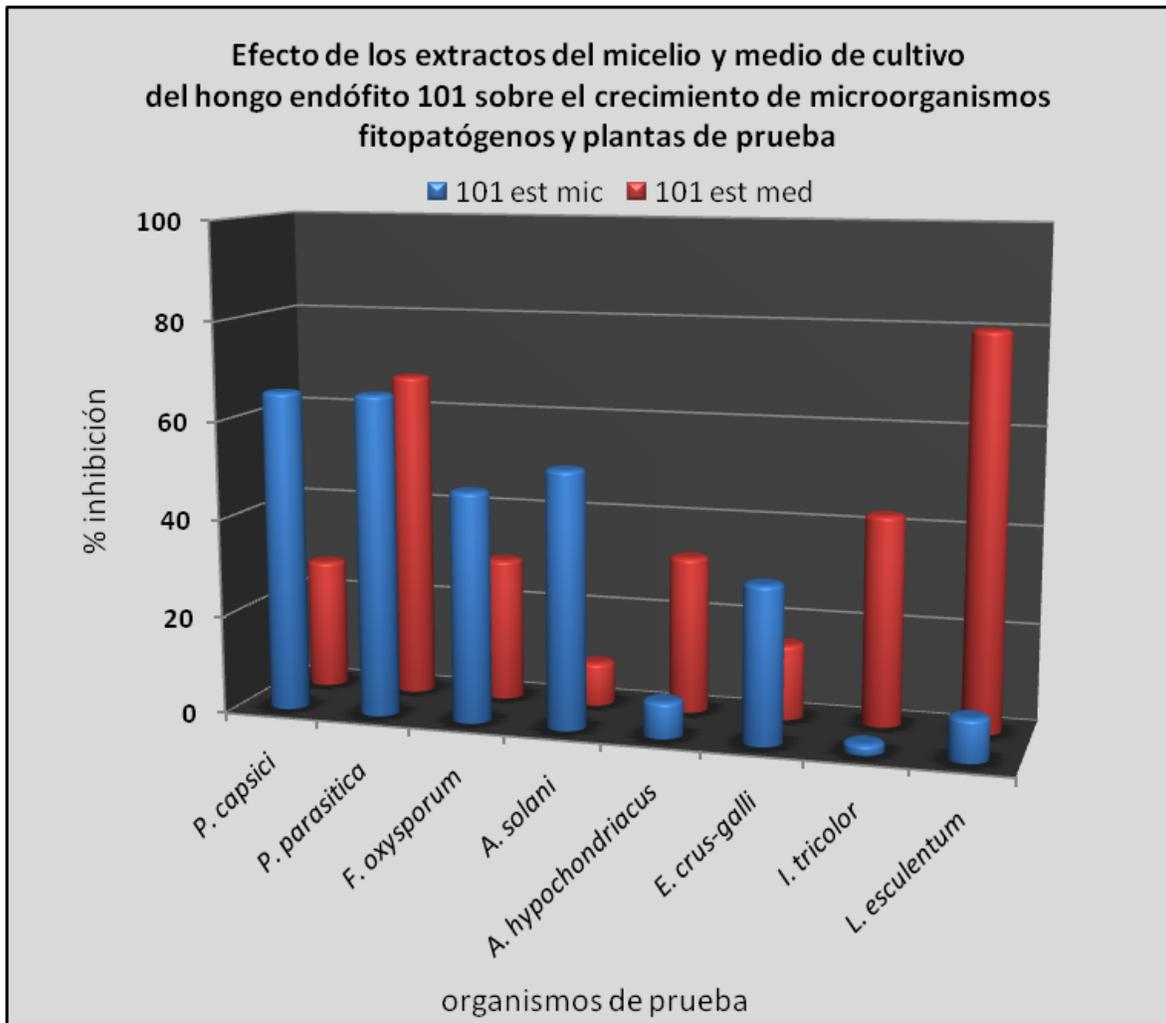


Figura 6.1. Efecto de los extractos del micelio y el medio de cultivo del hongo endófito 101 sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.

6.6. Fraccionamiento Biodirigido del Extracto Activo del Hongo Endofito 101

Una vez que se demostró el potencial aleloquímico (efecto fitotóxico y antifúngico) y el rendimiento del extracto del micelio, se procedió al aislamiento de los metabolitos secundarios bioactivos a partir del mismo utilizando un fraccionamiento biodirigido. Como ensayos de monitoreo de la actividad fitotóxica se utilizó el método en caja de Petri (Anaya et al., 2005) y el de dilución en agar para monitorear la actividad antifúngica (Anaya et al., 2003).

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo del micelio, utilizando una cromatografía en columna abierta, permitió obtener 14 grupos de fracciones primarias cuyos rendimientos se presentan en el Cuadro 6.8. Es importante hacer notar que las fracciones poco polares presentan los rendimientos más bajos, es decir el micelio del endófito 101 produce mayor cantidad de metabolitos medianamente polares y polares (Fracciones VII-XII).

Cuadro 6.8. Rendimiento de las fracciones primarias obtenidas.

<i>Fracción</i>	<i>Peso (g)</i>
I	0.0667
II	0.1341
III	0.1188
IV	0.5997
V	0.0567
VI	0.0091
VII	23.757
VIII	0.2326
IX	1.8353
X	5.1205
XI	5.0594
XII	4.896
XIII	0.2579
XIV	0.1983

6.7. Fraccionamiento primario del extracto del micelio obtenido de la fermentación a mediana escala.

La actividad antifúngica y fitotóxica mostrada durante los bioensayos con los organismos de prueba, permitió seleccionar las fracciones con mayor bioactividad.

En la Figura 6.2 se muestra el perfil de la actividad fungitóxica y fitotóxica. Es evidente que las fracciones más activas son las más polares. La fracción XII causó la mayor inhibición del crecimiento radial de los cuatro microorganismos de prueba. La fracción XI mostró la mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la raíz de las plantas de prueba. Debido a que las fracciones menos polares no son solubles en un disolvente adecuado para realizar los bioensayos con microorganismos, no se pudo determinar su efecto sobre éstos.

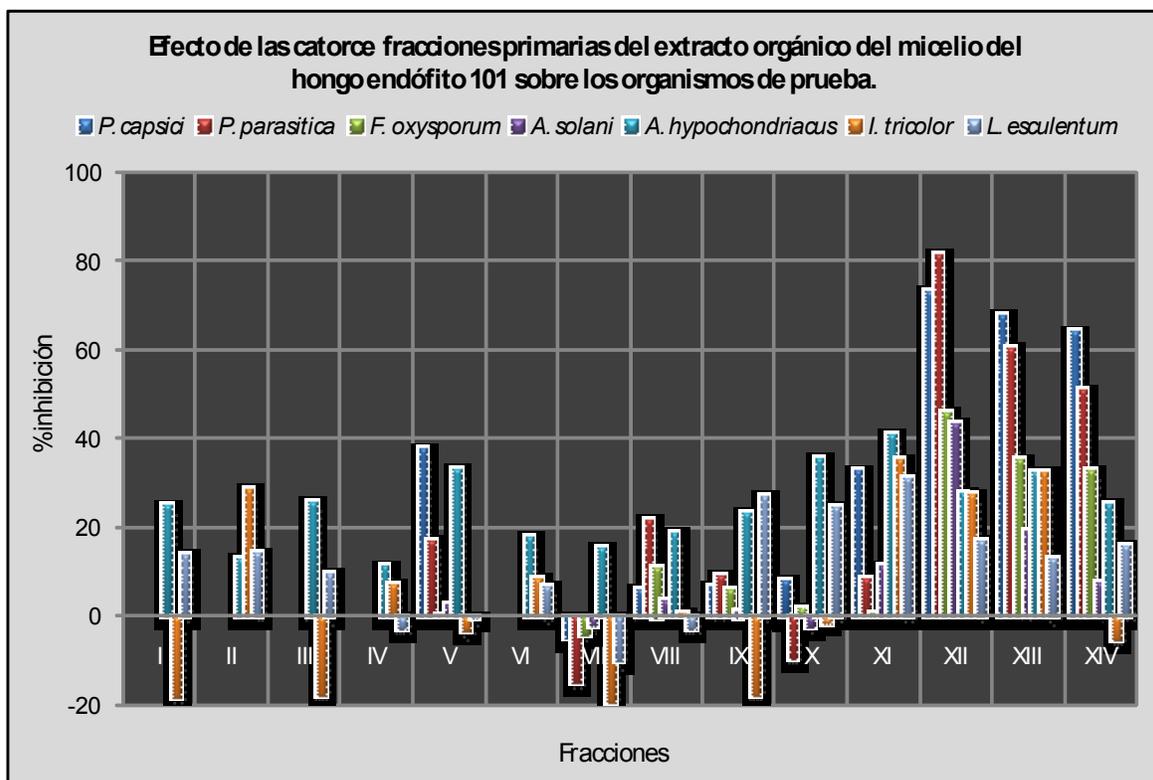


Figura 6.2. Efecto de los extractos del micelio del hongo endófito 101 sobre el crecimiento de microorganismos fitopatógenos y plantas de prueba.

6.8. Aislamiento del metabolito secundario mayoritario presente en la fracción primaria XII del extracto del micelio del endófito 101.

De la fracción primaria activa XII (4.896 g) precipitó espontáneamente un heterodímero novedoso, la xantoquinodina J (**69**), cuya estructura y rendimiento se pueden observar en el Cuadro 6.9.

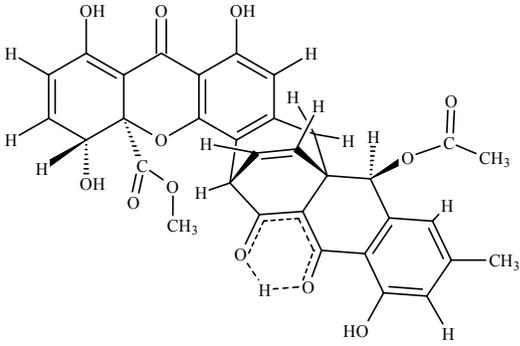
La caracterización de la xantoquinodina J (**69**) aislada se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos. A continuación se discutirá en detalle los aspectos más importantes del análisis que permitieron la determinación de la estructura molecular de este novedoso metabolito.

6.9. Caracterización de la xantoquinodina J (**69**).

El compuesto **69** se aisló como un sólido cristalino de color amarillo intenso, soluble en CH_2Cl_2 y con un punto de fusión de 219.6-220.5 °C. El espectro en el UV presenta absorciones intensas en λ_{max} 373, 277 y 242 nm características de un núcleo xantoquinodina (Tabata *et al.*, 1993;1996). Por otra parte, el espectro en el IR (Espectros 1)

de este compuesto presenta bandas de absorción asociadas con su carácter aromático (ν_{\max} . 1637 cm^{-1}) y con la presencia de grupos hidroxilo (ν_{\max} . 3435 cm^{-1}) y carbonilo (conjugado, de acetato y de grupo carboximetilo) (ν_{\max} . $\sim 1637\text{ cm}^{-1}$ y $\sim 1740\text{ cm}^{-1}$). El espectro de masa presentó un ión molecular en una relación de masa carga de 614 y permitió establecer una fórmula molecular de $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{O}_{12}$ (Espectros 2; Cuadro 6.10). Esta fórmula permite calcular un índice de insaturación de veinte.

Cuadro 6.9. Xantoquinodina J (**69**) aislada del extracto del micelio del hongo endófito 101.

Xantoquinodina J	Rendimiento
	35.56 mg/L
(69)	

Los espectros de resonancia magnética unidimensionales (RMN ^1H y RMN ^{13}C) y bidimensionales (HMQC, HMBC, COSY y NOESY) permite establecer que el producto natural presenta el núcleo estructural de un heterodímero de xantona y oxantrona (Tabata *et al.*, 1993;1996; Ducrot, 2001). A continuación se discute en detalle las características principales de los espectros:

a) El espectro de RMN ^{13}C (Espectro 3) presentan señales para 33 átomos de carbono en conformidad con la fórmula molecular establecida por espectrometría de masas (Cuadro 6.10).

b) En la región aromática del espectro de RMN ^1H (Espectros 4) se observan dos protones aromáticos meta acoplados en δ_{H} 6.80 (d, $J = 1.5\text{ Hz}$) y 6.89 (d, $J = 1.5\text{ Hz}$) y un protón aromático aislado en δ_{H} 6.14 (s). Estas tres señales presentan correlación en el

espectro HSQC con tres metinos de carácter aromático en δ_C 119.42, 123.30 y 114.16 respectivamente (Espectros 5 y 6).

Cuadro 6.10. Constantes espectroscópicas de IR, de UV y espectrométricas de la xantoquinodina J (**69**).

IR ν_{\max} (KBr) cm^{-1}	3435, 1740, 1637, 1573
EM-IE m/z (intensidad relativa)	614 [M^+ (31.94)], 555 (100), 521 (91.67), 18 (79.86), 582 (78.47), 522 (71.53), 44 (45.14), 43 (43.75), 505 (40.28), 477 (37.50), 556 (36.11), 57 (29.86), 583 (29.86), 205 (29.17), 380 (29.17), 55 (27.78), 495 (27.78), 478 (25.69), 121 (25.00), 494 (25.00), 28 (24.31), 504 (24.31), 476 (23.61), 224 (22.92), 39 (22.22), 69 (22.22), 467 (22.22), 17 (21.53), 230 (20.83), 163 (19.44), 360 (19.44), 195 (18.75), 273 (18.75), 84 (18.06), 218 (18.06), 229 (17.36), 71 (16.67), 105 (16.67), 275 (16.67), 449 (16.67), 506 (16.67%), 45 (15.97%), 97 (15.28), 540 (15.28), 338 (14.58), 115 (13.89), 290 (13.89), 137 (13.19).
UV (CH_3OH) λ_{\max} nm	373, 277, 285, 260, 242

c) En la zona vinílica del espectro de RMN ^1H se observan dos pares de señales dobles centradas 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 6.08 (dd, $J = 10.5, 3.0$ Hz) y 6.43 (dd, $J = 10.5, 3.0$ Hz) asignables a cuatro hidrógenos vinílicos los cuales muestran correlaciones con la señales en δ_C 123.50, 143.78, 132.50 y 131.77, respectivamente en el espectro HSQC.

d) En el espectro de RMN ^1H se observan señales asignables a tres metinos en δ_H 4.82 (dd, $J = 6.6, 1.0$ Hz), 5.30 (t $J = 2.5$ Hz) y 5.97 (s). Estas tres señales presentan correlación en el espectro HSQC con tres metinos de carácter alifático en δ_C 38.13, 74.54 y 73.02 respectivamente.

Cuadro 6.11. Datos espectroscópicos de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) y de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de la xantoquinodina J (**69**).

Posición	δ_{C} (δ)	Multiplicidad (DEPT)	δ_{H} (δ) (mult. J en Hz)
1	---	---	---
2	84.87	C	---
3	74.54	CH	5.30 (t, $J = 2.5$ Hz)
4	143.78	CH	6.51 (dd, $J = 10.5, 3.0$ Hz)
5	123.52	CH	6.13 (dd, $J = 10.5, 3.0$ Hz)
6	171.04	C	---
7	99.02	C	---
8	185.10	C	---
9	105.43	C	---
10	159.80	C	---
11	114.16	CH	6.14 (s)
12	147.56	C	---
13	114.94	C	---
14	154.15	C	---
15	168.71	C	---
16	53.12	CH_3	3.70 (s)
1'	73.02	CH	5.97 (1H, s)
2'	136.32	C	---
3'	119.42	CH	6.80 (d, $J = 1.5$ Hz)
4'	147.76	C	---
5'	123.30	CH	6.89 (d, $J = 1.5$ Hz)
6'	161.52	C	---
7'	112.46	C	---
8'	185.17	C	---
9'	105.62	C	---
10'	186.36	C	---
11'	38.13	CH	4.82 (dd, $J = 6.6, 1.0$ Hz)
12'	131.77	CH	6.43 (dd, $J = 8.3, 6.8$ Hz)
13'	132.50	CH	6.08 (dd, $J = 8.3, 1.0$ Hz)
14'	41.47	C	---
15'	35.12	CH_2	2.79 (d, $J = 18.0$ Hz) 2.69 (d, $J = 18.0$ Hz)
16'	22.06	CH_3	2.38 (s)
17'	170.41	C	---
18'	21.09	CH_3	2.01 (s)
OH-3	---	---	*
OH-6	---	---	14.18 (s)
OH-10	---	---	11.11 (s)
OH-6'	---	---	11.35 (s)
OH-8'	---	---	14.40 (s)

* El protón del OH-3, no se observó bajo las condiciones experimentales utilizadas.

e) En δ_H 11.11, 11.35, 14.18 y 14.40 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'.

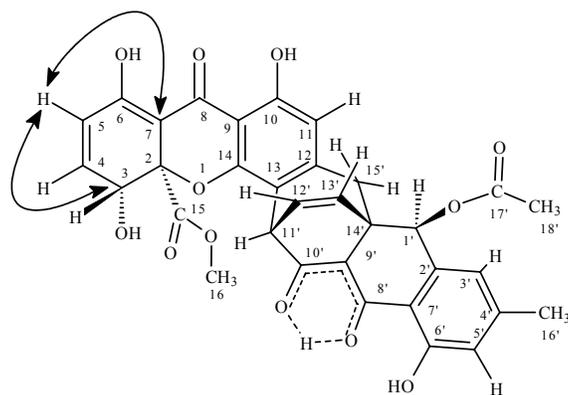
f) A campo alto, el espectro de RMN 1H presenta dos dobles centrados en δ_H 2.69 (d, $J = 18.0$ Hz) y 2.79 (d, $J = 18.0$ Hz) asignables a un grupo metileno de carácter alifático los cuales correlacionan con la señal en δ_C 35.12 en el espectro de correlación heteronuclear HSQC.

g) En el espectro de RMN 1H se observan tres singuletes atribuibles a un grupo metil éster en δ_H 3.70, un grupo metilo sobre anillo aromático en δ_H 2.38 y a un metilo de grupo acetato en δ_H 2.00, cada uno de ellos presenta una correlación en el espectro HSQC con los carbonos en δ_C 53.12, 22.06 y 21.10, respectivamente.

h) Finalmente, los carbonos restantes observados en los espectros de RMN ^{13}C se asignaron con base en el análisis del espectro de RMN ^{13}C en su modalidad DEPT. (Espectros 7) a cuatro grupos carbonilo en δ_C 168.71, 170.41, 185.10 y 186.36 a trece carbonos cuaternarios aromáticos en δ_C 99.02, 105.43, 105.62, 112.46, 114.94, 136.32, 147.56, 147.76, 154.15, 159.80, 161.52, 171.04 y 185.17 y a dos a carbonos cuaternarios alifáticos en δ_C 41.74 y 84.87. De acuerdo con los desplazamientos químicos observados, cuatro de los carbonos cuaternarios aromáticos se encuentran unidos a funciones oxigenadas (Espectros 3; Cuadro 6.11).

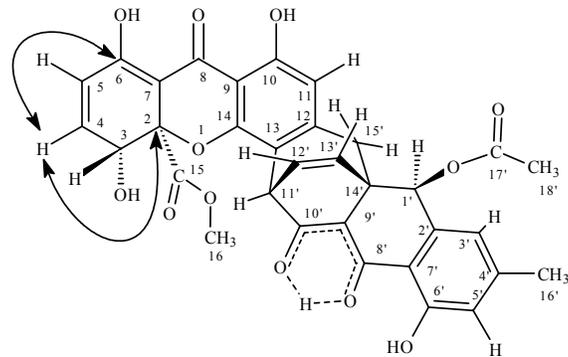
El análisis detallado de los espectros de correlación homonuclear (COSY y NOESY; Espectros 8 y 9, respectivamente) y heteronuclear (HMBC; Espectro 10) permitió determinar la ubicación de los grupos funcionales en el núcleo xantoquinodina. Las conclusiones más importantes se resumen a continuación:

a) El espectro HMBC del compuesto **69** muestra que los carbonos en δ_C 99.02 (C-7) y en δ_C 74.54 (C-3) muestran una correlación con el protón en δ_H 6.13 (H-5) [Estructura A].



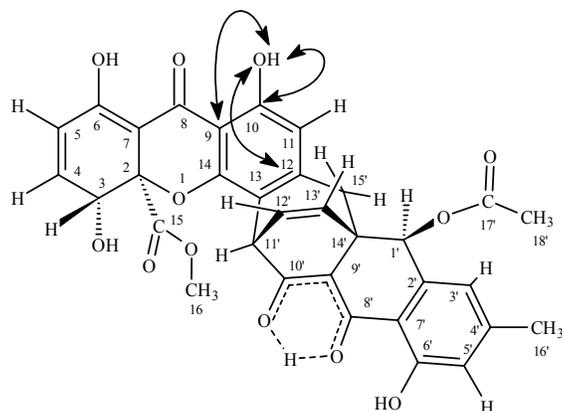
A

b) La señal para el carbono cuaternario base de oxígeno en δ_C 171.04 (C-6) y para el carbono cuaternario alifático en δ_C 84.87 (C-2) correlacionan con el hidrógeno en δ_H 6.51 (H-4) [Estructura B].

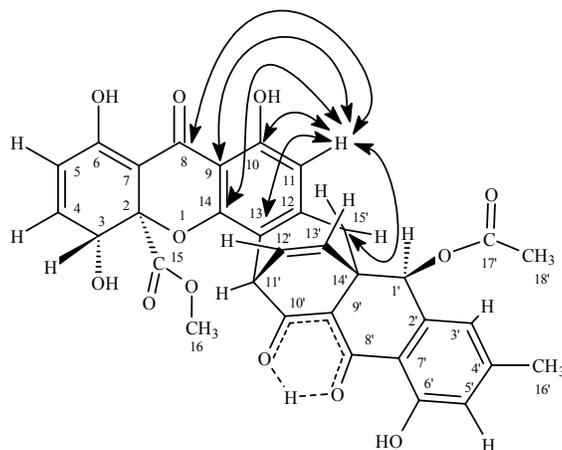


B

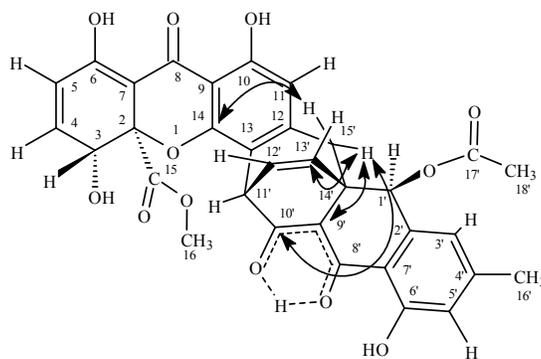
c) Los carbonos de los metinos en δ_C 123.50 (C-5) y en δ_C 143.78 (C-4), el carbono en δ_C 84.87 (C-2) y el carbonilo de éster metílico en δ_C 168.71 (C-15) correlacionan con el hidrógeno en δ_H 5.30 (H-3) [Estructura C]. De manera adicional en los espectros COSY y NOESY, se observan las correlaciones entre H-4/H-3, H-5 (Estructura D).

**E**

f) Los carbonos cuaternarios en δ_C 185.10 (C-8), 105.43 (C-9), 159.80 (C-10), 114.94 (C-13), 154.15 (C-14) y 35.12 (C-15'), muestran una correlación a larga distancia con el hidrógeno aromático en δ_H 6.14 (H-11) [Estructura F].

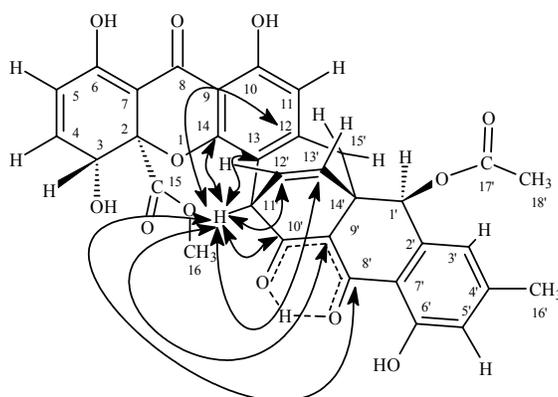
**F**

g) El espectro HMBC del heterodímero **69** muestra que los carbonos cuaternarios en δ_C 154.15 (C-14), 105.62 (C-9') y 186.36 (C-10') y el carbono vinílico en 132.50 (C-13') muestran una correlación con los protones del metileno en δ_H 2.79 y 2.69 (H-15') [Estructura G].



G

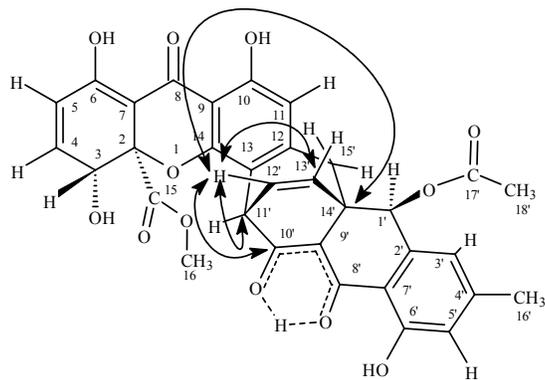
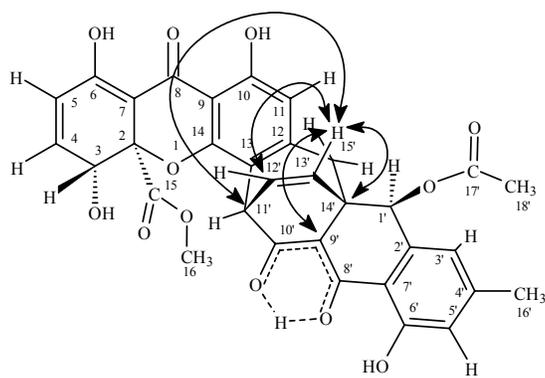
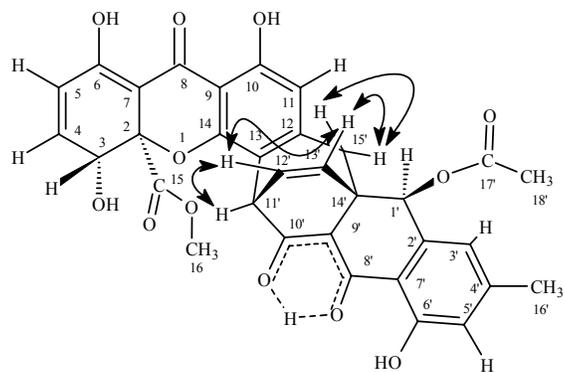
h) Los carbonos de los metinos vinílicos en δ_C 137.77 (C-12') y 132.50 (C-13'), y los carbonos cuaternarios en δ_C 185.17 (C-8') 105.62 (C-9'), 186.36 (C-10'), 147.56 (C-12), 114.94 (C-13) y 154.15 (C-14) muestran una interacción a larga distancia con el hidrógeno en δ_H 6.51 (H-11') [Estructura H].



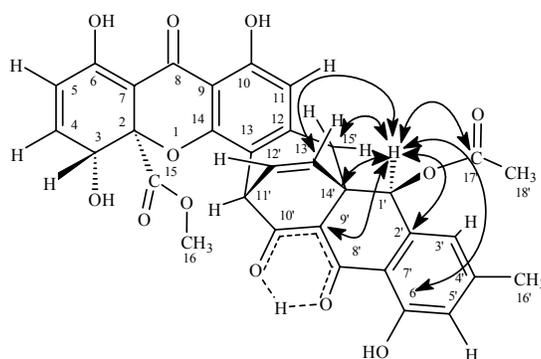
H

i) El metino en δ_C 38.13 (C-11') y el carbono cuaternarios en δ_C 41.47 (C-14') correlacionan con los hidrógenos vinílicos en δ_H 6.43 (H-12') [Estructura I] y δ_H 6.08 (H-13') [Estructura J]. El carbono base de oxígeno en δ_C 186.36 (C-10') y el carbono vinílico en δ_C 132.50 (C-13') también muestran una correlación con el hidrogeno en δ_H 6.43 (H-12'). De manera adicional, el carbono cuaternario en δ_C 105.62 (C-9') y el carbono vinílico en δ_C 131.77 (C-12') correlacionan con el hidrogeno en δ_H 6.08 (C-13').

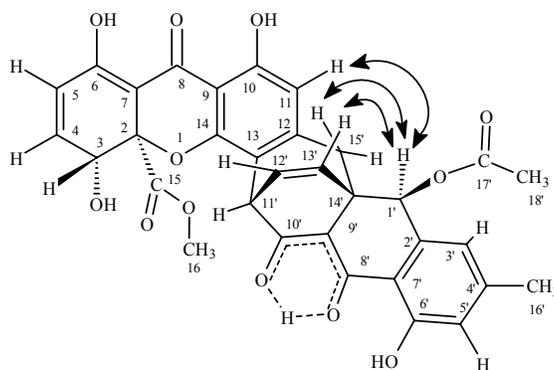
El grupo de correlaciones descritas en los incisos g-i, así como los cuadros de conectividad observados en los espectros COSY y NOESY entre H-11'/H-12', entre H-12'/H-13' y H-13'/H-15' (Estructura K) permiten establecer que la unión entre las dos moléculas que conforman el heterodímero (xantona y oxantrona) es por medio de un puente de etileno en C-12' y C-13' con configuración Z.

**I****J****K**

j) El espectro HMBC del compuesto **69** muestra que los carbonos cuaternarios en δ_C 136.62 (C-2'), 161.52 (C-6'), 105.62 (C-9') y 41.47 (C-14'), el metino vinílico en δ_C 132.50 (C-13') y el metileno en δ_C 32.15 (C-15') muestran una correlación con el protón en δ_H 5.97 (H-1'). Por otro lado, el carbonilo del grupo acetato en δ_C 170.41, también muestran una correlación a larga distancia con el hidrógeno en δ_H 5.97 (H-1') [Estructura L]. Estas correlaciones en conjunto, permiten ubicar al grupo acetato en la posición C-1'. De manera adicional, en el espectro NOESY se observa una clara interacción entre el metilo sobre anillo aromático en δ_H 2.38 (CH₃-16') y el metilo del grupo acetato en δ_H 2.00 (CH₃-18'). Estas correlaciones proporcionan una evidencia adicional para la ubicación del grupo acetato en C-1' (Estructura M). Finalmente, en el espectro NOESY, se observan correlaciones en el para H-1'/H-13', H-1'/H-15' y H-1'/H-11. (Estructura M).

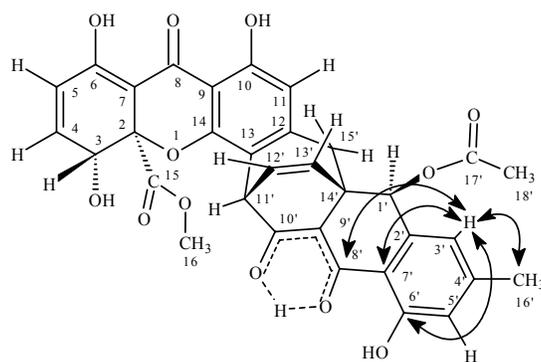


L

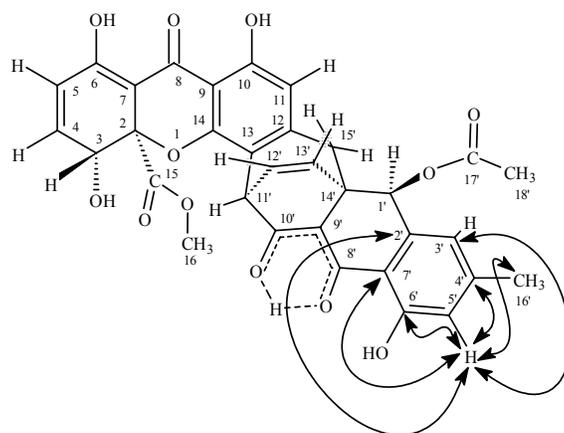


M

k) El espectro HMBC del metabolito secundario **69** muestra que los carbonos cuaternarios en δ_C 161.52 (C-6') y 112.46 (C-7') y el metilo en δ_C 22.06 (C-16') muestran una correlación con los dos protones aromáticos meta acoplados en δ_H 6.80 (H-3') [Estructuras N] y 6.89 (H-5') [Estructuras O]. De manera adicional, el carbono cuaternario en δ_C 185.17 (C-8') correlaciona con la señal doble en δ_H 6.80 (H-3') y los carbonos en δ_C 136.32 (C-2'), 119.42 (C-3') y 147.76 (C-4') correlacionan con el doble en δ_H 6.89 (H-5').



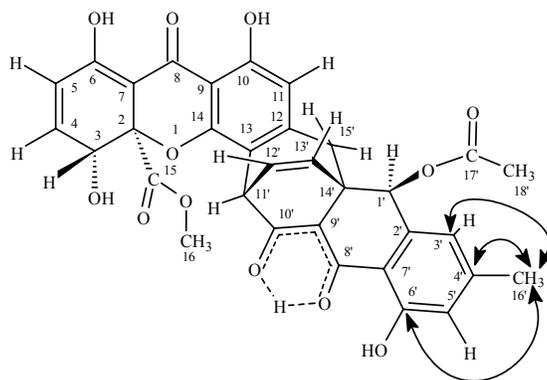
N



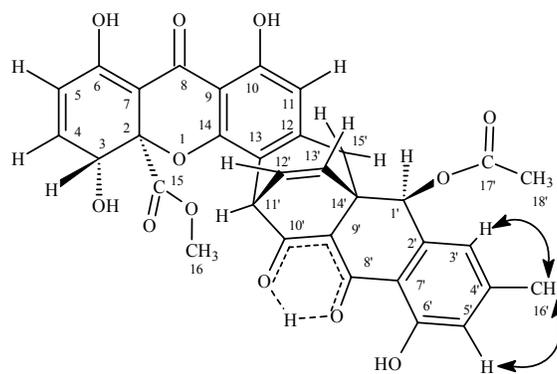
O

k) Los carbonos aromáticos en δ_C 119.42 (C-3'), 147.76 (C-4') y 161.52 (C-6') muestran una correlación con el grupo metilo sobre anillo aromático en δ_H 2.38 (CH₃-4') [Estructura P]. El grupo de correlaciones recién descritas (incisos j y k), así como las

observadas en el espectro NOESY entre H-3/CH₃-16' y H-5/CH₃-16' [Estructura Q] permiten ubicar al grupo metilo en δ_H 2.38 en C-4'.



P



Q

l) Los carbonos cuaternarios en δ_C 161.52 (C-4') y 112.46 (C-7') y el metino aromático en δ_C 123.30 (C-5') correlacionan con el hidrógeno en δ_H 11.36. Este grupo de correlaciones permite ubicar al restante hidroxilo quelatado en la posición C-6' (Estructura R).

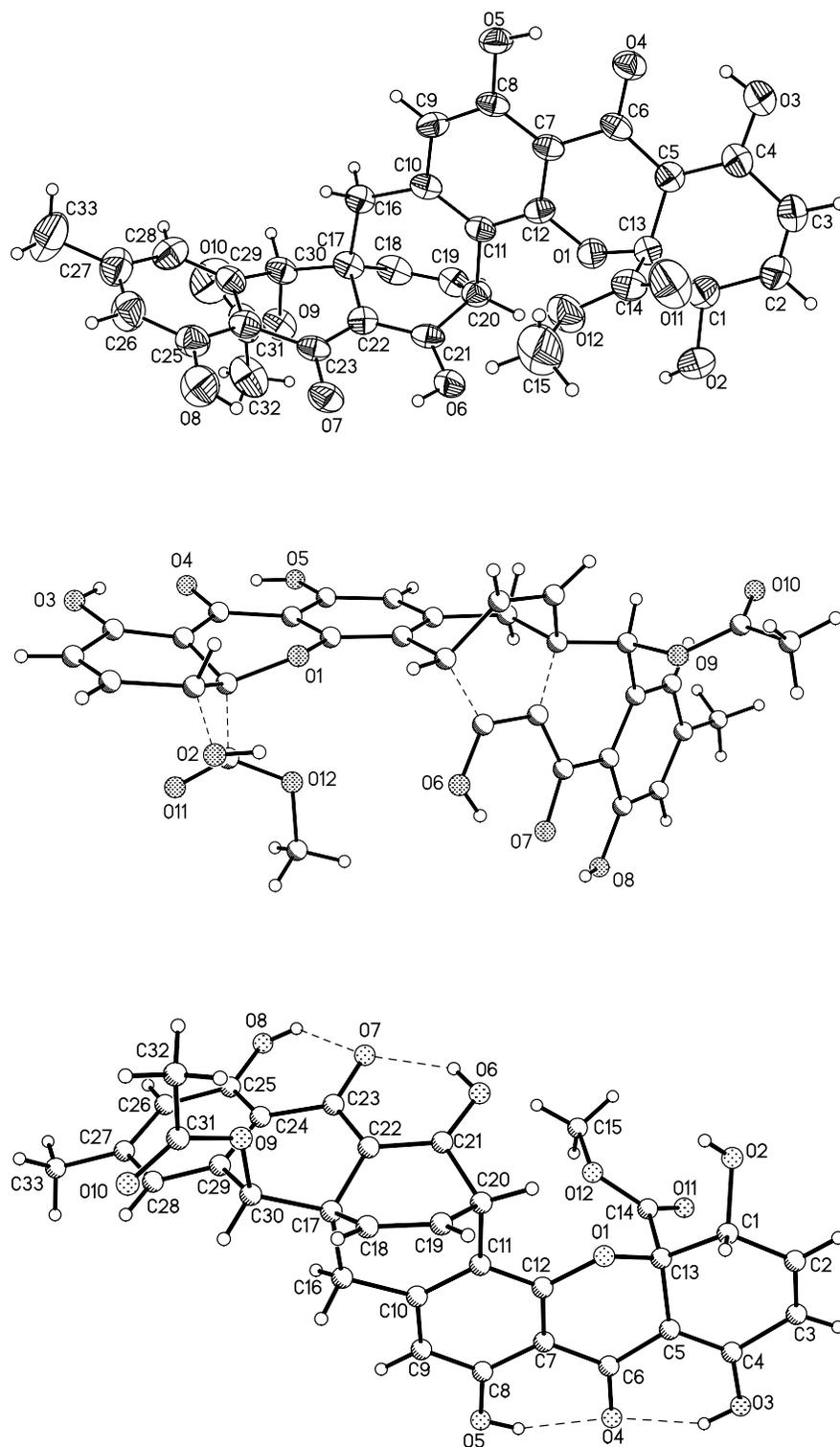


Figura 6.4. Vista estereoscópica de la xantoquinodina J (69).

6.10. Determinación del potencial aleloquímico de la Xantoquinodina J (69).

La xantoquinodina J (69) fue ensayada biológicamente para determinar su efecto antifúngico y fitotóxico. En la Figura 6.6 muestran los resultados de dichos bioensayos presentados en conjunto con los obtenidos para el extracto del micelio del endófito 101 y la fracción XII, claro está que la actividad antifúngica de las tres muestras evaluadas es prácticamente la misma, de donde podemos decir que la actividad presentada por el extracto del micelio está principalmente determinada por la xantoquinodina J (69), en otras palabras, este compuesto es el metabolito bioactivo o aleloquímico responsable de la actividad fungitóxica del hongo endófito 101.

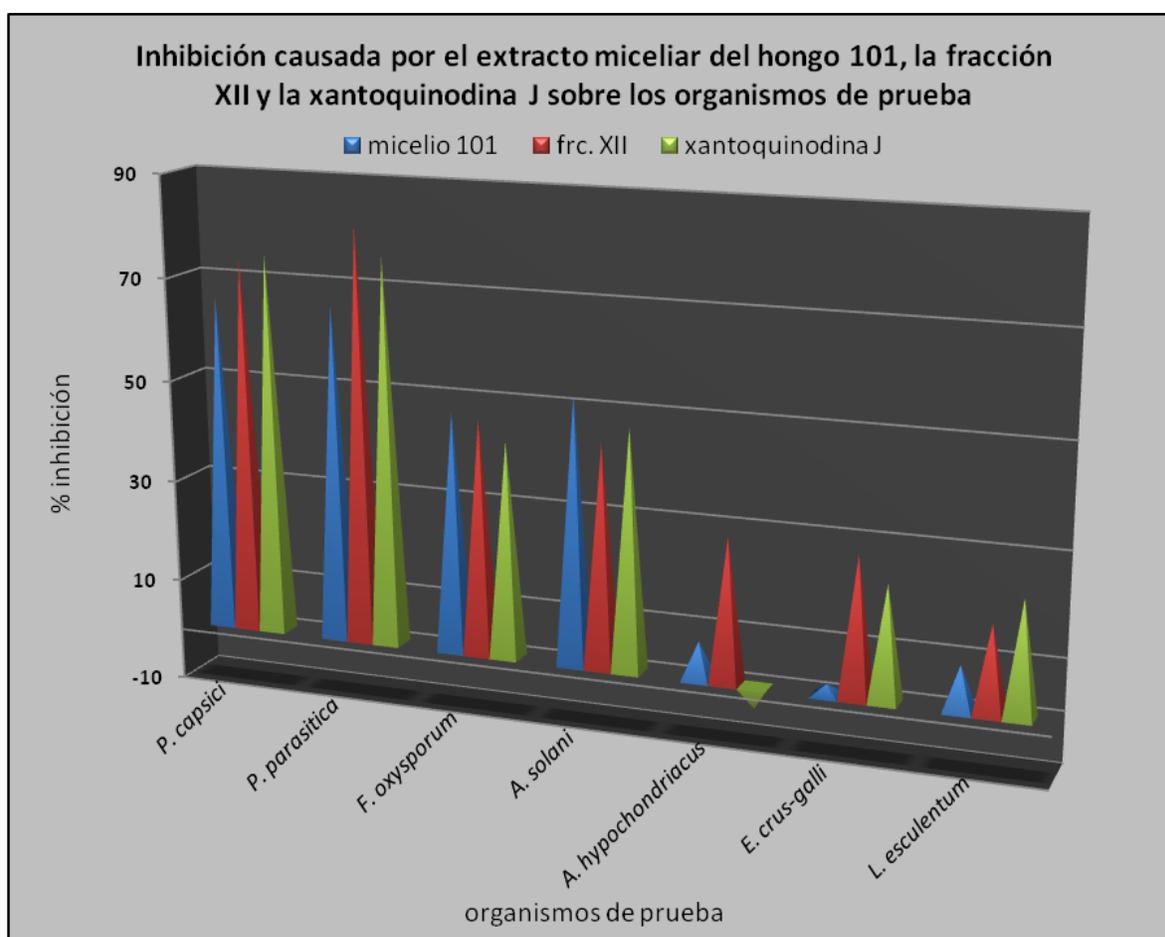


Figura 6.5. Inhibición causada por el extracto miceliar del hongo 101, la fracción XII y la xantoquinodina J (69) sobre los organismos de prueba

La comparación de la actividad de la xantoquinodina J (69) con la del fungicida utilizado como control positivo, el Captan®, puede observarse en el Cuadro 6.9 donde se lee la concentración inhibitoria media (DE₅₀) de cada sustancia frente a cada uno de los

microorganismos fitopatógenos. La DE_{50} obtenida para los fungoides (*P. parasítica* y *P. capsici*) nos indica que comercialmente podría utilizarse este compuesto para combatir las enfermedades causadas por estos microorganismos ya que su actividad es superior a la del Captan®, aunque en el caso de los hongos verdaderos la DE_{50} de la xantoquinodina J (**69**) es mucho mayor que la del control positivo.

Cuadro 6.12. Dosis efecivas medias de la xantoquinodina J (**69**) y el testigo positivo (Captan®) para los microorganismos fitopatógenos.

compuesto	<i>Dosis Efectiva Media (DE₅₀)(μM)</i>			
	microorganismos fitopatógenos			
	<i>P. capsici</i>	<i>P. parasitica</i>	<i>F. oxyporum</i>	<i>A. solani</i>
Xantoquinodina J (69)	<24.43	<40.71	>814.33	543.54
Captan®	153.37	40.45	44.63	76.21

Las xantoquinodinas son heterodimeros formados por una xantona y una antraquinona unidas entre sí por un biciclonoano. Generalmente son compuestos de color amarillo y hasta ahora han sido aislados de hongos: uno del suelo, *Humicola* sp. y el endófito 101 del presente trabajo. Otro grupo de compuestos muy relacionados con las xantoquinodinas son las beticolinas, llamadas así porque fueron aisladas del hongo fitopatógeno *Cercospora beticola*. La diferencia entre las beticolinas y las xantoquinodinas es que las primeras se encuentran cloradas mientras que las de las xantoquinodinas no (Figura 6.6).

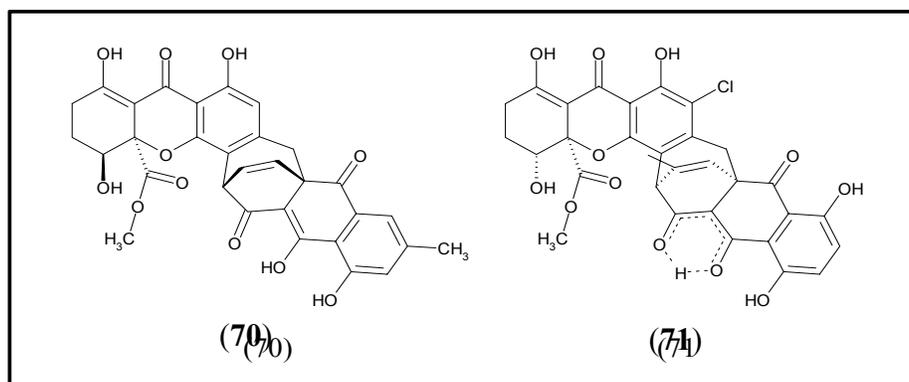


Figura 6.6. Estructuras de una xantoquinodina aislada de *Humicola* sp.(xantoquinodina B1;**70**) y una beticolina aislada de *Cercospora beticola*(beticolina 13; **71**).

Las xantoquinodinas han mostrado tener actividad biológica: son antibióticos anticoccidiales (enfermedad aviar causada por protozoarios) e inhiben el crecimiento de

algunas bacterias (Tabata, 1993; Tabata, 1996; Matuzaki, 1993;); a esto podemos sumar los efectos que se encontraron en este trabajo, la actividad antifúngica, la cual afectó a dos hongos verdaderos y a dos fungoides, particularmente a estos últimos. Las beticolinas demostrado actividad antibiótica, fitotóxica y se ha encontrado que aquellas menos polares inhiben la proliferación de células tumorogénicas (Robertson, 1993; Prangé, 1995; Ducrot, 1996; Goudet, 1998; Goudet, 2000; Ding, 2001).

Otro aspecto observado en las beticolinas es su capacidad para formar complejos con el magnesio formando dímeros conocidos como cebetinas (Prangé, 1997; Ducrot, 2001). Es muy probable que las xantoquinodinas presenten este comportamiento.

6.11. Metabolitos secundarios de *Bursera simaruba*

Bursera simaruba es un árbol conocido como palo mulato o chacáh; de sus hojas fue aislado el hongo endófito 101. *B. simaruba* 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. En el estado de Quintana Roo es un elemento primario o secundario de las selvas medianas subperennifolias.

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*. De esta planta, principalmente de la resina, se han aislado el lupeol (72), epilupeol (73) (ambos con actividad inhibitoria de células HT1080 de fibrosarcoma humano, el primero además tiene otras actividades antitumorales y el segundo tiene actividad contra *M. tuberculosis* [Nakanishi, 2005, Martelanc, 2007, Akihisa 2005]), epiglutinol, α -amirina (74) y la β -amirina (75) (las amirinas muestran actividad gastroprotectiva, antiprurítica y la α -amirina, además, antiinflamatoria [Martelanc, 2007]), el lup-20(29)-en-3 β ,23-diol (76), la metil- β -peltatina A (77) y B (78) (las dos con actividades antiinflamatorias [Noguera, 2004,]) y la picropoligamaina (79) (con actividad inhibitoria del fibrosarcoma humano [Nakanishi, 2005]), (ver Figura 6.8). Es importante hacer notar que los metabolitos secundarios aislados de éste árbol no tienen, hasta el momento, relación química con los metabolitos producidos por el hongo, en particular con la xantoquinodina J (69).

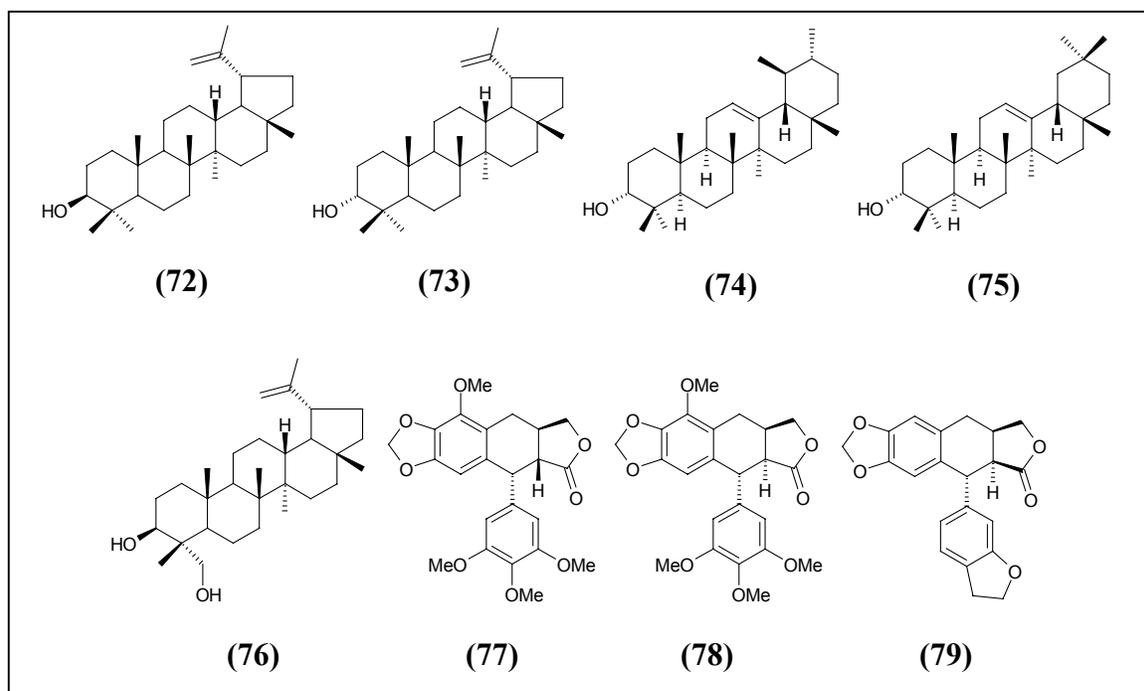


Figura 6.7. Metabolitos secundarios de *Bursera simaruba*

7. CONCLUSIONES

Los 14 hongos seleccionados utilizados en el presente trabajo, se eligieron en los estudios previos que sirvieron de base para éste, observando las interacciones antagónicas que las cepas mostraban frente a los otros endófitos aislados, tanto de la misma hospedera como de otras plantas. Este criterio resultó ser muy adecuado puesto que la mayoría de los 14 endófitos presentaron actividad biológica, destacando particularmente la fitotóxica.

Las condiciones óptimas para llevar a cabo las fermentaciones de cada uno de los 14 endófitos, fueron, en general, caldo de papa-dextrosa (preparado con papas frescas) como medio de cultivo, incubación a 28°C y agitación (aireación), con excepción del endófito 101 que requirió condiciones estáticas para crecer óptimamente.

Los hongos que presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento, tanto de plantas como de microorganismos de prueba, fueron los aislamientos 10, AHC, 101 y PC. De éstos, se seleccionó el aislamiento 101 para realizar el fraccionamiento biodirigido, debido a su gran rendimiento (extracto del micelio 920 mg/L) y, como se mencionó, a la facilidad de cultivarlo en condiciones estáticas, lo cual representó una ventaja técnica favorable.

Del fraccionamiento biodirigido realizado con el endófito 101, se obtuvieron 14 fracciones, la fracción XI (diclorometano (CH₂Cl₂)-metanol (MeOH), 97:30 a 90:10) resultó la más activa frente a las plantas de prueba, mientras que la fracción XII (CH₂Cl₂-MeOH, 7:3) resultó la más activa frente a los microorganismos fitopatógenos.

De la fracción XII (4.9 g), se aisló y purificó, a través de sucesivas recrystalizaciones, un compuesto que no había sido aislado ni reportado anteriormente: la xantoquinodina J (**69**) (1.138 g), el cual fue el principal responsable de la actividad fungitóxica mostrada por el hongo endófito 101. El rendimiento de xantoquinodina J (**69**) en la fermentación a mediana escala fue muy abundante (35.56 mg/L). Este compuesto es un heterodímero de xantona y oxantrona que forma cristales amarillos. La xantoquinodina J (**69**) (fig. 7.1) fue caracterizada utilizando espectroscopía en UV-vis, IR, RMN (en una y dos dimensiones) y finalmente por rayos X de monocristal.

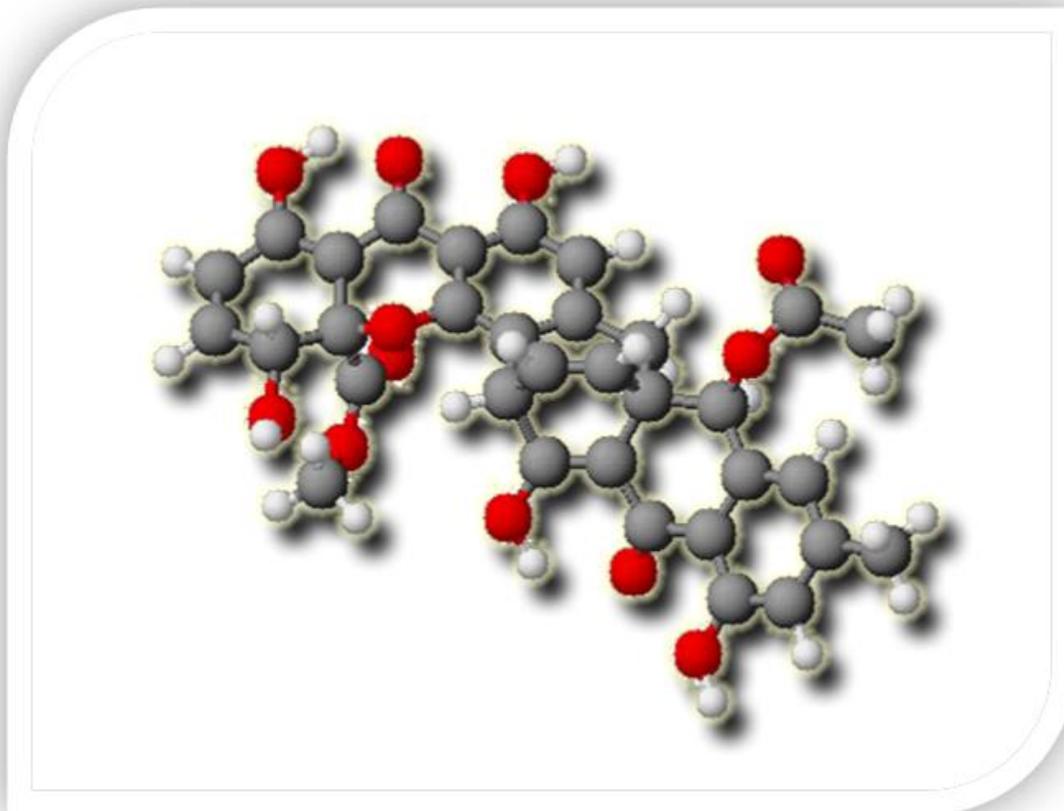


Figura 7.1 Xantoquinodina J (**69**) (C: gris, H: blanco, O: rojo)

El descubrimiento de las relaciones planta-hongo endófito puso en evidencia una más de las complejas interacciones que las plantas establecen con los microorganismos. Los hongos endófitos parecen existir en todas las plantas y, sin duda, las futuras investigaciones sobre su papel ecológico y metabólico dentro de los tejidos vegetales, revelarán novedosos mecanismos de relación biótica, contribuirán al descubrimiento de nuevos géneros y especies de hongos, además traerán a la luz nuevos compuestos secundarios que representan una fuente muy promisoría de aleloquímicos y biomoléculas con uso potencial como agroquímicos y fármacos, tal como se ha demostrado en el presente trabajo.

8. PERSPECTIVAS

- a. Evaluar el potencial antimicrobiano de la xantoquinodina J
- b. Establecer el potencial larvicida de la xantoquinodina J utilizando el crustáceo *Artemia salina* como organismos de prueba.
- c. Realizar un estudio químico biodirigido de las fracciones activas XI (fracción con mayor potencial fitotóxico) y XII (fracción con mayor potencial antifúngico) utilizando el método en caja de Petri y el de dilución en agar para monitorear la actividad fitotóxica y fungitóxica de las fracciones, respectivamente.
- d. Determinar cuantitativamente el efecto fitotóxico y fungitóxico de los metabolitos aislados de las fracciones activas.
- e. Establecer la estructura molecular de los compuestos bioactivos mediante la aplicación de métodos espectroscópicos, espectrométricos, quiroópticos y de difracción de rayos X.
- f. Determinar el efecto citotóxico de los extractos y de los aleloquímicos aislados sobre diversas líneas celulares con la finalidad de establecer posibles efectos tóxicos sobre el hombre y los animales.

9. EPÍLOGO

La ecología química es de gran importancia en un sinnúmero de aspectos, nos ayuda a conocer las relaciones bióticas, y entre otras muchas cosas, a aprovecharlas. El aprovechamiento puede enfocarse al área médica, agrícola, alimentaria, etc. No obstante lo anterior, en los planes de estudio de la carrera de química en la facultad de química de la UNAM, me parece, se ha subestimado la relevancia de esta materia tanto en la investigación, básica y aplicada, como en la industria. Considero que debería haber alguna asignatura, aunque fuese del paquete de optativas, donde los alumnos, de licenciatura tengan la oportunidad de acercarse a esta rama de la química.



10.REFERENCIAS

- 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
- Alexopoulos, C.J., C.W. Mims, and M. Blackwell. 1997. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY, USA.
- Anaya, A.L., Mata, R., Sims, J., González-Coloma, A., Cruz-Ortega, R., Guadaño, A., Hernández-Bautista, B.E., Ríos, G., Gómez-Pompa, A. (2003). Allelochemical potential of *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae). *J. Chem Ecol.* 29: 2725-2740.
- Anaya, A L, (2003) *Ecología química*, Plaza y Valdes, Mexico
- Anaya, A.L. y María C. González. (2005) Algunos aspectos de la ecología química de hongos asociados a plantas de Quintana Roo. Informe Final del Proyecto PAPIIT IN217603.
- Anaya, A.L., M. Macías-Rubalcava, R. Cruz-Ortega, C. García-Santana, P.N. Sánchez-Monterrubio, Hernández-Bautista, B.E. y R. Mata. (2005). Allelochemicals from *Stauranthus perforatus*, a Rutaceous Tree of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Phytochemistry* 66: 487-494.
- Anaya A.L. y Espinosa-García Francisco Javier. (2006). *Ecología Química: la química de la naturaleza que entreteje a los seres vivos*. *Revista Ciencias* 83: 4-13
- Anaya, A.L., Mata, R., Sims, J., González-Coloma, A., Cruz-Ortega, R., Guadaño, A., Hernández-Bautista, B.E., Ríos, G., Gómez-Pompa, A. (2003). Allelochemical potential of *Callicarpa acuminata* (Verbenaceae). *J. Chem Ecol.* 29: 2725-2740.
- Audesirk, T., Audesirk, G. (1997) *Biología, la vida en la Tierra*. Pearson Educación, Mexico.
- Baldauf, S.L., and J.D. Palmer. 1993. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 90: 11558-62.
- Barr DJS., 1992 Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist. *Mycologia* 84: 1-11

- Bashyal, B. P., Wijeratne, E. M. K., Faeth, S. H., Gunatilaka, A. A. L. (2005) Globosumones A-C, Cytotoxic Orsellinic Acid Esters from the Sonoran Desert Endophytic Fungus *Chaetomium globosum*. J. Nat. Prod. 68 724-728
- Betina, Y. (1992) Biological effects of the antibiotic brefeldin A (decumbin, cyanein, ascotoxin, synergisidin): a retrospective. Folia Microbiol. 37: 3-11
- Brady, S. F., Singh, M. P., Janso, J. E. y Clardy, J. (2000) Guanacastepene, a Fungal-Derived Diterpene Antibiotic with a New Carbon Skeleton J. Am. Chem. Soc. 122: 2116-2117
- Brady, S. F., Wagenaar, M. M., Singh, M. P., Janso, J. E. y Clardy, J. (2000) The Cytosporones, New Octaketide Antibiotics Isolated from an Endophytic Fungus J. Org. Lett. 2 4043-4046
- Brady, S. F., Bondi, S. M. y Clardy, J. (2001) The Guanacastepenes: A Highly Diverse Family of Secondary Metabolites Produced by an Endophytic Fungus J. Am. Chem. Soc. 123: 9900-9901
- BROM, J. (1993) Esbozo de historia universal, Grijalbo, Mexico
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R, et al. (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist. E.U.
- Cole, R. J., Kirksey, J. W., Dorner, J. W., Wilson, D. N., Johnson, J. C., Johnson, J. A. N., Bedell, D. M., Springer, J. P., Chexal, K. K., Clardy, J. C. y Cox, R. H. (1977) Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. J. Agric. Food Chem. 25: 826-830
- Cutler, H. G., Crumley, F. G.; Cox, R. H.; Hernandez, O., Cole, R. J. y Domer, J. W. (1979) Orlandin: a nontoxic fungal metabolite with plant growth inhibiting properties. J. Agric. Food Chem. 27: 592-595
- Dai, J. R., Carte, B., Sidebottom, P., Sek, A. L.; Ng, S., Huang, Y. y Butler, M. (2001) Circumdatin G, a New Alkaloid from the Fungus *Aspergillus ochraceus*. J. Nat. Prod. 64: 125-126
- Ding G., Maume G., Osman H., Padiou M., Milat M., Humbert C., Blein J. y Maume B. (2001) Effects of 12 beticolins, *Cercospora beticola* toxins, on proliferation of ras-transformed adrenocortical cell. Acta. Pharmacol. Sin. 22: 769-776

- Ducrot P., Lallemand J., Milat M., Blein J., Neuman A. y Neuman A. (1996) *Cercospora Beticola* Toxins. Part XII: Isolation and Structure of Beticolin 0. *Tetrahedron Letters*, 37: 3121-3124
- Ducrot, P. (2001) *Cercospora beticola* toxins. NMR studies and chemical behaviour. *C. R. Acad. Sci. Paris, Chimie / Chemistry* 4: 273-283
- Faeth, S. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists? *OIKOS* 98: 25-36
- Findlay, J. A., Li, G., Miller, J. D. y Womiloju, T. O. (2003) Insect toxins from spruce endophytes *Can. J. Chem.* 81: 284-292
- Fraenkel, G. S. (1959). The raison d'être of secondary plant substances. *Science* 129: 1466-1470.
- Freeman, E. M. (1904). The seed fungus of *Lolium temulentum*. L, the darnel. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. [Biol.]* 196:1-27
- Fresenius, W., Huber, J. F. K., Pungor E., Rechnitz G. A., Simon W. y West Th. S. (1989) In *Tables of spectral data for structure determination of organic compounds*, 2nd English ed. 1135-140, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Ghisalberti, E. (1993). *Detection and isolation of Bioactive Natural Products*. Colegate, S. Y Molyneux, R. (Eds), *Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination*, CRC Press, E.U.
- Goudet C, Véry A., Milat M, Ildefonse M., Thibaud J, Sentenac H. y Blein J. (1998) Magnesium ions promote assembly of channel-like structures from beticolin 0, a non-peptide fungal toxin purified from *Cercospora beticola*. *The plant journal*, 14: 359-364
- Goudet C, Milat M, Sentenac H y Thibaud J. (2000) Beticolins, Nonpeptidic, Polycyclic Molecules Produced by the Phytopathogenic Fungus *Cercospora beticola*, as a New Family of Ion Channel-Forming Toxins. *MPMI* 13: 203-209.
- Gunatilaka, L. (2006). Natural Products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity and implications of their occurrence. *J. Nat. Prod* 69: 509-526
- Gutierrez, M., Theoduloz, C., Rodriguez, J., Lolas, M. y Schmeda-Hirschmann, G. (2005) Bioactive metabolites from the fungus *Nectria galligena*, the main apple canker agent in Chile *J. Agric. Food Chem.* 53: 7701-7708

- Guzman, G. (1998) Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation* 7: 369-384
- Harper, J. K., Arif, A. M., Ford, E. J., Strobel, G. A., Porco, J. A., Tomer, D. P., O'Neill, K. L. y Grant, D. M. (2003) Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. *Tetrahedron* 59: 2471-2476
- Hawksworth, D. (2001) The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimated revisited. *Mycol. Res.* 105: 1422-1432
- He, H., Yang, H. Y., Bigelis, R., Solum, E. H., Greenstein, M. y Carter, G. T. (2002) Pyrrocidines A and B, new antibiotics produced by a filamentous fungus. *Tetrahedron Lett.* 43: 1633-1636
- He, J., Lion, U., Sattler, I., Gollmick, F. A., Grabley, S., Cai, J., Meiners, M., Schunke, H., Shaumann, K., Dechert, U. y Krohn, M. (2005) Diastereomeric Quinolinone Alkaloids from the Marine-Derived Fungus *Penicillium janczewskii*. *J. Nat. Prod.* 68: 1397-1399
- Hensens, O. D., Ondeyka, J. G., Dombrowski, A. W., Ostlind, D. A. y Zink, D. L. (1999) Isolation and structure of nodulisporic acid A1 and A2, novel insecticides from a *Nodulisporium sp.* *Tetrahedron Lett.* 40: 5455-5458
- Hiort, J., Maksimena, K., Reichart, M., Peroviae-Ottstadt, S., Lin, W. H., Wray, V., Steube, K., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P., Ebel, R., Müller, W. E. G. y Bringmann, G. (2004) New Natural Products from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *J. Nat. Prod.* 67: 1532-1543
- Hormazahal, E., Schmeda-Hirschmann, G., Astudillo, L., Rodriguez, J., Theoduloz, C. Z. y Naturforsch., C. (2005) Metabolites from *Microsphaeropsis olivacea*, an endophytic fungus of *Pilgerodendron uviferum*. *J. Biosci.*, 60C: 11-21
- International Allelopathy Society (IAS) Constitution y Bylaws. (1996) First World Congress on Allelopathy: A Science for the Future Cádiz, Spain. September.
- Isaac, S. (1992). Fungal-plant interactions. Chapman & hall, Reino Unido.
- Kim, S.; Shin, D.-S., Lee, T. y Oh, K.-B. (2004) Periconicins, Two New Fusicoccane Diterpenes Produced by an Endophytic Fungus *Periconia sp.* with Antibacterial Activity *J. Nat. Prod.* 67: 448-450

- Krohn, K., Bahmasari, R., Florke, V., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H., Draeger, S., Schulz, B. y Antus, S. (1997) Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry*. 45: 313-320
- Krohn, K., Florke, U., John, M.; Root, N., Steingrover, K., Aust, H.-J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S., Simonyi, M. y Zsila, F. (2001) Biologically active metabolites from fungi. Part 16: New preussomerins J, K and L from an endophytic fungus: structure elucidation, crystal structure analysis and determination of absolute configuration by CD calculations. *Tetrahedron* 57: 4343-4348
- Kusano, M.; Koshino, H.; Uzawa, J., Fujioka, S., Kawano, T. y Kimura, Y. (2000) Nematicidal alkaloids and related compounds produced by the fungus *Penicillium cf. simplicissimum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64: 2559-2568
- Li, J. Y., Harper, J. K., Grant, D. M., Tombe, B. O., Bashyal, B., Hess, W. M. y Strobel, G. A. (2001) Ambuic acid, a highly functionalized cyclohexenone with antifungal activity from *Pestalotiopsis spp* and *Monochaetia sp*. *Phytochemistry*. 56: 463-468
- Li, J.Y., and Strobel, G.A. (2001). Jesterone and hydroxy-jesterone antioomycete cyclohexenone epoxides from the endophytic fungus *Pestalotiopsis jesteri*. *Phytochemistry* 57: 261-265.
- Li, J.Y., Song, Y. C., Liu, J. Y., Ma, Y. M. y Tan, R. X. (2005) A novel *Candida glycerinogenes* mutant with high glycerol productivity in high phosphate concentration medium. *World J. Microbiol. Biotech.*, 21: 553-558
- Liu, J. Y., Song, Y. C., Zhang, Z., Wang, L., Guo, Z. J., Zou, W. X. y Tan, R. X. (2004) *Aspergillus fumigatus* CY018, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon* as a versatile producer of new and bioactive metabolites. *J. Biotechnol.* 114: 279-287
- Ma, Y. M., Li, Y., Liu, J. Y., Song, Y. C. y Tan y R. X. (2004) Anti-*Helicobacter pylori* metabolites from *Rhizoctonia sp*. Cy064, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Fitoterapia*. 75 451-456
- Mann, J. (1987). Secondary metabolism. Clarendon Press. Oxford
- Martelanc, M., Vovk, I., Simonovska, B. (2007), Determination of three major triterpenoids in epicuticular wax of cabbage (*Brassica oleracea* L.) by high-performance liquid

- chromatography with UV and mass spectrometric detection, *Journal of Chromatography A* (artículo en prensa)
- Matsueda, S. y Katsukara, Y. (1985) Antitumor-active photochemical oxidation products of pro-vitamin D. *Chem. Ind.* 12: 411.
- Matuzaki, K., Tabata N., Tomoda H., Iwai Y., Tanaka H. y Omura S. (1993) The structure of xanthoquinodin A1, a novel anticoccidial antibiotic having a new xanthone-anthraquinone conjugate system. *Tetrahedron Lett.* 34: 8251-8254
- 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
- Ondeyka, J. G., Helms, G. L., Hensens, O. D., Goetz, M. A.; Zink, D. L., Tsipouras, A., Shoop, W. L., Slayton, L., Dombrowski, A.W., Polishook, J. D., Ostlind, D. A., Tsou, N. N., Ball, R. G. y Singh, S. B. (1997) Nodulisporic Acid A, a Novel and Potent Insecticide from a *Nodulisporium Sp.* Isolation, Structure Determination, and Chemical Transformations. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8809-8816
- Parisi, A., Piatelli, M., Tringale, C. y Magnano, G. (1993) Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. *Phytochemistry.* 32: 865-867
- Patterson, D.J., and M.L. Sogin. 1992. Eukaryote Origins and Protistan Diversity. Pp. 13-46. In: *The Origin and Evolution of Prokaryotic and Eukaryotic Cells.* Eds. H. Hartman and K. Matsuno. World Scientific, Singapore.
- Pelaez, F., Cabello, A., Platas, G., Diez, M. T., Gonzalez del Val, A., Basilio, A., Martan, I., Vicente, F., Bills, G. F., Giacobbe, R. ., Schwartz, R. E.; Onishi, J. C.; Meinz, M. S.; Abruzzo, G. K., Flattery, A. M., Kong, L. y Kurtz, M. B. (2000) The discovery of enfumafungin, a novel antifungal compound produced by an endophytic *Hormonema* species: biological activity and taxonomy of the producing organisms. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 333-343

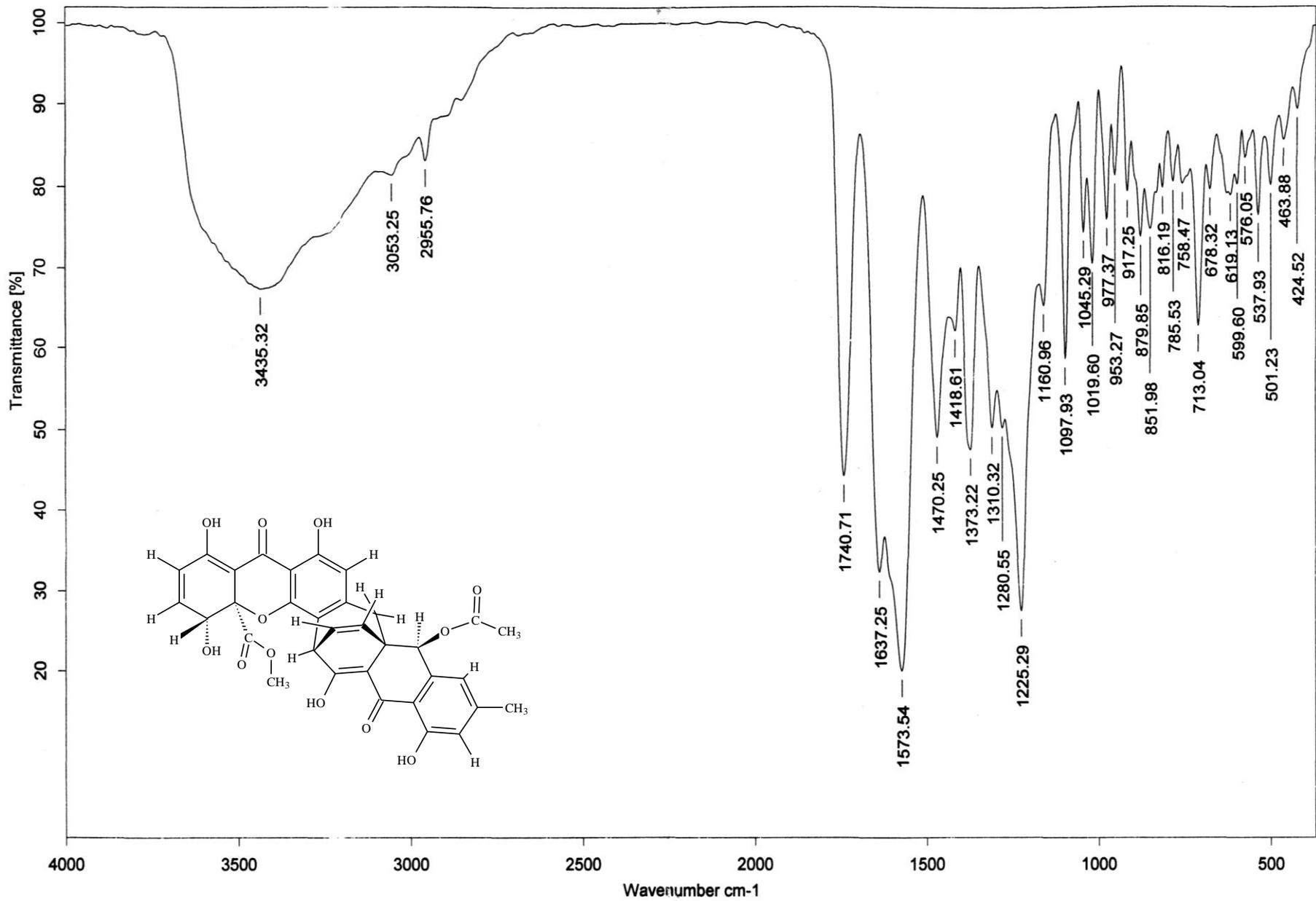
- Peraza-Sanchez, S., Peña-Rodriguez, L. (1992) Isolation of picropolygamain from the resin of *Bursera simaruba*. 12 1768-1 771
- Peraza-Sanchez, S., Salazar-Aguilar, N., Peña-Rodriguez, L. (1995) A new triterpene from the resin of *Bursera simaruba*. J. Nat. Prod. 58(2) 271-274
- Prangé T, Neuman A, Milat M y Blein J. (1995). The Yellow Toxins Produced by *Cercospora Beticola*. V. Structure of Beticolins 2 and 4. Acta Cryst. B51: 308-314
- Prangé T, Neuman A, Milat M y Blein J. (1997) *Cercospora beticola* toxins. Part 16. X-Ray diffraction analyses on microcrystals of three p-beticolins. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 1819-1825
- Rawlings, B. (1997) Biosynthesis of polyketides, Nat. Prod. Rep., 14: 523-556
- Robeson, D. y Jalal, M. (1993) A *Cercospora* Isolate From Soybean Roots Produces Cebetin B And Cercosporin. Phytochemistry. 33: 1546-1548
- Ruiz-Herrera, J. 1992. Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Schmeda-Hirschmann, G., Hormazabal, E., Astudillo, L., Rodriguez, J. y Theoduloz, C. (2005) Secondary metabolites from endophytic fungi isolated from the Chilean gymnosperm *Prumnopitys andina* (Lleuque). World J. Microbiol. Biotech. 21: 27-32
- Schulz, B., Boyle, Ch., Draeger, S., Römmert, AK. y Krohn, K (2002) Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. Mycol. Res 106. 996-1004
- Schulz, B. y Boyle, Ch. (2005) The endophytic continuum. Mycol. Res. 109: 661-686
- Seigler, D.S. (1977). Primary roles for secondary products. Biochem. Syst. Ecol. 5: 195-199
- Shin, D.-S., Oh, M.-N., Yang, H.-C. y Oh, K.-B. (2005) Biological characterization of periconicins, bioactive secondary metabolites, produced by *Periconia sp.* OBW-15. J. Microbiol. Biotech. 15: 216-220.
- Shu, R. G., Wang, F. W., Yang, Y. M., Liu, Y. X. y Tan, R. X. (2004) Antibacterial and xanthine oxidase inhibitory cerebrosides from *Fusarium sp.* IFB-121, an endophytic fungus in *Quercus variabilis*. Lipids. 39: 667-673

- Singh, M. P., Janso, J. E., Luckman, S. W., Brady, S. F., Clardy, J., Greenstein, M. y Maiese, W. M. Biological activity of guanacastepene, a novel diterpenoid antibiotic produced by an unidentified fungus CR115 (2000) *J. Antibiot.* 53: 256-261.
- Singh, S. B.; Zink, D. L., Liesch, J. M., Ball, R. G., Goetz, M. A., Bolessa, E. A., Giacobbe, R. A.; Silverman, K. C., Bills, G. F., Palaez, F., Cascales, C., Gibbs, J. B. y Lingman, R. B. (1994) Preussomerins and Deoxypreussomerins: Novel Inhibitors of Ras Farnesyl-Protein Transferase. *J. Org. Chem.* 59: 6296-6302
- 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: 506-509
- Song, Y. C., Li, H., Ye, Y. H.; Shan, C. Y., Yang, Y. M. y Tan, R.X. (2004) Endophytic naphthopyrone metabolites are co-inhibitors of xanthine oxidase, SW1116 cell and some microbial growths. *FEMS Microbiol. Lett.* 241: 67-72
- Stahl, E. (1969). *Thin Layer Chromatography*. Academic Press Inc., Nueva York.
- Stierle, D. B., Stierle, A. A. y Kunz, A. (1998) Dihydroramulosin from *Botrytis* sp. *J. Nat. Prod.* 61: 1277-1278
- Stierle, A. A., Stierle, D. B. y Bugni, T. (2001) Sequoiatones C-F, Constituents of the Redwood Endophyte *Aspergillus parasiticus*. *J. Nat. Prod.* 64: 1350-1353
- Stierle, D. B., Stierle, A. A. y Bugni, T. (2003) Sequoiamonascins A-D: Novel Anticancer Metabolites Isolated from a Redwood Endophyte. *J. Org. Chem.* 68: 4966-1969
- Strobel, G. y Dasy, B. (2003) Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 491-502
- Strobel, G., Dasy, B., Castillo, U. y Harper, J. (2004) Natural products from endophytic microorganisms. *J. Nat. Prod.* 67: 257-268
- Sullia, S.B y Shantharms. (1998) *General Microbiology*. Science Publishers inc. E.U.
- 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. *J. Antibiotics* 46: 749-755

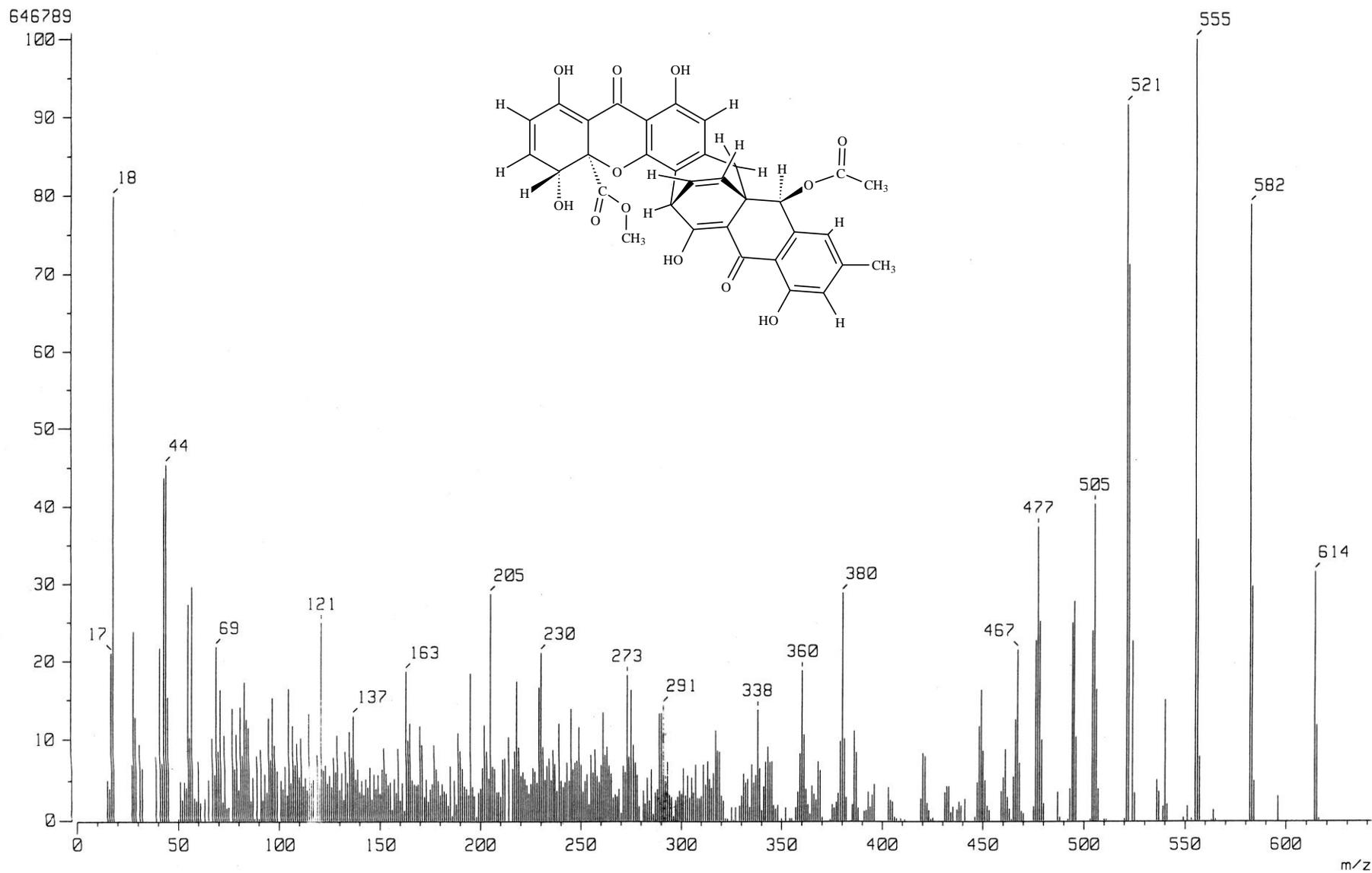
- Tabata, N.; Tomoda H., Matuzaki K. Y Omura S. (1993) Structure and biosynthesis of xanthoquinodins, anticoccidial antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 115: 8558-8564
- Tabata, N., Tomoda, H., Iwai, Y. y Omura, S.(1996) Xanthoquinodin B3, a New Anticoccidial Agent Produced by *Humicola sp.*, FO-888, *J. Antibiot.* 49: 267-271
- Taechowisan, T., Lu, C., Shen, Y. y Lumyong, S.(2005) Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Microbiology.* 151: 1691-1695
- Tan, R. X. y Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat. Prod. Rep.* 18: 448-459
- Tscherter, H., Hofmann, H., Ewald, R. y Dreyfuss, M. M. (1988) Antibiotic lactone compound. U.S. Patent No. 4,753,959
- Turbyville, T. J., Wijeratne, E. M. K., Liu, M. X., Burns, A. M., Seliga, C. J., Leuvano, L. A., David, C. L., Faeth, S. H., Whitesell, L. y Gunatilaka, A. A. L. (2006) Search for Hsp90 Inhibitors with Potential Anticancer Activity: Isolation and SAR Studies of Radicicol and Monocillin I from Two Plant-Associated Fungi of the Sonoran Desert. *J. Nat. Prod.* 69: 178-184
- Vurro, M., Evidente, A., Andolfi, A., Zonuo, M. C., Giordano, F. y Motta, A. (1998) Brefeldin A and α,β -dehydrocurvularin, two phytotoxins from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of *Xanthium occidentale*. *Plant Sci.* 138: 67-79
- Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalczyk, S., Martino, V. y Acevedo, C. (2004) Phomol, a New Antiinflammatory Metabolite from an Endophyte of the Medicinal Plant *Erythrina crista-galli*. *J. Antibiot.* 57: 559-563
- 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: 610-618.
- Wiyakrutta, S., Sriubolmas, N., Panphut, W., Thongon, N., Danwisetkanjana, K., Ruangrunsi, N., Meevootisom V. (2004) Endophytic fungi with anti-microbial, anti-cancer and antimalarial activities isolated from thai medicinal plants. *World J. Microbiol. Biotech.* 20: 265-272
- Xu, Q., Wang, J., Huang, Y., Zheng, Z., Song, S., Zhang, Y. y Su, W. (2004) Metabolites from mangrove endophytic fungus *Dothiorella sp.* *Acta Oceanol. Sin.* 23: 541-547

- Ye, Y. H., Zhu, H. L., Song, Y. C., Liu, J. Y. y Tan, R. X. (2005) Structural Revision of Aspernigrin A, Reisolated from *Cladosporium herbarum* IFB-E002. *J. Nat.Prod.* 68: 1106-1108
- Zhu, J. W., Nagasawa, H., Nagura, F., Mohamad, S. B., Uto, Y., Okura, K. y Hori, H. (2000) Elucidation of strict structural requirements of Brefeldin A as an inducer of differentiation and apoptosis. *Biorg. Med. Chem.* 8: 455-463

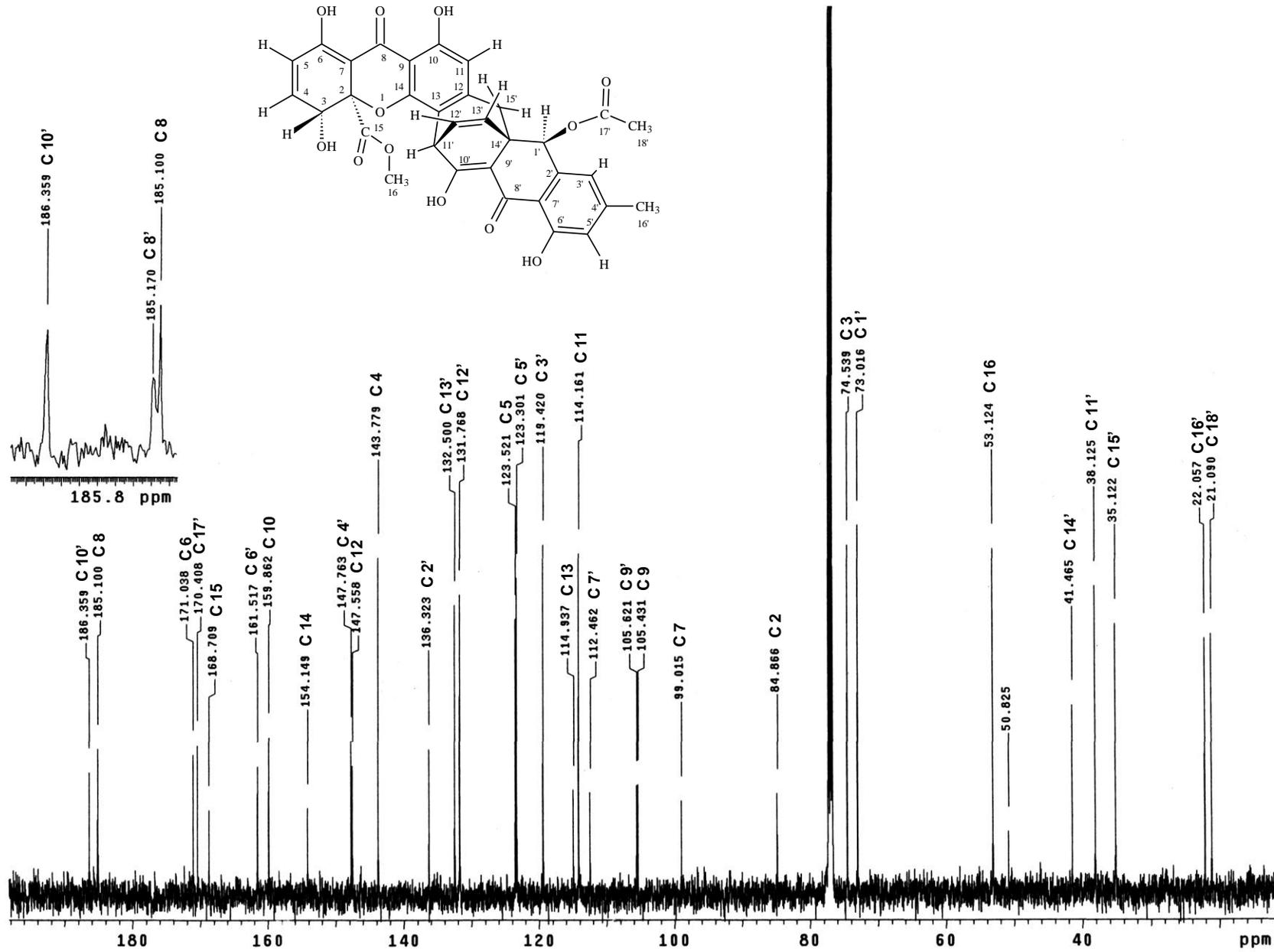
11. ANEXO (ESPECTROS)



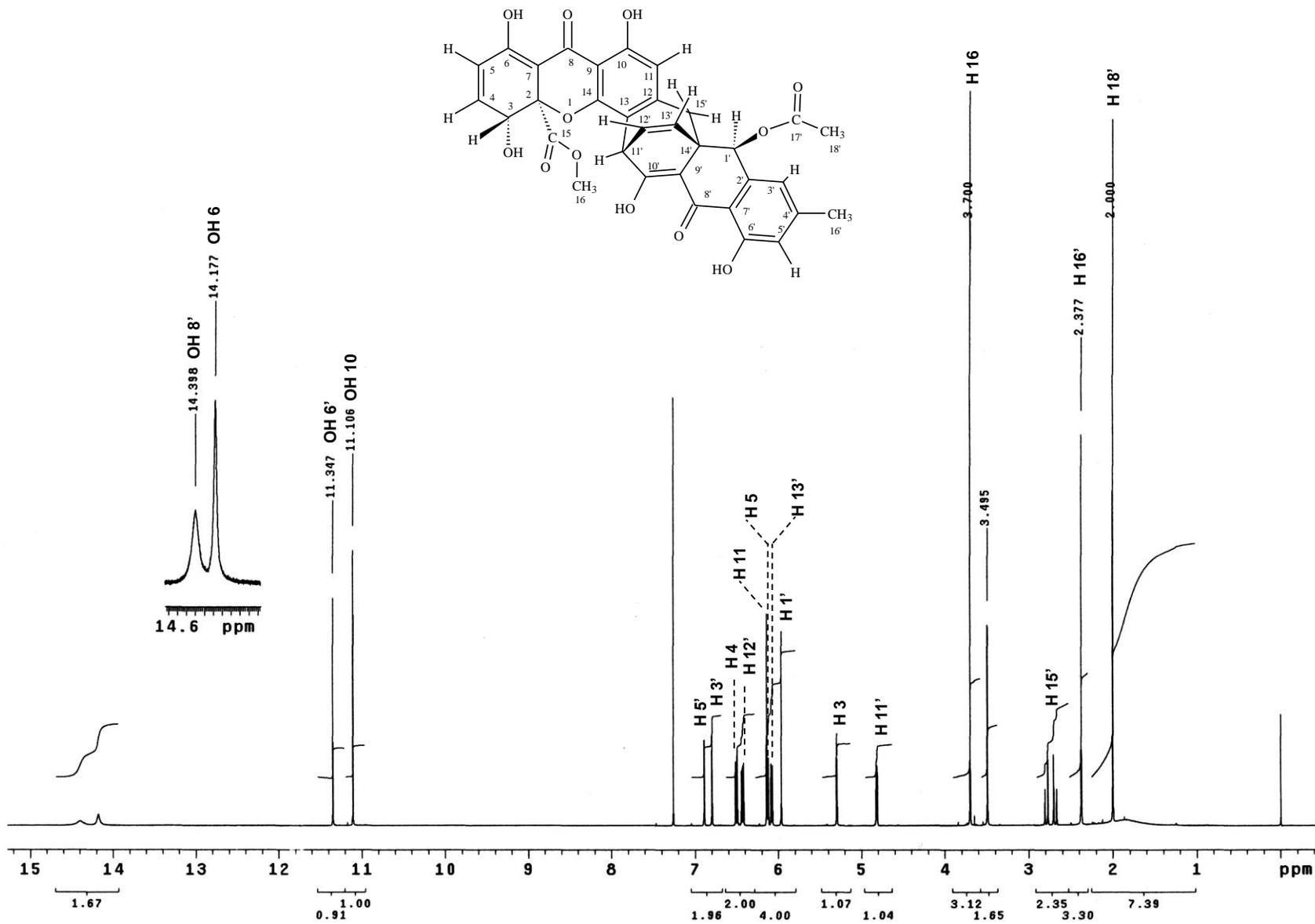
Espectro 1. Espectro de IR (pastilla de KBr) de la xantoquinodina J (69)



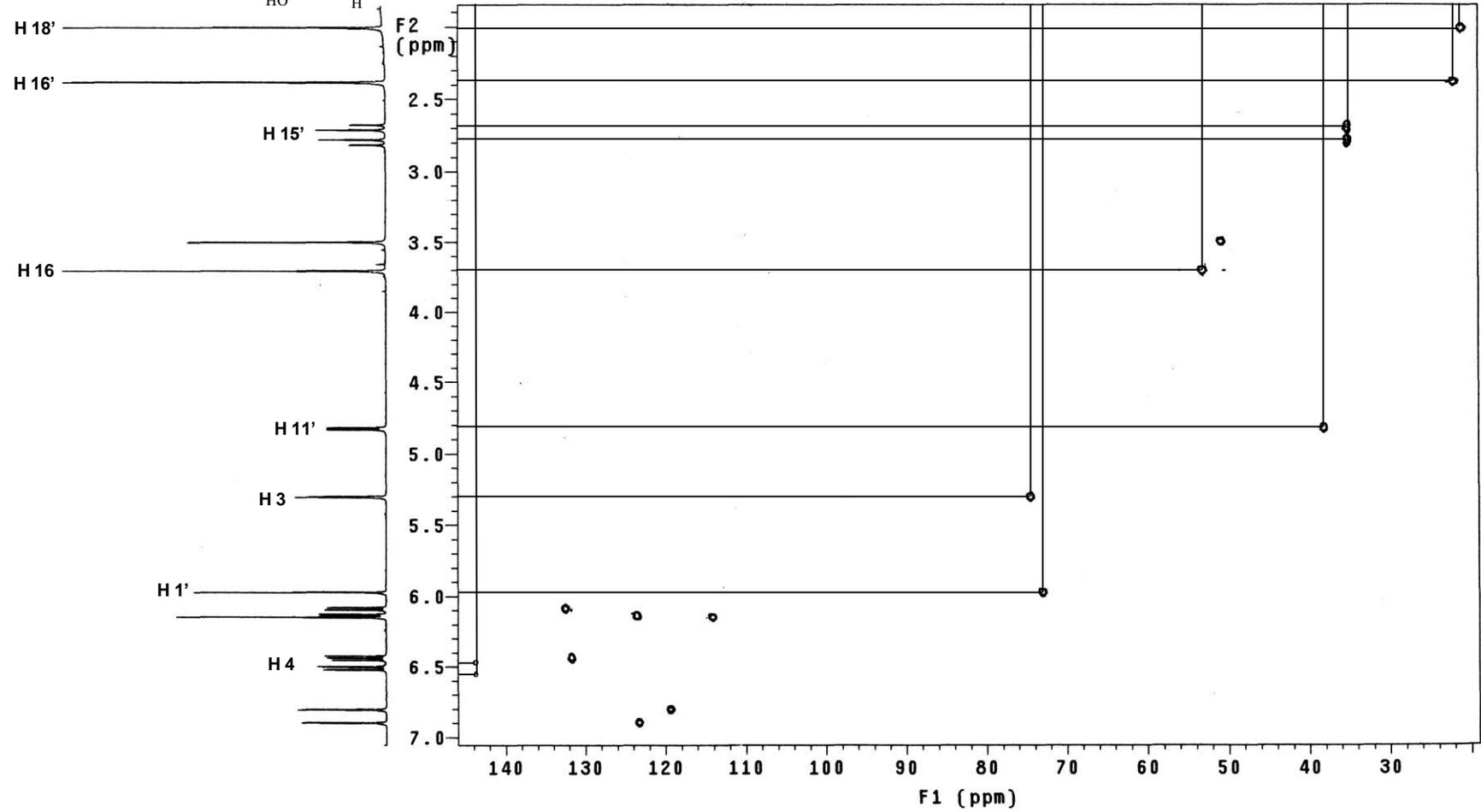
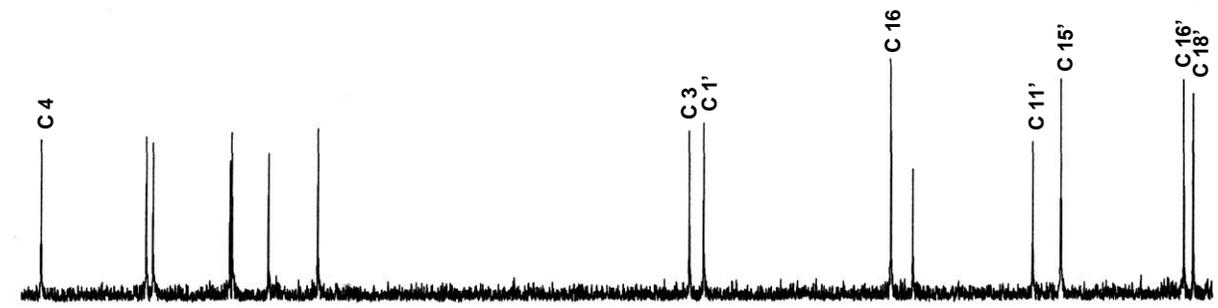
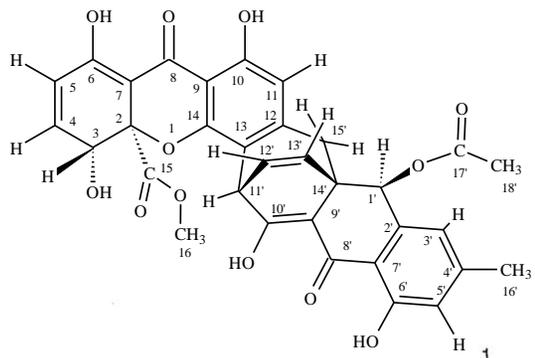
Espectro 2. Espectro de masas (IE) de la xantoquinodina J (69)



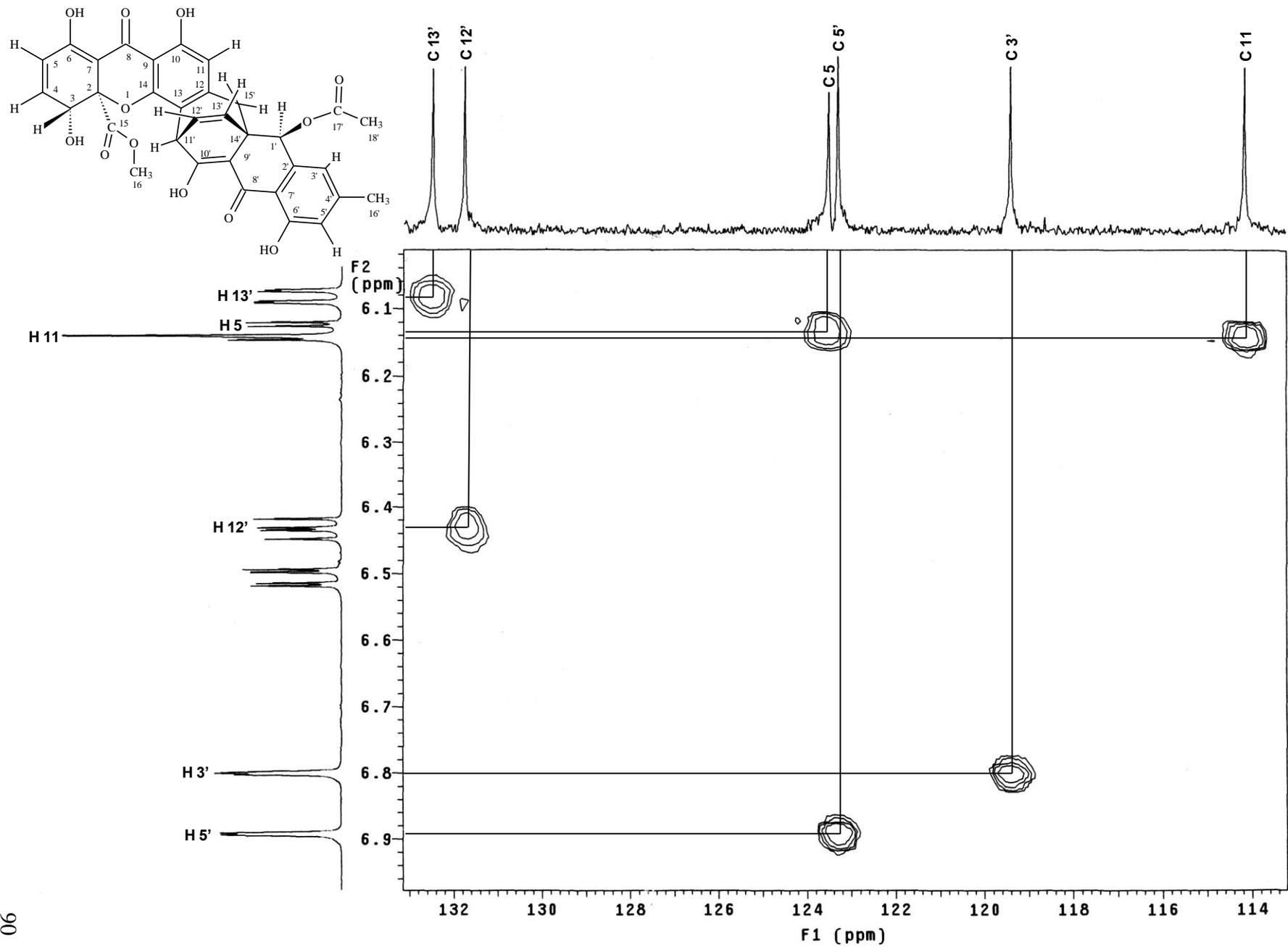
Espectro 3. RMN ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de la xantoquinodina J (69)



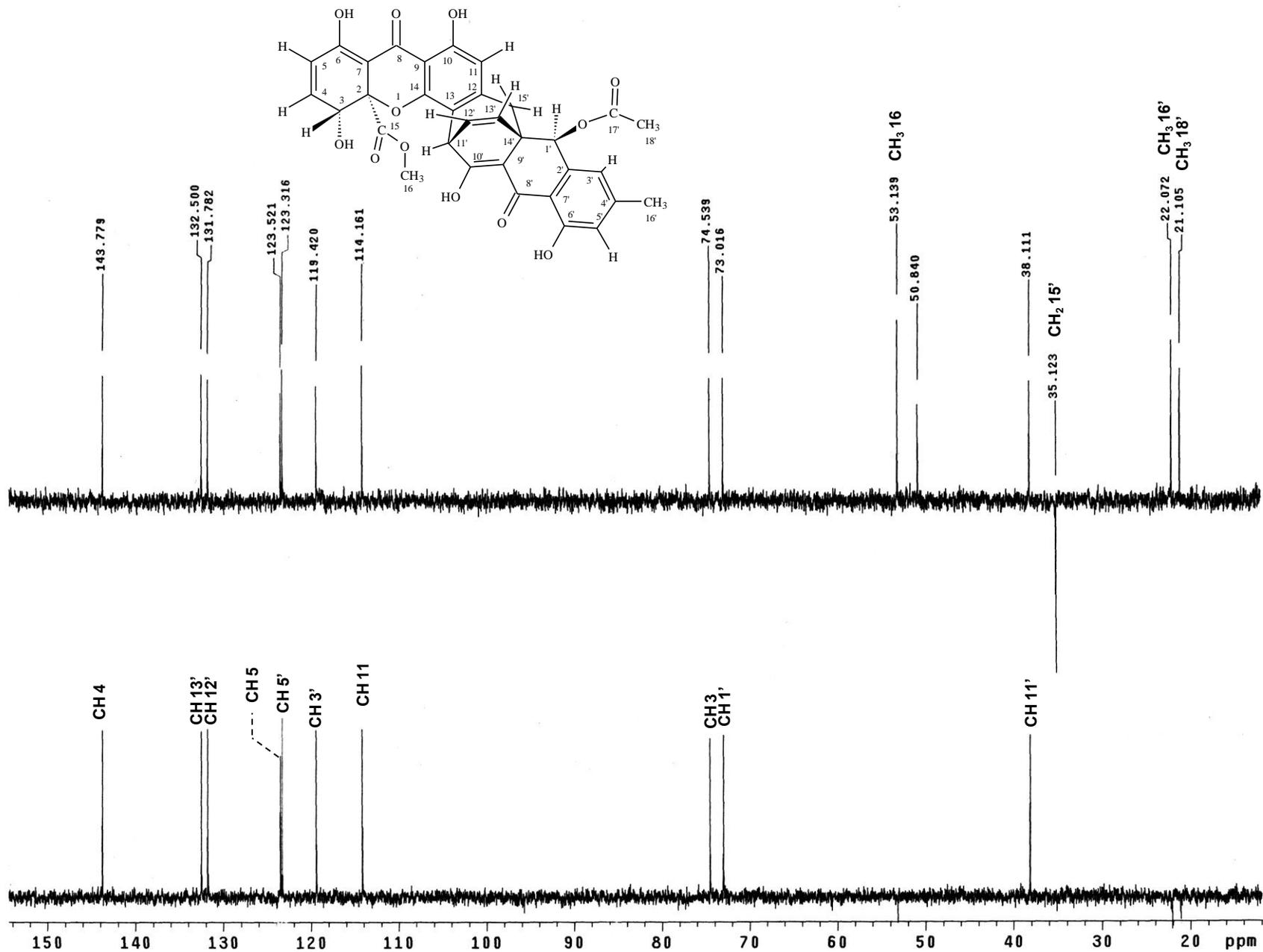
Espectro 4. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de la xantoquinodina J (69)



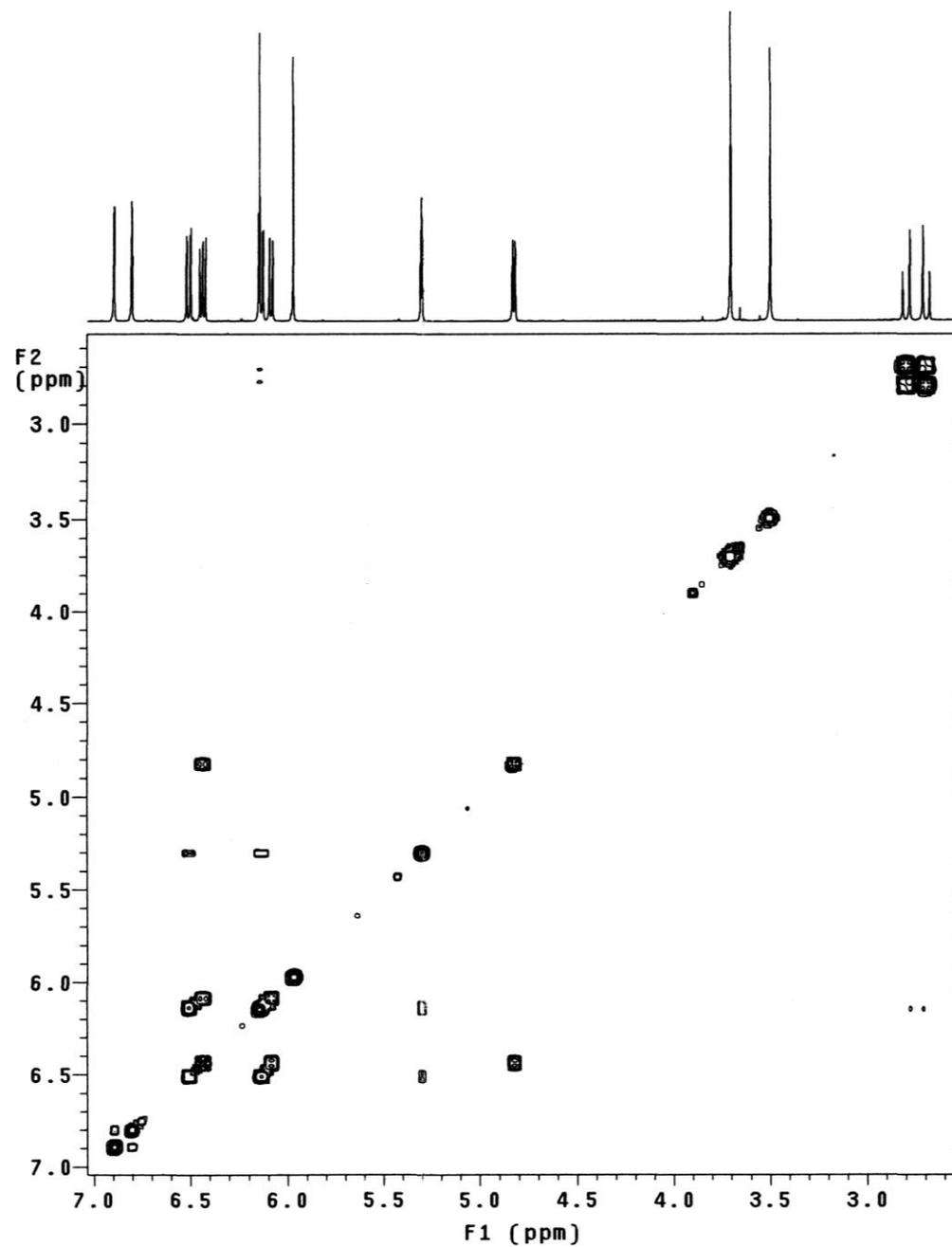
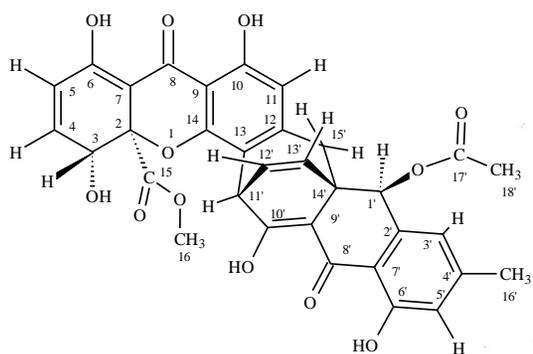
Espectro 5. Espectro HSQC (500 MHz, CDCl₃) de la xantoquinodina J (69)



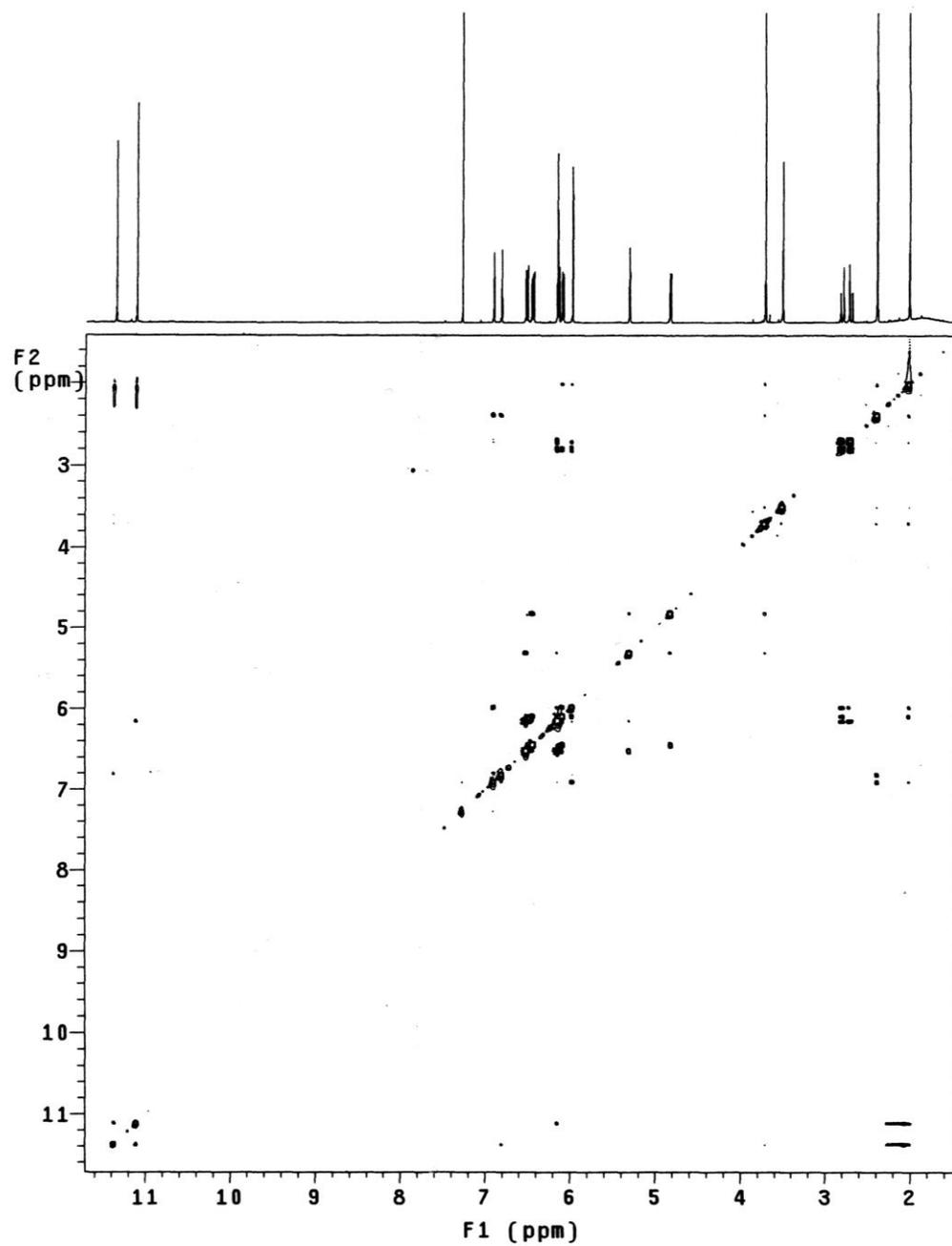
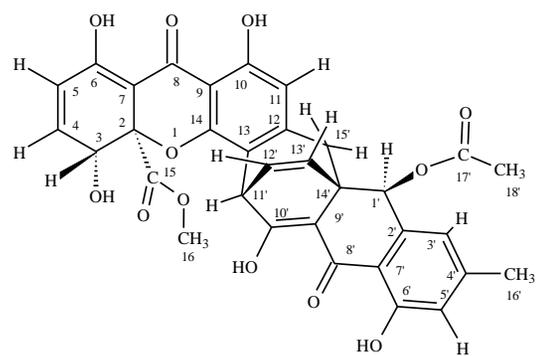
Espectro 6. Acercamiento del Espectro HSQC de la xantoquinodina J (69)



Espectro 7. Espectro DEPT (125 MHz, CDCl₃) de la xantoquinodina J (69)



Espectro 8. Espectro COSY (500 MHz, CDCl₃) de la xantoquinodina J (69)



Espectro 9. Espectro NOESY (500 MHz, CDCl₃) de la xantoquinodina J (69)

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AcOEt	Acetato de etilo
ANOVA	Análisis de varianza
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
cm	Centímetros
CO ₂	Dioxido de carbono
COSY	Correlation Spectroscopy (espectroscopía bidimensional de correlación homonuclear)
CPD	Caldo de papa-dextrosa
DE ₅₀	Dosis efectiva media
d	Doblete
dd	Doble de dobles
DEPT	Desacoplate enhancement proton test (experimento de desacoplamiento de protones)
DF	Distrito Federal
frc	Fracción
g	Gramos
HEX	Hexano
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation (espectroscopía bidimensional de correlación heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation (espectroscopía bidimensional de correlacion heteronuclear ¹ H- ¹³ C)
IE	Impacto electrónico
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KBr	Bromuro de potasio
L	Litros

M ⁺	Ión molecular
m/z	Unidades de masa carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
μg	Microgramos
MHz	Mega hercios
mic	Micelio
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MS	Metabolito(s) secundario(s)
Mult.	Multiplicidad
ND	No determinado
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser effect spectroscopy (espectro del efecto nuclear de Overhauser)
°C	Grados centígrados
p.f.	Punto de fusión
PDA	Papa-dextrosa-agar
pH	Potencial de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de protón
s	Singulete
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UV	Ultravioleta
V8	Jugo de ocho verduras
xant	Xantoquinodina
δ	Desplazamientos químicos
λ _{max}	Longitud de onda de máxima absorción
ν _{max}	Frecuencia máxima