



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS
BIODINÁMICOS A PARTIR DE ESPECIES FÚNGICAS DE MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ARNULFO BAUTISTA LÓPEZ



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
VOCAL:	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
SECRETARIO:	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
1^{er} SUPLENTE:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2^{do} SUPLENTE:	Dr. Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el tema:

**LABORATORIO 125, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA,
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SUSTENTANTE:

Arnulfo Bautista López

ÍNDICE

Lista de figuras	
Lista de cuadros	
Lista de tablas	
Lista de abreviaturas	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de los hongos microscópicos como una fuente potencial de metabolitos biodinámicos	1
1.2 Estudios de derreplicación de metabolitos secundarios fúngicos	7
1.3 Cáncer en México y el mundo	10
2. HIPÓTESIS	20
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
4. PARTE EXPERIMENTAL	23
4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio	23
4.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala	24
4.3 Preparación de los extractos orgánicos	24
4.4 Estudios de derreplicación	25
4.5 Ensayo de citotoxicidad	26
4.5.1 Cultivo y suspensión de las líneas celulares	27
4.5.2 Procedimiento	27
4.6 Fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala de P11-7	28
4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios presentes en la fracción primaria F_P11-7₆	28
4.8 Fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala de T1-41	31
4.9 Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios de T1-41	31
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos a partir de sus hábitats naturales	34

5.2 Estudio químico de las especies fúngicas P11-7 y T1-41	41
5.2.1 Estudio químico de la especie P11-7	42
5.2.1.1 Caracterización de la 5-metilmeleina (1)	42
5.2.1.2 Caracterización de la 5-formilmeleina (2) y 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3)	47
5.2.2 Estudio químico de la especie T1-41	53
5.2.2.1 Caracterización de la preusomerina G (4)	53
6. CONCLUSIONES	59
7. BIBLIOGRAFÍA	60
8. ANEXO 1	68
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos	68
8.2 Cartel presentado en la Semana de la Investigación de la Facultad de Química, UNAM	80

Lista de figuras

Figura		Página
1	Tasas de mortalidad estandarizadas para el cáncer en mujeres (A) y hombres (B) por cada 100,000 habitantes (OMS, 2012).	12
2	Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población menor de 20 años por tumores malignos según el sexo (adaptación de INEGI, 2012).	13
3	Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población mayor de 20 años por tumores malignos según el sexo (adaptación de INEGI, 2012).	13
4	Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico P11-7 ($\lambda=254$ nm).	30
5	Fraccionamiento secundario de la fracción F_P11-7₆ mediante cromatografía de líquidos a nivel preparativo en fase reversa ($\lambda=254$ nm).	30
6	Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico T1-41 ($\lambda=254$ nm).	32
7	Diagrama de flujo que resume la estrategia metodológica de los estudios de derreplicación de los extractos orgánicos (adaptado de El-Elimat <i>et al.</i> , 2013).	35
8	Especies fúngicas P11-7 [(A) cultivo axénico en medio PDA y (B) cultivo sólido en mediana escala] y T1-41 [(C) cultivo axénico en medio PDA y (D) cultivo sólido en mediana escala].	41
9	(A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 5-metilmeleina (1) .	44
10	Espectros de (A) ^1H y (B) ^{13}C RMN de la 5-metilmeleina (1) .	45
11	Espectro COSY de la 5-metilmeleina (1) .	46

12	(A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 5-formilmeleina (2) .	50
13	(A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3) .	51
14	Espectro de ^1H NMR de la (A) 5-formilmeleina (2) y (B) de la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3) .	52
15	(A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la preusomerina G (4) .	55
16	Espectros de (A) ^1H y (B) ^{13}C NMR de la preusomerina G (4) .	56

Lista de cuadros

Cuadro		Página
1	Principales metabolitos secundarios producidos por hongos microscópicos de importancia farmacéutica y agroquímica.	4
2	Fármacos aprobados para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.	15
3	Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico P11-7.	29
4	Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico T1-41.	31

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Resultados de las evaluaciones biológicas y estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados.	37
2	Datos espectroscópicos de NMR (^1H , 300 MHz; ^{13}C 75 MHz; δ en ppm; J en Hz) de la 5-metilmeleina (1), 5-formilmeleina (2) y 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3) en CDCl_3 .	46
3	Datos espectroscópicos de NMR (^1H , 300 MHz; ^{13}C 75 MHz; δ en ppm; J en Hz) de la preusomerina G (4) en CDCl_3 .	57

Lista de abreviaturas

ABC	Transportador dependiente de ATP	μm	Micrómetros
Abs	Absorbancia	mg	Miligramos
ADN	Ácido desoxirribonucleico	mg/L	Miligramos por litro
ARN	Ácido ribonucleico	min	Minutos
°C	Grado centígrado	mL	Mililitro
CCA	Cromatografía en columna abierta	mL/min	Mililitros por minuto
CHCl ₃	Cloroformo	mm	Milímetros
CO ₂	Dióxido de carbono	mm ²	Milímetros cuadrados
DMSO	Dimetilsulfóxido	mM	Milimolar
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	MRP	Proteína asociada a MDR
ESI	Ionización por electrospray	MS	Espectrometría de masas
g	Gramos	nm	Nanómetros
GST	Glutación S-transferasa	NMR	Resonancia Magnética Nuclear
HCT15	Línea celular de adenocarcinoma colorrectal	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
HeLA	Línea celular de cáncer cervical	PDA	Agar papa dextrosa
H ₂ O	Agua	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	Pgp	Glicoproteína P
IR	Infrarrojo	RMPI	Medio Roswell Park Memorial Institute
kV	Kilovolts	rpm	Revoluciones por minuto
LC	Cromatografía de líquidos	TCA	Ácido tricloroacético
LRP	Proteína de resistencia pulmonar	t _R	Tiempo de retención
MDR	Gen de multiresistencia a fármacos	TRIS	tris(hidroximetil) aminometano
MEA	Agar extracto de malta	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
MeCN	Acetonitrilo	UV	Ultravioleta
MeOH	Metanol	V	Volts
μg	Microgramos	YESD	Extracto de levadura-peptona de soya-dextrosa
μL	Microlitros		

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de los hongos microscópicos como una fuente potencial de metabolitos biodinámicos.

Los hongos constituyen un grupo de microorganismos megadiverso y ampliamente distribuido en la naturaleza, que incluye mohos, setas y levaduras. A la fecha, se han descrito más 100,000 especies diferentes y se estima que podrían existir hasta 1,5 millones de especies a nivel mundial (Dictionary of Natural Products, 2012; Blackwell, 2011; Hawksworth y Rossman, 1997, Hawksworth, 1991). La clasificación general de estos organismos, basada en la comparación de las secuencias del gen del ARN 18S ribosomal, define a varios grupos fúngicos importantes diferenciados como los Quitridiomycetos, los Zigomicetos, los Glomeromicetos, los Ascomycetos y los Basidiomicetos (James, 2006; Blackwell *et al.*, 2006; Hibbett *et al.*, 2007).

Debido a su extensa distribución en casi cualquier tipo de hábitat, se estima que numerosas especies novedosas permanecen aún sin descubrir. Así algunos sustratos y hábitats inexplorados como son el rumen de mamíferos herbívoros, algas, líquenes, musgos, plantas marinas, incluyendo las que se encuentran en los manglares, trozos de madera, rocas, insectos, suelo volcánico, residuos vegetales en descomposición, por mencionar solo algunos, son fuentes invaluable para la obtención de este tipo de microorganismos (Hawksworth y Rossman, 1997).

Cabe destacar que la búsqueda de nuevos productos naturales de utilidad para la industria farmacéutica y agroquímica es de gran relevancia, ya que actualmente, seis de cada 20 de los medicamentos prescritos en el mercado de la medicina alopática son de origen fúngico y/o bacteriano (Newman y Cragg, 2012; Gloer, 1997). Por otra parte, tan sólo el 5% de los hongos descritos en la literatura como fuentes potenciales de estos productos han sido estudiados desde el punto de vista químico y biológico (Hawksworth, 1991, 2001; Schulz *et al.*, 2002).

Finalmente, es importante mencionar la capacidad que presentan estos microorganismos para la síntesis, mediante diversas rutas biogénicas que en ocasiones son únicas e inusuales, de diversos metabolitos secundarios que incluyen importantes fármacos, venenos potentes y algunos metabolitos tóxicos pero de utilidad en la industria farmacéutica como herramientas de investigación (Keller *et al.*, 2005).

Entre los hongos microscópicos que presentan una gran capacidad para biosintetizar nuevos metabolitos secundarios de interés se encuentran los filamentosos y endófitos, pertenecientes en su mayoría a la clase de los Ascomicetos. Los Basidiomicetos son también reportados como una fuente natural importante para la obtención de compuestos bioactivos, en contraste, con las levaduras y los ficomicetos, especies de escaso interés en la producción de este tipo de compuestos (Bérdy, 2005). Así, el número total de productos naturales reportados en la literatura es de aproximadamente 260,000 moléculas, a las que cada año se incluyen 4,000 moléculas más (Dictionary of Natural Products, 2012). Del total de moléculas reportadas, cerca de 16,000 (alrededor del 6%) pertenecen a metabolitos de origen fúngico.

Algunos géneros de hongos microscópicos de interés como productores de metabolitos secundarios que pertenecen a los Ascomicetos son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, a partir de los cuales han sido aislados cerca de 950, 900 y 350 compuestos, respectivamente. Por otra parte, otras fuentes naturales de interés en la obtención de compuestos bioactivos son varias especies de hongos filamentosos y endófitos pertenecientes a los géneros *Trichoderma*, *Phoma*, *Alternaria*, *Acremonium* y *Stachybotrys* (Bérdy, 2005).

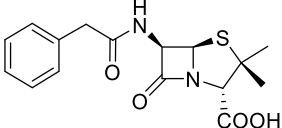
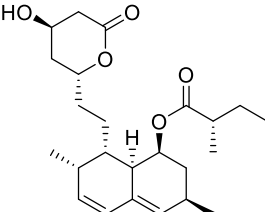
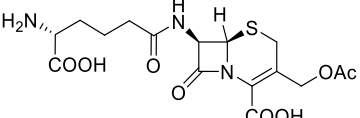
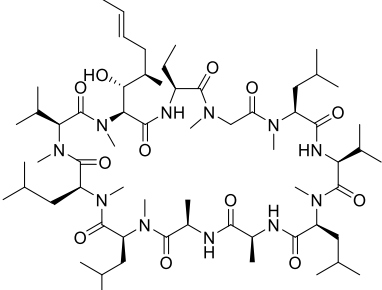
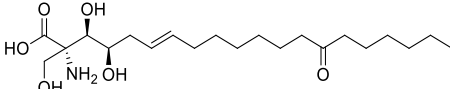
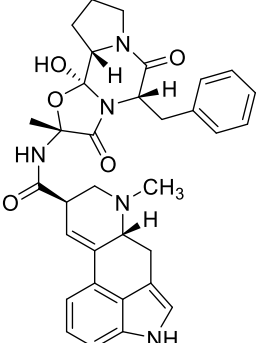
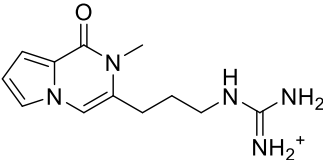
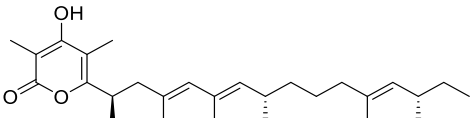
En este contexto, los microorganismos endófitos han co-evolucionado durante millones de años junto con sus huéspedes eucariotas (plantas superiores) y representan una fuente alternativa importante de nuevos metabolitos secundarios. En la última década, aproximadamente la tercera parte de los metabolitos fúngicos

bioactivos recién descubiertos (alrededor de 5000 compuestos) han sido aislados a partir de diversas cepas de este tipo de microorganismos. Lo anterior, aunado a la gran biodiversidad microbiana debida en parte a factores ambientales y ecológicos que generan hábitats únicos e inexplorados, convierte a esta fuente natural en una fuente de elección primaria para el aislamiento de metabolitos novedosos (Bérdy, 2012).

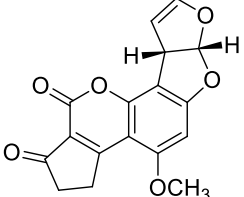
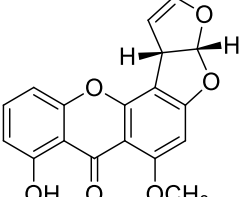
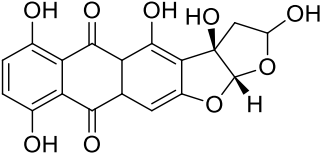
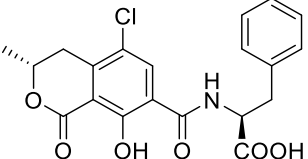
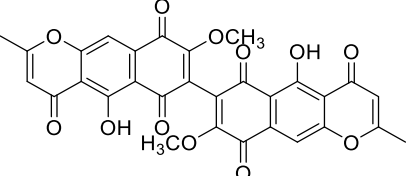
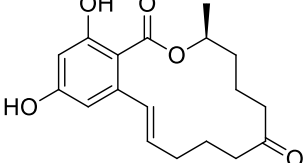
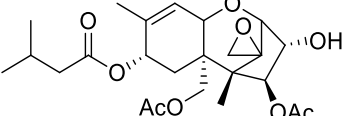
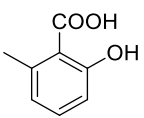
Cerca del 80% de los metabolitos secundarios aislados a partir de organismos fúngicos presentan importantes actividades biológicas como agentes antimicrobianos, antitumorales, antivirales, antifúngicos, inmunosupresores, y para el tratamiento de enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, algunas afecciones del corazón, depresión, diabetes, hipercolesterolemia, entre otras. En este contexto, los metabolitos fúngicos claramente representan una fuente persistente de novedosos prototipos de fármacos y/o agentes terapéuticos (Bérdy, 2005; Newman y Cragg, 2012).

El estudio sistemático de los metabolitos fúngicos comenzó en el año de 1922 en el grupo de investigación del Dr. Harold Raistrick, quien caracterizó cerca de 200 compuestos. Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento y desarrollo de la penicilina que se centró la atención general sobre esta clase de organismos, y numerosas compañías farmacéuticas iniciaron diversos programas de investigación en la búsqueda de fármacos prototipo. Hacia el año de 1950, una gran variedad de estos productos microbianos con aplicación farmacéutica habían sido descubiertos (Raistrick, 1950; Keller *et al.*, 2005). A la fecha, esta búsqueda ha continuado, y el aislamiento de numerosos metabolitos ha sido objeto de varias revisiones bibliográficas. En el **Cuadro 1** se resumen algunos de los metabolitos más relevantes, así como sus propiedades biológicas y sus fuentes de obtención (Pelaez, 2005; Keller *et al.*, 2005; Hoffmeister y Keller, 2007).

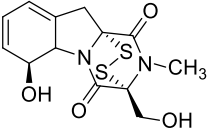
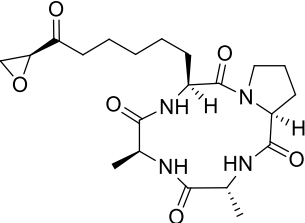
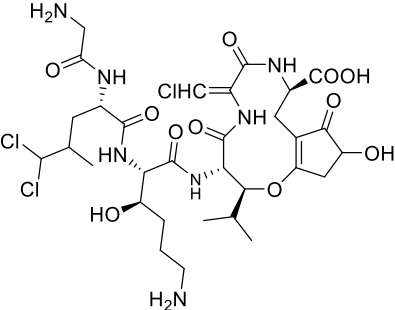
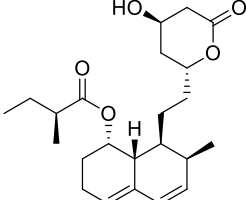
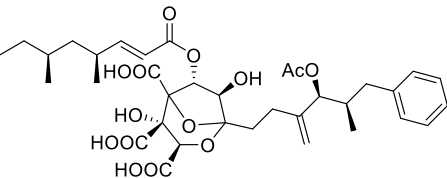
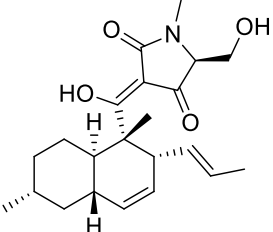
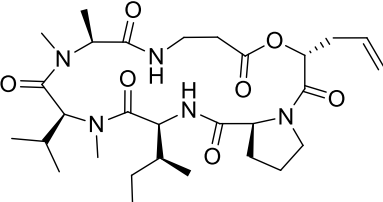
Cuadro 1. Principales metabolitos secundarios producidos por hongos microscópicos de importancia farmacéutica y agroquímica.

Especie	Compuesto	Estructura	Actividad
<i>Penicillium chrysogenum</i>	Penicilina G		Antibiótico β -lactámico
<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastatina		Hipocolesterolemiante
<i>Cephalosporium acremonium</i>	Cefalosporina C		Antibiótico β -lactámico
<i>Beauveria nivea</i>	Ciclosporina A		Inmunosupresor
<i>Isaria sinclairii</i>	Miriocina		Inmunosupresor
<i>Claviceps purpurea</i>	Ergotamina		Vasoconstrictor
<i>Neotyphodium spp.</i>	Peramina		Insecticida
<i>Alternaria solani</i>	Alternapirona		Patógeno de plantas

Cuadro 1. Principales metabolitos secundarios producidos por hongos microscópicos de importancia farmacéutica y agroquímica (continuación).

Especie	Compuesto	Estructura	Actividad
<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Aflatoxina B ₁		Contaminante de alimentos y tóxico para humanos
<i>A. nidulans</i>	Esterigmatocistina		Contaminante de alimentos y carcinogénico
<i>Dothistroma septosporum</i>	Dotistromina		Patógeno del <i>Pinus radiata</i> (pino de California)
<i>Aspergillus</i> sp. <i>Penicillium</i> sp.	Ocratoxina A		Micotoxina de cereales y frutas secas
<i>Fusarium graminearum</i>	Aurofusarina		Contaminante de cultivos de importancia agrícola
<i>Fusarium graminearum</i>	Zearalenona		Contaminante de cultivos de maíz
<i>Fusarium sporotrichoides</i>	Toxina T-2 (tricoteceno)		Contaminante de cultivos de importancia agrícola
<i>Penicillium patulum</i>	Ácido 6-metilsalicílico		Antiinflamatorio

Cuadro 1. Principales metabolitos secundarios producidos por hongos microscópicos de importancia farmacéutica y agroquímica (continuación).

Especie	Compuesto	Estructura	Actividad
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Gliotoxina		Aspergilosis en humanos
<i>Cochliobolus carbonum</i>	Toxina HC		Afecta cultivos de maíz
<i>Cochliobolus victoriae</i>	Victorina		Afecta cultivos de avena
<i>Penicillium citrinum</i>	Compactina		Hipocolesteremiante
<i>Phoma</i> sp.	Escualestatina		Hipocolesteremiante
<i>Fusarium heterosporum</i>	Equisetina		Agonista adrenérgico del sistema nervioso simpático
<i>Metarhizium anisopliae</i>	Destruxin A		Inhibidor de la proliferación de células linfocíticas

1.2 Estudios de derreplicación de metabolitos secundarios fúngicos.

Los productos naturales históricamente han jugado un papel vital en el descubrimiento de fármacos sirviendo como medicamentos *per se* o como prototipos para la síntesis de fármacos menos tóxicos y más eficaces. También juegan un papel importante como herramientas de investigación para la caracterización de nuevos blancos moleculares clínicamente importantes, especialmente en la terapia del cáncer y algunas enfermedades infecciosas (Yang *et al.*, 2014). Un esfuerzo importante está siendo realizado por muchos grupos de investigadores de todo el mundo para el aislamiento de productos naturales de macro y microorganismos terrestres y marinos. Estos estudios son frecuentemente realizados aplicando diversas estrategias que incluyen desde la realización de bioensayos para identificar a partir de los extractos crudos a los compuestos bioactivos que éstos podrían contener, y que pueden ser aislados por un proceso de fraccionamiento biodirigido, lo cual involucra la obtención de cantidades importantes de los metabolitos de interés, mediante procesos cromatográficos extensos que permitan su aislamiento y purificación, seguido de la caracterización por técnicas instrumentales que incluyen a la espectrometría de masas y a la espectroscopia de NMR, UV e IR (Lang *et al.*, 2008).

Las últimas dos décadas han sido testigo del decremento en los esfuerzos por el descubrimiento de fármacos a partir de fuentes naturales dentro de la industria farmacéutica debido, principalmente, a la implementación de estrategias de química combinatoria modernas (Yang *et al.*, 2014). Los retos principales en los diversos programas de investigación básica establecidos para el descubrimiento de fármacos a partir de estas fuentes son: (1) la complejidad para la interpretación de los resultados sobre la actividad biológica observada en los extractos íntegros, debido en parte, a la baja concentración en la que los compuestos activos se encuentran presentes, aunado al potencial de antagonismo/sinergismo de los mismos; (2) la interferencia de otros compuestos que dificultan el aislamiento biodirigido de los prototipos; (3) el incremento de los costos para los procesos de

aislamiento y escalamiento; y (4) el reaislamiento de compuestos bioactivos conocidos (Yang *et al.*, 2014). Todo esto, aunado al incremento en el costo de la mano de obra calificada y la urgente necesidad por nuevos medicamentos para el tratamiento de enfermedades emergentes, hace indispensable el desarrollo de técnicas que faciliten el aislamiento selectivo de nuevas entidades químicas (El-Elimat *et al.*, 2013). En este contexto, una técnica denominada de derreplicación (del inglés dereplication), ha generado excelentes resultados, por su capacidad para seleccionar a los extractos que producen metabolitos secundarios conocidos, de aquellos que producen nuevos compuestos de interés (Lang *et al.*, 2008).

En la literatura se encuentran reportados algunos métodos de derreplicación basados en técnicas acopladas, y cada uno tiene sus ventajas en cuanto a sensibilidad, resolución o límites de detección (μg vs ng) de las muestras analizadas. Las técnicas analíticas más comunes involucran a la LC-UV, LC-MS, LC-MS/MS y LC-NMR, y la combinación de una o más de éstas técnicas. Los métodos de derreplicación basados en el uso de la LC-MS y LC-MS/MS proporcionan información del peso molecular de los compuestos de interés (masa molecular de baja o alta resolución) que es lo que se reporta en la mayoría de las bases de datos especializadas [AntiBase, Dictionary of Natural Products, MarinLit, SciFinder Scholar, Chemical Abstracts Service (CAS), etc.]. Las desventajas de estos métodos implican que se puede realizar una identificación errónea de algún componente, debido a la incertidumbre del ión pseudomolecular aparente, que no puede ser atribuido fácilmente a un aducto de iones determinado o a la presencia de iones interferentes de los componentes minoritarios presentes y que presenten una mejor ionización que la del compuesto de interés (Lang *et al.*, 2008).

La capacidad para caracterizar la taxonomía de una planta (por lo menos a nivel de género) basado en la morfología puede simplificar el proceso de derreplicación, ya que permite seleccionar preliminarmente a las muestras desde el punto de vista quimiotaxonómico para los taxones objeto de estudio. En contraste, el proceso de derreplicación puede ser más complicado para organismos que presentan una

taxonomía desconocida (El-Elimat *et al.*, 2013). Aunque los hongos han sido relativamente poco investigados, un gran reto con estos microorganismos como una fuente de compuestos bioactivos novedosos es la producción de micotoxinas, las cuales pueden ser producidas repetidamente por numerosas especies fúngicas (El-Elimat *et al.*, 2013) y que es de gran importancia su identificación debido a su elevada toxicidad. Esta clase de compuestos puede ser identificada a través de la aplicación de técnicas de derreplicación.

Varios métodos de derreplicación han sido reportados para el estudio de metabolitos secundarios fúngicos; sin embargo, han tenido diversas limitaciones incluyendo los tiempos de duración de las corridas cromatográficas (30 min o más), largos tiempos de preparación de muestras, sensibilidad, mediciones de masa de baja resolución y falta de confirmación de los patrones de fragmentación. Una de las técnicas que ha avanzado sustancialmente en los últimos años debido a la evolución de nanosondas y criosondas es la cromatografía de líquidos acoplada a resonancia magnética nuclear (NMR) (Lang *et al.*, 2008). Sin embargo, la LC-MS es aún más sensible, proporcionando resultados confiables dentro del rango de nanogramos (Feng y Siegel, 2007; Nielsen *et al.*, 2011). La cromatografía de líquidos acoplada a la extracción en fase sólida y NMR también ha sido reportada como una plataforma analítica poderosa para estudios de derreplicación (Johansen *et al.*, 2013), ya que, es capaz de generar información estructural más precisa que las técnicas basadas en la espectrometría de masas. Sin embargo, la sensibilidad y la instrumentación compleja limitan su aplicación para este propósito (Zhang *et al.*, 2014).

Recientemente, una estrategia de derreplicación basada en el acoplamiento de la LC-UV y la MS/MS de alta resolución ha sido desarrollada (El-Elimat *et al.*, 2013). Esta metodología tiene diversas ventajas: en primer lugar, la base de datos incluye espectros de masas de alta resolución y espectros de MS/MS por la técnica de electrospray en modos positivo y negativo, además de los espectros en el UV con máximos de absorción y tiempos de retención de aproximadamente 250

metabolitos secundarios fúngicos citotóxicos conocidos. Además, el uso de la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) permite el desarrollo de un método cromatográfico rápido (10 min), siendo uno de los más utilizados en una estrategia de derreplicación de productos naturales. Por otra parte el uso de espectrometría de masas de alta resolución y los datos de MS/MS confiere un alto grado de confianza en la caracterización estructural de los compuestos analizados. Finalmente, el método fue diseñado como una herramienta de análisis cualitativa, y como tal, la sensibilidad para detectar compuestos individuales es adecuada. El acoplamiento del UPLC con una técnica de mayor sensibilidad como la espectrometría de masas de alta resolución permite la detección de trazas de estos compuestos en las muestras analizadas. Es importante mencionar, que el uso de este protocolo durante más de dos años para el análisis de numerosas muestras, ha permitido la detección de compuestos presentes en concentraciones menores de 0.2 mg/g de extracto (El-Elimat *et al.*, 2013).

1.3 Cáncer en México y el mundo.

La palabra cáncer se utiliza para agrupar aproximadamente 200 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de células, situación que es heredada hacia las células hijas y que se manifiesta por una reducción en el control del crecimiento y la función celular (NCI, 2014). Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. La metástasis es la principal causa de muerte por cáncer (OMS, 2014).

A nivel mundial, el cáncer es la principal causa de muerte (aproximadamente 8.2 millones de defunciones en 2012) y cerca de 14 millones de nuevos casos aparecen en todo el mundo (IARC, 2012). Los principales tipos de cáncer son los siguientes:

- pulmonar (1.6 millones de defunciones);
- hepático (745,000 defunciones);
- gástrico (723,000 defunciones);
- colorrectal (694,000 defunciones);
- mamario (521,000 defunciones);
- cáncer de esófago (400,000 defunciones).

La transformación de una célula normal en tumoral es un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y tres categorías de agentes externos (OMS, 2014):

- carcinógenos físicos: radiaciones ultravioleta e ionizantes;
- carcinógenos químicos: asbestos, componentes del humo de tabaco, aflatoxinas (contaminantes de los alimentos) o el arsénico (contaminante del agua de bebida);
- carcinógenos biológicos: infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos.

El 70% de todas las muertes por cáncer registradas en 2012 se produjeron en África, Asia, América Central y Sudamérica (**Figura 1**). Se prevé que los casos anuales de cáncer aumentarán de 14 millones en 2012 a 22 millones en las próximas dos décadas. Una tendencia clara en las tasas de mortalidad es que son 15% más elevadas en las regiones desarrolladas que en las poco desarrolladas en el caso de los hombres y 8% superior en mujeres (**Figura 1**); sin embargo, aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol (OMS, 2012).

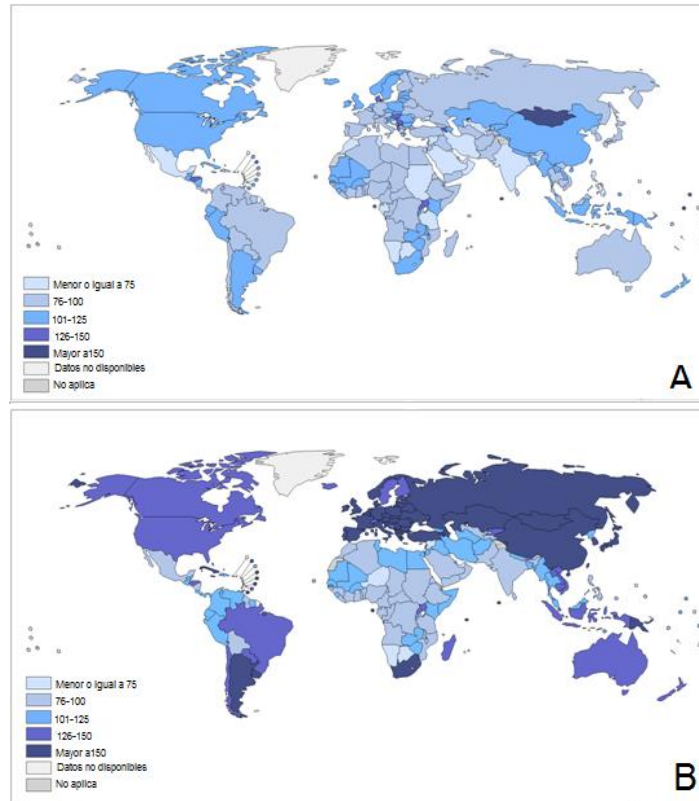


Figura 1. Tasas de mortalidad estandarizadas para el cáncer en mujeres **(A)** y hombres **(B)** por cada 100,000 habitantes (OMS, 2012).

En nuestro país, el cáncer es la tercera causa de muerte, solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes, y cobra la vida de casi 80 mil mexicanos al año. De acuerdo a estimaciones de la Unión Internacional contra el Cáncer, cada año se suman más de 128,000 casos **(Figuras 2 y 3; SSA, SPPS; 2013)**.

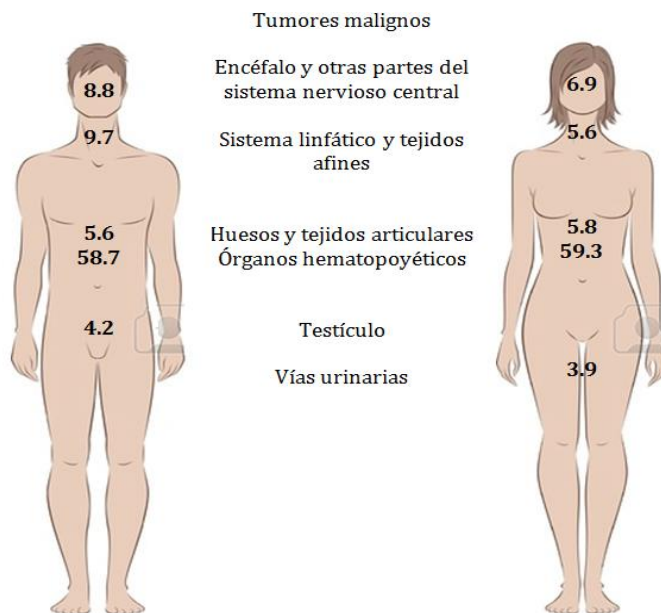


Figura 2. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población menor de 20 años por tumores malignos según el sexo (adaptación de INEGI, 2012).

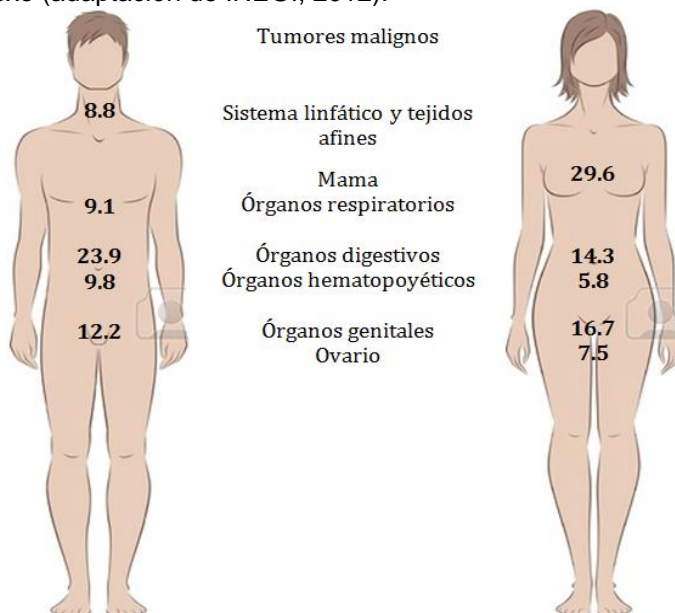


Figura 3. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población mayor de 20 años por tumores malignos según el sexo (adaptación de INEGI, 2012).

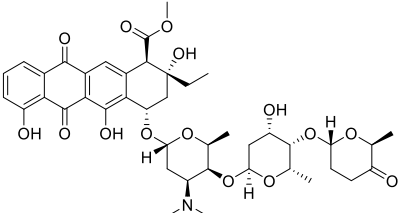
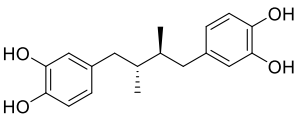
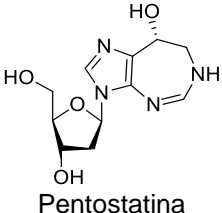
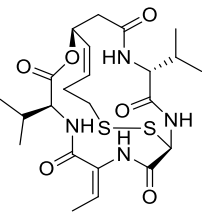
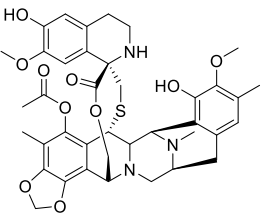
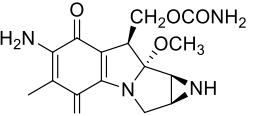
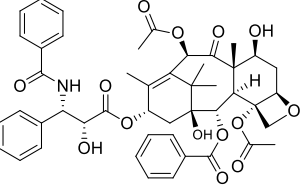
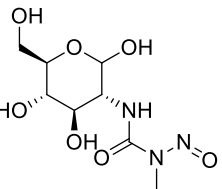
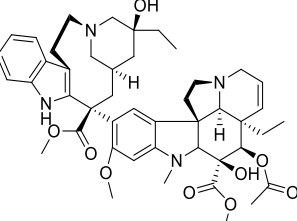
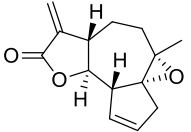
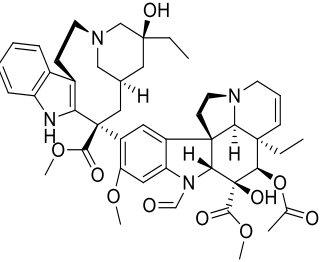
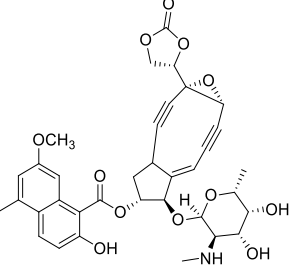
El diagnóstico temprano del cáncer puede incrementar las tasas de curación mediante un tratamiento local, como la cirugía o la radioterapia. Sin embargo, existen casos remanentes de micrometástasis temprana en donde la quimioterapia es la terapia de elección; ésta última utiliza fármacos para eliminar a las células

cancerosas deteniendo o disminuyendo su rápida proliferación; sin embargo, no excluye a las células sanas que se replican rápidamente como la de los folículos pilosos, el aparato reproductor, el epitelio intestinal y la médula ósea, observándose distintos efectos secundarios como pérdida de cabello, falta de apetito, vómito, inmunosupresión, entre otras (Katzung, 2002).

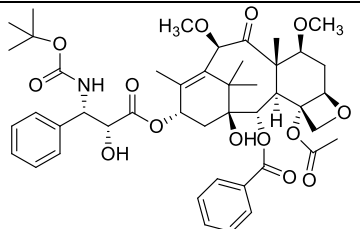
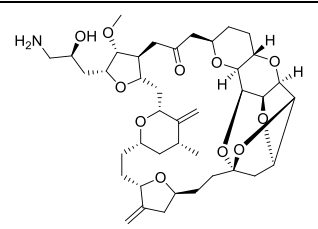
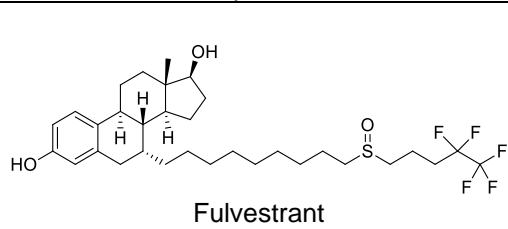
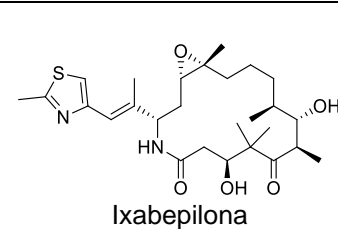
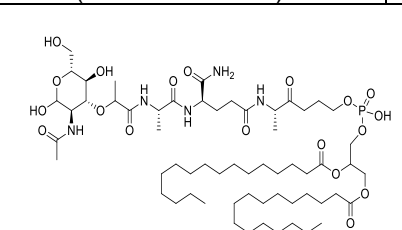
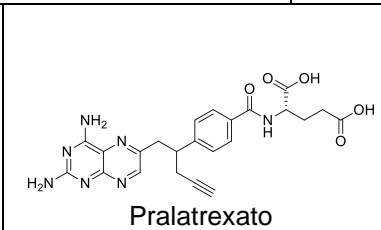
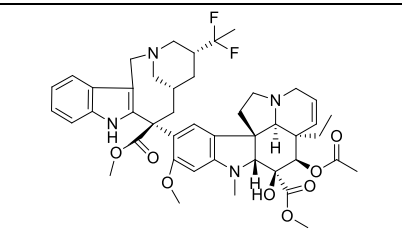
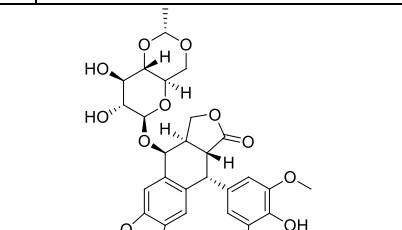
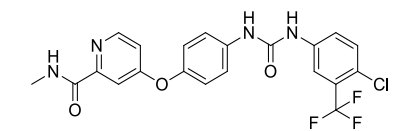
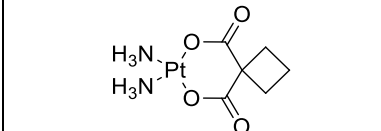
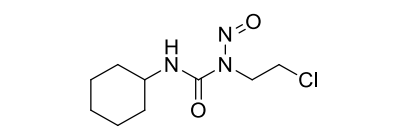
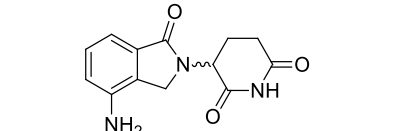
La quimioterapia del cáncer se ha desarrollado de manera más específica, desde el uso en los años cuarenta de agentes citotóxicos como las mostazas nitrogenadas, el desarrollo de fármacos anticancerígenos a partir de fuentes naturales en los sesenta, como es el caso de los alcaloides derivados de la vinca (Ng, 2011), los derivados de la podofilotoxina (Afroz y Naik, 2009), los taxanos (Singla *et al.*, 2002) y las antraciclinas (Pai y Nahata, 2000), hasta el uso de anticuerpos monoclonales específicos (Adams y Weiner, 2005), inmunotoxinas (Kreitman y Pastan, 1998) y agentes específicos que inactivan vías de crecimiento de células cancerígenas (Gottesman, 2002).

Los productos naturales desempeñan un papel significativo en el descubrimiento y el desarrollo de nuevos fármacos en donde aproximadamente el 70% de éstos es de origen natural, viéndose reflejado principalmente en áreas como el tratamiento del cáncer y neoplasias; donde desde el inicio formal de la quimioterapia en los años 40 hasta el 2010, de los agentes anticancerígenos aprobados (Cuadro 2) el 48.6% del total son de origen completamente natural o derivados de productos naturales (Newman y Cragg, 2012).

Cuadro 2. Fármacos aprobados para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

<i>Fármacos anticancerígenos de origen natural</i>				
 <p>Aclarubicina (Inhibidor de las topoisomerasas I y II)</p>	 <p>Masoprocol (Inhibidor de lipoxigenasa)</p>	 <p>Pentostatina (Inhibidor de la adenosina desaminasa)</p>	 <p>Romidepsina (Inhibidor de la histona deacetilasa)</p>	 <p>Trabectedina (Unión covalente al surco menor del ADN)</p>
 <p>Mitomicina C (Inhibidor de la síntesis de ADN)</p>	 <p>Paclitaxel (Inhibición de la despolimerización de la tubulina)</p>	 <p>Estreptozocina (Inhibidor de la síntesis de ADN)</p>	 <p>Vinblastina (Unión a tubulina)</p>	 <p>Arglabina (Inhibidor de la aromatasa)</p>
 <p>Vincristina (Unión a tubulina)</p>			 <p>Neocarzinostatin (Unión al surco menor del ADN)</p>	

Cuadro 2. Fármacos aprobados para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (continuación).

<i>Fármacos anticancerígenos derivados de un producto natural</i>			
 <p>Cabazitaxel (Unión a tubulina)</p>	 <p>Eribulina (Unión a tubulina)</p>	 <p>Fulvestrant (Antagonista del receptor estrogénico)</p>	 <p>Ixabepilona (Inhibidor de microtúbulos)</p>
 <p>Mifamurtida (Ligando específico a NOD2)</p>	 <p>Pralatrexato (Antagonista del ácido fólico)</p>	 <p>Vinflunina (Inhibidor y desregulador del huso mitótico)</p>	 <p>Etopósido (Inhibidor de la topoisomerasa II)</p>
<i>Fármacos anticancerígenos de origen sintético</i>			
 <p>Sorafenib (Inhibidor de la tirosina quinasa)</p>	 <p>Carboplatino (Alquilante de ADN)</p>	 <p>Lomustina (Alquilante de ADN)</p>	 <p>Lenalidomida (Actividad antiangiogénica)</p>
<i>Fármacos anticancerígenos de origen biológico</i>			
<p>Sipuleucel-T (Activación de células inmunitarias)</p>	<p>Catumaxomab (Unión a los antígenos CD3 y EpCAM)</p>	<p>Ofatumumab (Unión al antígeno CD20 de linfocitos B)</p>	<p>Rituximab (Unión al antígeno CD20 de linfocitos B)</p>

En la quimioterapia del cáncer un problema importante es la resistencia a los fármacos. Los estudios sobre esta temática han derivado en el descubrimiento de numerosos mecanismos de acción presentes en las células tumorales con los cuales se reducen los efectos citotóxicos de los fármacos anticancerígenos (Anthoney y Kaye, 1999). Sin embargo, el fracaso al interpretar estos estudios de investigación para mejorar los resultados clínicos de los pacientes sigue siendo uno de los problemas más urgentes en la investigación del cáncer contemporáneo (Broxterman *et al.*, 2003).

La resistencia a los fármacos anticancerígenos engloba dos amplias categorías: la resistencia innata observada cuando la enfermedad del paciente falla al responder a la terapia inicialmente; y la adquirida que surge con el desarrollo de un tumor recurrente al mismo tiempo después de completar el tratamiento inicial. Aunque los mecanismos celulares de la resistencia a los fármacos juegan una parte importante en la falla de la quimioterapia del cáncer, otros factores importantes, como los ambientales, afectan la probabilidad de que un cierto tratamiento pueda ser efectivo (Damia y Garattini, 2014).

Una vasta mayoría de estudios de laboratorio sobre resistencia a fármacos mediante el uso de cultivos de líneas celulares tumorales *in vitro* derivadas de clonas, reducen el riesgo de diferencias en sensibilidad a agentes citotóxicos específicos que surge a través de la variabilidad entre células de la misma línea. La capacidad del control en el ensayo *in vitro* permite exponer a todas las células en condiciones idénticas, por ejemplo, una concentración específica del agente citotóxico. Esto mejora la importancia estadística de los valores obtenidos; sin embargo, el análisis de las líneas celulares con diferentes sensibilidades hacia agentes citotóxicos específicos sin considerar los aspectos moleculares y bioquímicos puede provocar el desarrollo de la resistencia (Anthoney y Kaye, 1999).

Uno de los mecanismos importantes en la resistencia a diversos fármacos en cultivos de células cancerígenas se debe a la sobre expresión en la membrana superficial de una proteína transportadora dependiente de energía, la glicoproteína P (Pgp). Esta proteína puede incrementar el flujo de salida de los fármacos anticancerígenos de la célula, reduciendo de esta manera la concentración intracelular efectiva. La Pgp se expresa normalmente en cantidades detectables en tejidos como el colon, corteza adrenal, riñón e hígado. Los tumores en estos órganos muestran frecuentemente resistencia inherente a una gama de fármacos anticancerígenos. El gen de resistencia a multifármacos (MDR-1), que codifica a la Pgp, se expresa en un 50% de los cánceres humanos, el cual es de importancia fisiológica (Kartner *et al.*, 1983; Goldstein *et al.*, 1989).

Otra proteína asociada a la resistencia sobre los agentes antitumorales es la proteína MDR (MRP), un miembro de la superfamilia de transportadores dependientes de ATP (ABC) que confiere una resistencia similar, pero no idéntica, al espectro de fármacos de la Pgp (Cole *et al.*, 1992; Grant *et al.*, 1994). Por otra parte, la proteína de resistencia pulmonar (LRP) fue la primera en identificarse en una línea celular de cáncer de pulmón donde se visualizaba al gen MDR (Scheper *et al.*, 1995). Esta evidencia sugirió que la LRP se expresa frecuentemente en tumores quimioresistentes que en los cánceres quimiosensibles (Izquierdo *et al.*, 1997).

Los mecanismos de resistencia a fármacos que involucran bombas proteicas asociadas a membranas, aunque estén caracterizadas a fondo, no son el único medio por el cual puede surgir resistencia dentro de las células tumorales. La concentración de enzimas intracelulares (tanto en activación como de detoxificación) involucrada en el metabolismo de fármacos citotóxicos ha sido medida para determinar si están relacionados con la respuesta al tratamiento. La glutatión S transferasa (GST) es un grupo de enzimas detoxificantes que actúan en el metabolismo de fármacos como el cisplatino, doxorubicina, melfalán, ciclofosfamida y las nitroureas (Green *et al.*, 1993). La GST- π es la isoenzima

predominante encontrada en cáncer de ovario y varios estudios han indicado que si está presente en los estudios clínicos es de importancia en el proceso de quimioterapia debido a que no permitirá que estos fármacos alcancen una concentración efectiva (Hamada *et al.*, 1994).

Finalmente, los estudios sobre la participación de las vías de reparación del ADN en el desarrollo de resistencia a fármacos se han incrementado en recientes años. Los resultados *in vitro* de la expresión de genes específicos involucrados en estas vías, como es el caso de la proteína p53, muestran que los niveles elevados de esta proteína sugieren una mutación en el gen p53. La proteína p53 está involucrada en la regulación de los puestos de control del ciclo celular, la reparación del ADN y mutaciones en las vías apoptóticas del gen, las cuales pueden ser responsables al alterar la sensibilidad de las células tumorales a los fármacos anticancerígenos, lo cual resulta en una resistencia al fármaco. La detección por inmunohistoquímica de niveles elevados de p53 ha sido asociada con características establecidas de un fenotipo agresivo y un mal diagnóstico en un gran número de tumores, incluyendo ovario, mama y vejiga (Zee *et al.*, 1995; Eissa *et al.*, 1997; Lacombe *et al.*, 1996).

Así, el descubrimiento y la caracterización química y biológica de sustancias provenientes de plantas y de microorganismos continúan representando una alternativa para la obtención de nuevos fármacos o precursores de interés clínico en el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Sin embargo, con el propósito de disminuir los efectos secundarios, sigue siendo prioritaria la búsqueda de nuevas estructuras químicas que permitan el desarrollo de fármacos más eficaces, selectivos y poco tóxicos (Figuroa, 2013).

2. HIPÓTESIS

2.1. Los hongos microscópicos aislados a partir de diversos hábitats inexplorados (saprótrofos, endófitos, endoligogénicos, marinos, etc.) representan candidatos idóneos para la obtención de compuestos novedosos.

2.2. La selección de especies fúngicas con base en pruebas de citotoxicidad y estudios de derreplicación permitirá la obtención de metabolitos secundarios novedosos con actividad citotóxica y/o anticancerígena.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se generó como parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios biodinámicos de origen fúngico, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer y también al conocimiento de la biodiversidad microbiana de nuestro país.

Así, el objetivo general del trabajo es realizar el aislamiento de metabolitos biodinámicos novedosos a partir de especies fúngicas selectas con una actividad citotóxica importante.

Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Realizar el aislamiento del mayor número de especies de hongos microscópicos presentes en diversas muestras de suelo, partes aéreas de fuentes vegetales varias y líquenes, mediante técnicas microbiológicas convencionales.
- 2.- Obtener los cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos aislados a partir de las muestras de suelo y de plantas seleccionadas.
- 3.- Preparar los cultivos en pequeña escala de las especies aisladas con la finalidad de obtener los extractos orgánicos correspondientes mediante las técnicas de maceración y de partición.
- 4.- Realizar la evaluación de citotoxicidad y los estudios de derreplicación de cada uno de los extractos orgánicos preparados.
- 5.- Preparar los cultivos en mediana escala de dos de las especies fúngicas más activas, seleccionadas con base en los resultados obtenidos en las evaluaciones biológicas y análisis de derreplicación.
- 6.- Realizar el fraccionamiento preliminar mediante técnicas cromatográficas de los extractos orgánicos de las especies seleccionadas.

7.- Realizar el aislamiento, la purificación y la caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las especies objeto de estudio.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio

El aislamiento de las especies fúngicas endófitas y/o endoligógenas, se realizó a partir de hojas asintomáticas de plantas (arbustos, árboles, etc.) y líquenes, respectivamente, colectados en la reserva ecológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para cada muestra recolectada se realizó un proceso de limpieza con agua con el objetivo de retirar residuos de tierra, sustancias extrañas o microorganismos que pudieran alterar la integridad del material recolectado. Posteriormente, las muestras se cortaron en fragmentos pequeños (1–2 mm²), los cuales fueron esterilizados superficialmente mediante lavados sucesivos con soluciones de etanol al 95% (10 segundos), hipoclorito de sodio al 70% (2 min.) y finalmente con una solución de etanol al 70% (2 min.). Todas las muestras se mantuvieron en condiciones de esterilidad previa inoculación en los medios de crecimiento adecuados. El crecimiento de los microorganismos se realizó en tubos de reacción Eppendorf con capacidad de 1.5 mL conteniendo medio de agar papa dextrosa (PDA) o de extracto de malta (MEA), colocando un fragmento de muestra en cada tubo (10 tubos por cada medio PDA y MEA, respectivamente). Una vez detectado algún crecimiento, proceso que tardó entre 7 y 30 días, el micelio de las diferentes colonias se transfirió en condiciones estériles a cajas de Petri con medio PDA.

Los hongos saprófitos fueron aislados a partir de una muestra de suelo colectada en las faldas del volcán de San Martín Tuxtla, Veracruz (18° 30.55" N; -95° 11.04' O). El aislamiento de los microorganismos a partir de esta muestra se realizó utilizando el método de dilución. La muestra (500 mg) libre de materiales extraños (restos de raíces, piedras, etc.) fue diluida en agua estéril a las concentraciones finales de 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 p/v. Todas las diluciones se realizaron por triplicado. Enseguida, 1 mL de cada dilución fueron vertidos por triplicado en cajas de Petri estériles, y posteriormente inoculadas con medio de cultivo PDA

adicionado con estreptomicina (30 mg/L) y el colorante rosa de bengala (50 mg/L). Una vez detectado algún crecimiento (micelio), proceso que tardó entre 2 y 5 días, cada colonia fue transferida en tubos de reacción (50 tubos con medio PDA y MEA, respectivamente) para su aislamiento y purificación.

4.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala.

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de las diferentes muestras (inciso **4.1** de esta sección experimental), se realizó la preparación de los cultivos en pequeña escala en medio sólido. Para ello, cada organismo fue inicialmente cultivado en 15 mL de un medio líquido (YESD) conteniendo extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%) y dextrosa (2%), en agitación constante (100 rpm) por 5 días, para favorecer el crecimiento de los organismos mediante el incremento de la biomasa. Posteriormente, cada cultivo líquido fue vertido sobre un sustrato sólido compuesto por arroz húmedo (15 g de arroz/30 mL agua), en matraces Erlenmeyer de 125 mL. El proceso de fermentación se llevó a cabo durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-obscuridad 12/12 horas.

Los cultivos en mediana escala para cada microorganismo seleccionado fueron realizados siguiendo la misma estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior, utilizando tubos con 15 mL de medio líquido YESD, en agitación constante (100 rpm) por 5 días, y 75 g de arroz/150 mL agua de medio sólido (10×). El proceso de fermentación se realizó durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-obscuridad 12/12 horas.

4.3 Preparación de extractos orgánicos.

La preparación de los extractos orgánicos en pequeña y/o mediana escala se realizó a partir de cada cultivo sólido (inciso **4.2**), mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente con agitación constante (100 rpm) durante 24 horas, empleando como disolvente de extracción una mezcla de CHCl_3 -MeOH

(1:1) [90 mL para los cultivos en pequeña escala y 150 mL para los cultivos en mediana escala]. Transcurrido este tiempo de extracción, al extracto obtenido se le adicionaron 60 mL de H₂O y 40 mL de CHCl₃ para los cultivos en pequeña escala y 90 mL de H₂O y 60 mL de CHCl₃ para los cultivos en mediana escala, y esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos. Enseguida, se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y esta última se sometió a un proceso de extracción con CHCl₃ (20 y 40 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente). La fase orgánica obtenida de esta última extracción se llevó a sequedad a presión reducida. Posteriormente, el extracto de cloroformo fue resuspendido en una mezcla de MeCN–MeOH (1:1) [60 mL y 120 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente] y se sometió a un segundo proceso de partición con hexano (60 mL y 120 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente), finalmente la fracción de hexano se desechó y la fracción orgánica resultante se evaporó a sequedad a presión reducida.

4.4 Estudios de derreplicación.

Los estudios de derreplicación se realizaron utilizando a la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS) (El-Elimat *et al.*, 2013). La cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp., MA, EUA) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). Todos los análisis se realizaron a una temperatura de 40°C, empleando una columna Acquity BEH C₁₈ (Waters Co., MO, EUA) con un tamaño de partícula de 1.7 µm, y con un diámetro interno y longitud de 2.1 × 10 mm, respectivamente. La elución se realizó con una mezcla binaria constituida por MeCN (**A**)–ácido fórmico 0.1% (**B**), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% **A** e incrementando la composición hasta 100% **A**

durante 8 minutos, manteniendo la composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 minutos. Un detector PDA fue utilizado para adquirir los espectros en el UV, con un barrido desde 200 hasta 500 nm con una resolución de 4 nm.

Los análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HRESIMS) se realizaron por la técnica de electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI⁺ y ESI⁻, respectivamente) en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Inc., MA, EUA). Las condiciones del equipo en el modo de ionización positivo fueron las siguientes: temperatura del capilar: 275°C, 4.5 kV para la fuente de voltaje, 20 V para el voltaje del capilar y 95 V para la lente del tubo. Para el modo de ionización negativo las condiciones del equipo fueron las siguientes: temperatura del capilar: 275°C, 3.5 kV para la fuente del voltaje, 42 V para el voltaje del capilar y 110 V para la lente del tubo. El nitrógeno fue utilizado como gas acarreador y se fijó a 25 y 20 (unidades arbitrarias) para el modo positivo y negativo, respectivamente. El control del instrumento y el análisis de datos se realizaron utilizando el programa Xcalibur 2.1 (Thermo). Para cada análisis, se disolvió 1.0 mg de muestra en 0.5 mL de una mezcla de MeOH–dioxano (1:1) para obtener una concentración final de 2 mg/mL.

4.5 Ensayo de citotoxicidad.

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos, fracciones y/o compuestos puros se realizó utilizando tres líneas celulares: HCT15 (adenocarcinoma colorrectal), HeLA (cáncer cervical) y/o MCF7 (cáncer de mama) de humano. A continuación se describe con detalle el procedimiento (Vichai y Kirtikara, 2006):

4.5.1. Cultivo y suspensión de las líneas celulares. Las líneas celulares fueron conservadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), y se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire y 100% de humedad

relativa, hasta obtener células en fase logarítmica de crecimiento. Enseguida, 24 horas previas al ensayo se realizó el cambio de medio de cultivo, y antes de iniciar el ensayo se realizó el lavado de las células con 5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), posterior a este lavado se adicionaron 0.3 mL de tripsina, para despegar a las células de la caja de crecimiento y se incubó durante 5 minutos, transcurrido este tiempo de incubación, se analizó en el microscopio, que las células se hubieran despegado por completo, y se adicionaron 2 mL de medio RMPI 1640 y se homogenizó la suspensión. Finalmente, se realizó un conteo de las células en una cámara de Neubauer hasta obtener una suspensión de células de aproximadamente 10^4 .

4.5.2. Procedimiento: el ensayo se realizó en placas de Elisa de 96 pozos (250 μ L de capacidad) con una suspensión de células de aproximadamente 10^4 células. Para cada muestra a evaluar se prepararon dos diluciones a las concentraciones finales de 2 y 20 μ g/mL en DMSO al 10%. A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 190 μ L de la suspensión de células y 40 μ L de las diluciones de prueba conteniendo las concentraciones indicadas. Posteriormente, las cajas se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire y 100% de humedad relativa. Al cabo del período de incubación, se realizó la fijación celular mediante la adición de 100 μ L de ácido tricloroacético (TCA); la placa se incubó durante 30 min a 4°C. Al término de la incubación, se decantó el TCA y se realizaron tres lavados sucesivos con agua y enseguida se secó la placa a temperatura ambiente, posteriormente a cada pozo, se le adicionaron 100 μ L del colorante sulforodamida B (0.4%); enseguida se incubó por segunda vez la placa a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de colorante lavando la placa con una solución de ácido acético al 1%, finalmente, se secó la placa y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 564 nm, adicionando 200 μ L de una solución de tris-hidroximetil-aminoetano (TRIS) (10 mM). Como control positivo se utilizó vinblastina (2 μ g/mL) y como control negativo el disolvente DMSO. Finalmente, el porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó mediante la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ Inhibición del Crecimiento} = \frac{Abs_{Células+muestras} - Abs_{blanco}}{Abs_{Células+DMSO \text{ al } 10\%} - Abs_{blanco}} * 100$$

Las muestras con porcentajes de inhibición mayores al 80% a la concentración de 20 µg/mL fueron consideradas como activas para este ensayo.

4.6 Fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala de P11-7.

El fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala **P11-7** (329 mg) se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) empacada con 80 g de gel de sílice 60 (tamaño de partícula 10–12 µm, Merck Corp. NJ, EUA). Como fase móvil se utilizó hexano, mezclas entre hexano–CHCl₃ y MeOH, en orden creciente de polaridad (**Cuadro 3**). Se obtuvieron un total de 40 fracciones primarias, de 80 mL cada una, que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en un conjunto de 11 fracciones primarias (**F_P11-7₁–F_P11-7₁₁**).

4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios presentes en la fracción primaria F_P11-7₆.

Con la finalidad de analizar la complejidad de cada una de las fracciones primarias obtenidas a partir del fraccionamiento preliminar del extracto orgánico **P11-7**, se realizó una análisis de éstas mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), utilizando cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con detector PDA y un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD); este último con las siguientes condiciones: ganancia: 100; presión de gas: 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento; y temperatura del tubo: 50°C ± 25°C. El control del equipo, el procesamiento y manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). El análisis de cada una de

las fracciones primarias (**Cuadro 3**) se llevó a cabo utilizando una columna Phenomenex Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 4.6 mm); fase móvil: MeCN (**A**) y ácido fórmico en agua (0.1%) (**B**); gradiente: 40%→100% (**A**); tiempo de corrida: 30 min; flujo: 1 mL/min; longitud de onda de detección: 200–400 nm (**Figura 4**).

Cuadro 3. Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico de P11-7 .		
Sistema de elución	Fracciones	Clave/Peso (mg)
Hex	1-4	F_P11-7 ₁ (6.7)
Hex-CHCl ₃ (8:2)	5-8	F_P11-7 ₂ (2.8)
Hex-CHCl ₃ (6:4)	9-12	F_P11-7 ₃ (4.2)
Hex-CHCl ₃ (4:6)	13-16	F_P11-7 ₄ (2.8)
Hex-CHCl ₃ (2:8)	17-20	F_P11-7 ₅ (16.9)
CHCl ₃	21-24	F_P11-7 ₆ (32.1)
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	25-26	F_P11-7 ₇ (26.3)
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	27-28	F_P11-7 ₈ (215.8)
CHCl ₃ -MeOH (8:2)	29-32	F_P11-7 ₉ (13.7)
CHCl ₃ -MeOH (6:4)	33-36	F_P11-7 ₁₀ (6.0)
MeOH	37-40	F_P11-7 ₁₁ (13.1)

La separación y purificación de los compuestos de interés presentes en la fracción primaria **F_P11-7₆** (32.1 mg), se realizó mediante el escalamiento de las condiciones de análisis utilizadas a nivel analítico en una columna preparativa Phenomenex Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico en agua (1%) (**A**) y MeCN (**B**); gradiente: 40%→100% (**B**); tiempo de corrida: 30 min; flujo: 19 mL/min; longitud de onda de detección: 200–400 nm; tiempo de recolección: 15 segundos (**Figura 5**). Este procedimiento permitió el aislamiento de la 5-formilmeleina (**2**; t_R 7.6 min, 5.1 mg), 3,4-dihidro-8-hidroxi-5-metoxi-3-metilisocumarina (**3**; t_R 10.2 min, 4.2 mg) y la 5-metilmeleina (**1**; t_R 11.2 min, 11.2 mg), caracterizados mediante análisis de NMR y MS.

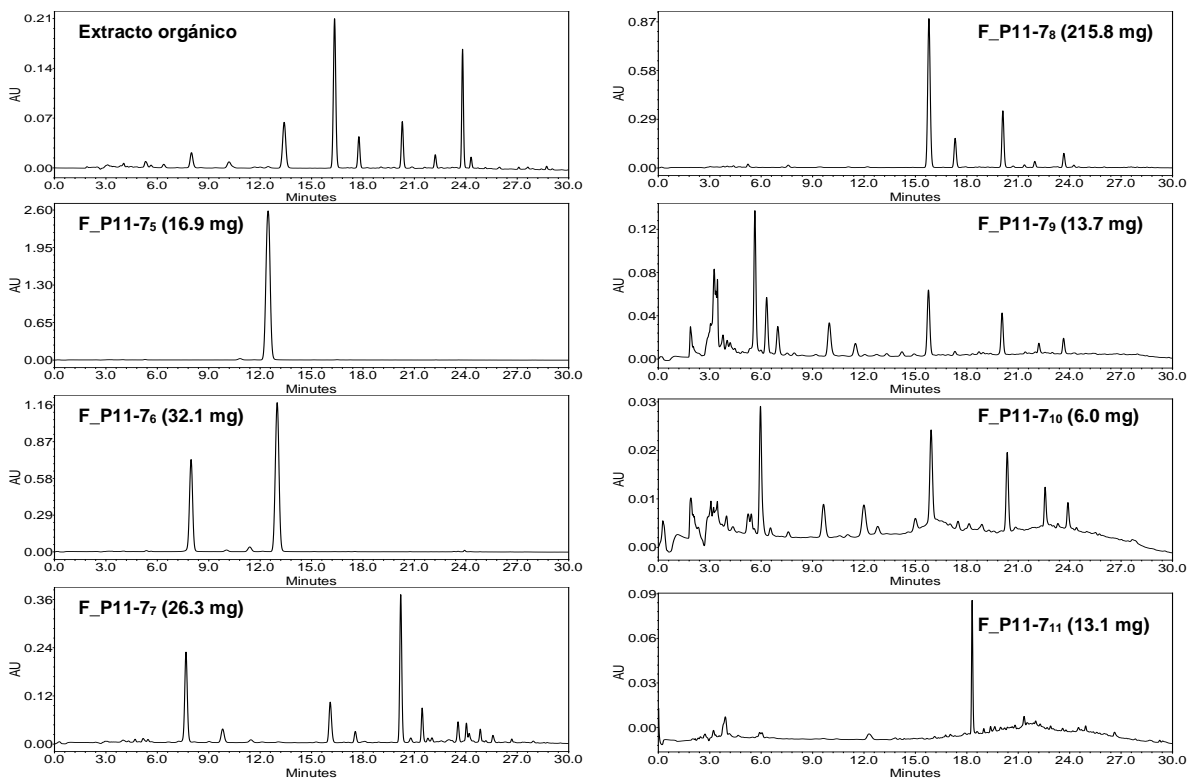


Figura 4. Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico P11-7 ($\lambda=254$ nm).

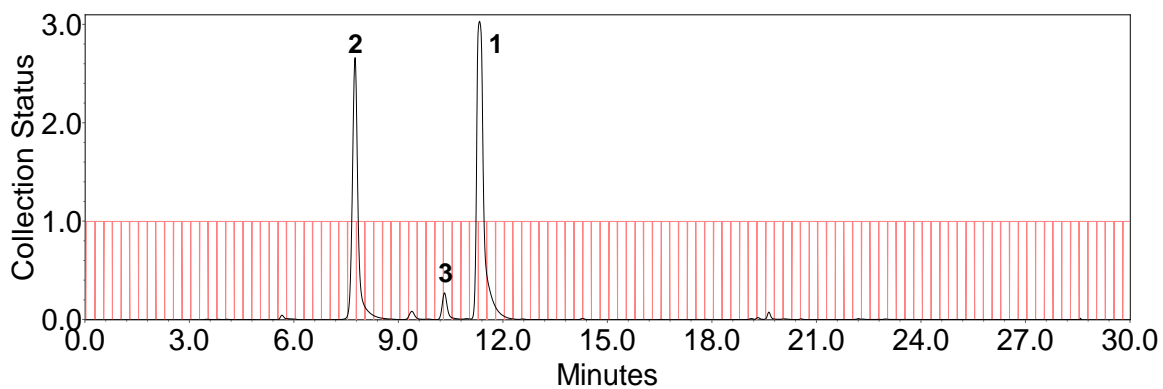


Figura 5. Fraccionamiento secundario de la fracción F_P11-7₆ mediante cromatografía de líquidos a nivel preparativo en fase reversa ($\lambda=254$ nm).

4.8 Fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala de T1-41.

El fraccionamiento primario del extracto orgánico activo **T1-41** (980.5 mg) se llevó a cabo mediante una CCA empacada con 80 g de gel de sílice 60 (tamaño de partícula 10–12 μm , Merck). Como fase móvil se utilizó hexano, mezclas entre hexano– CHCl_3 y MeOH, en orden creciente de polaridad (**Cuadro 4**). Se obtuvieron un total de 40 fracciones primarias, de 80 mL cada una, que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en un conjunto de 10 fracciones primarias (**F_T1-41₁–F_T1-41₁₀**).

Cuadro 4. Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico de T1-41 .		
Sistema de elución	Fracciones	Clave/Peso (mg)
Hex	1-4	F_T1-41 ₁ (2.5)
Hex- CHCl_3 (8:2)	5-8	F_T1-41 ₂ (1.1)
Hex- CHCl_3 (6:4)	9-12	F_T1-41 ₃ (1.1)
Hex- CHCl_3 (4:6)	13-16	F_T1-41 ₄ (7.3)
Hex- CHCl_3 (2:8)	17-20	F_T1-41 ₅ (375.2)
CHCl_3	21-24	F_T1-41 ₆ (8.5)
CHCl_3 -MeOH (9:1)	25-28	F_T1-41 ₇ (431.1)
CHCl_3 -MeOH (9:1)	29-32	F_T1-41 ₈ (82.8)
CHCl_3 -MeOH (8:2)	33-36	F_T1-41 ₉ (0.7)
MeOH	37-40	F_T1-41 ₁₀ (1.1)

4.9 Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios de T1-41.

Con la finalidad de obtener los principios presentes en cada una de las fracciones primarias obtenidas a partir del fraccionamiento preliminar del extracto orgánico **T1-41**, se realizó un análisis cromatográfico de las fracciones primarias (**Cuadro 4**), mediante HPLC y utilizando las mismas condiciones analíticas indicadas en el inciso **4.7 (Figura 6)**.

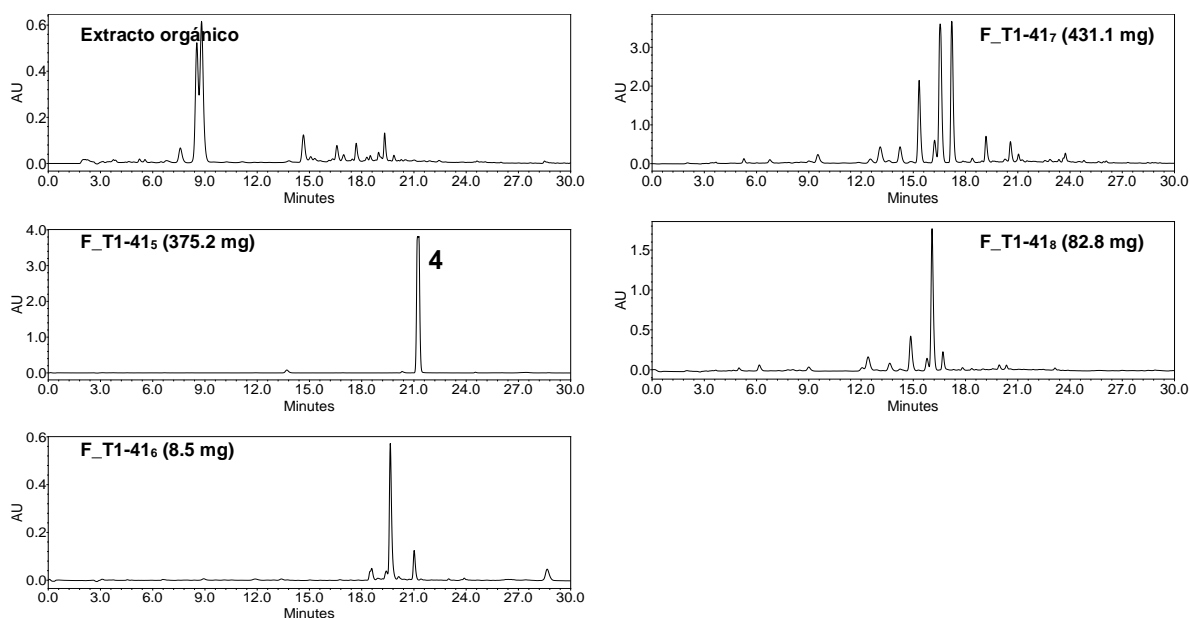


Figura 6. Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico **T1-41** ($\lambda=254$ nm).

En el perfil cromatográfico generado del análisis de la fracción **F_T1-41₅** (375.2 mg) se observa la presencia de un componente mayoritario (**Figura 6**), el cual fue identificado como la preusomerina G (**4**; 328.6 mg; t_R 21 min) mediante el análisis de sus constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas (NMR y MS).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presente investigación se desarrolló como parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de metabolitos secundarios novedosos de origen fúngico, con actividad citotóxica importante. Así, con el desarrollo de esta investigación se pretende realizar el estudio químico y biológico de hongos microscópicos aislados a partir de diversos hábitats inexplorados de nuestro país, y para la realización del mismo, se planteó la estrategia experimental que se resume a continuación:

- 1.- Aislamiento de los organismos fúngicos a partir de hábitats naturales inexplorados.
- 2.- Obtención de los cultivos axénicos y preparación de los extractos orgánicos en pequeña escala de cada uno de los microorganismos aislados. Esto con la finalidad de realizar las evaluaciones preliminares de citotoxicidad y los estudios de derreplicación.
- 3.- Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico de los extractos orgánicos sobre las líneas celulares tumorales humanas de adenocarcinoma colorectal (HTC15), cáncer cérvicouterino (HeLA) y/o MCF7 (cáncer de mama).
- 4.- Realización de los estudios de derreplicación con la finalidad de seleccionar a los candidatos idóneos para la obtención de metabolitos secundarios novedosos y/o no reportados en la base de datos utilizada.
- 5.- Realización del estudio químico de los extractos orgánicos (mediana escala), de dos de las especies más activas, utilizando procesos cromatográficos convencionales.
- 6.- Caracterización de la estructura molecular de los metabolitos secundarios aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

El seguimiento de la estrategia metodológica antes descrita se discutirá en dos partes: la primera abarca el aislamiento de los microorganismos fúngicos a partir de sus hábitats naturales y la evaluación de la citotoxicidad y los estudios de

derreplicación. En la segunda parte, se describen todos los aspectos relacionados con la investigación química de las especies fúngicas activas seleccionadas.

5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos a partir de sus hábitats naturales.

A partir de diversas muestras de plantas, líquenes y de suelo, y utilizando las técnicas descritas con detalle en el inciso **4.1** (sección experimental), se realizaron los aislamientos axénicos de diversos organismos fúngicos de los cuales, 27 pertenecen a la categoría de los endófitos, 8 a la de los endolicogénicos y 72 a la de organismos saprótrofos (**Tabla 1**).

A continuación se realizó la fermentación de todas las especies fúngicas aisladas en pequeña escala. Para este propósito, se prepararon cultivos en sustrato sólido como se indica en el inciso **4.2** de la parte experimental. Una vez transcurrido el período de fermentación, se obtuvieron los extractos orgánicos correspondientes mediante un proceso de maceración (inciso **4.3**). Enseguida, cada extracto fue evaluado para establecer su actividad citotóxica, empleando las líneas celulares de HCT15, HeLA y/o MCF7 de humano, a las concentraciones de prueba de 2 y 20 µg/mL. Los resultados obtenidos en esta evaluación biológica se resumen en la **Tabla 1**.

Posteriormente, se realizaron los estudios de derreplicación utilizando UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, como se indica en el inciso **4.4** y siguiendo el procedimiento desarrollado por El-Elimat *et al.*, 2013 (**Tabla 1**, **Figura 7**). Finalmente, a partir del análisis detallado de los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de citotoxicidad y los estudios de derreplicación, se llevó a cabo la selección de dos especies fúngicas que presentaron la mejor actividad biológica (porcentaje de inhibición del crecimiento celular mayor al 80% a la concentración de 20 µg/mL), y que no contenían a las micotoxinas reportadas en la base de datos utilizada con fines comparativos en los estudios de derreplicación (anexo 1), siendo el hongo

endófito **P11-7** y el hongo saprófito **T1-41** los seleccionados durante esta primera etapa de estudio (**Tabla 1**).

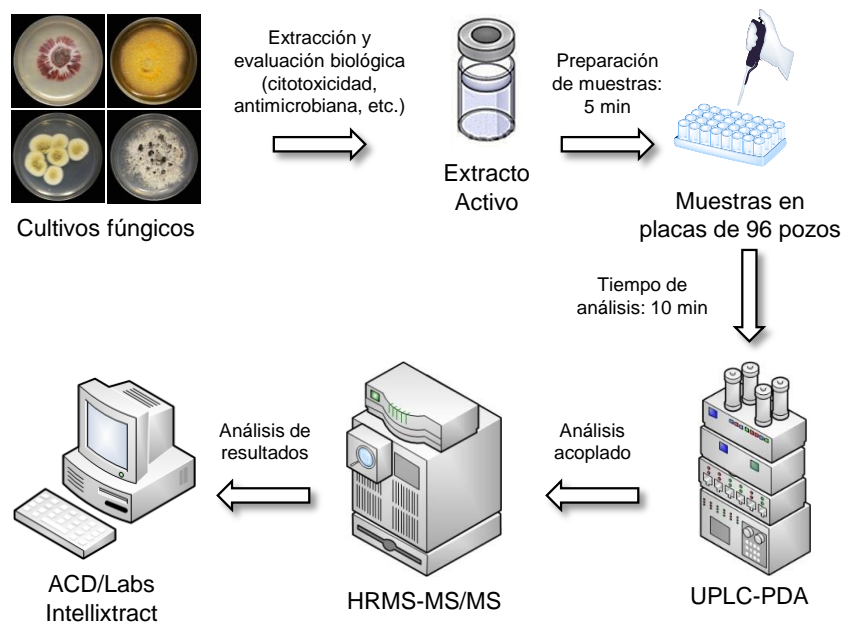


Figura 7. Diagrama de flujo que resume la estrategia metodológica de los estudios de derreplicación de los extractos orgánicos (adaptado de El-Elimat *et al.*, 2013).

La especie endófito **P11-7** se aisló a partir de las hojas de la planta epífita *Tillandsia sp.* (Bromeliaceae) colectada en la reserva ecológica de la UNAM, en tanto que la especie **T1-41**, es una especie saprófita, obtenida a partir de una muestra de suelo recolectada sobre coladas de lava del volcán de San Martín, San Andrés Tuxtla, Veracruz.

Como se desprende de los resultados enlistados en la **Tabla 1** ambas especies son capaces de inhibir el crecimiento celular de HCT15, HeLA y/o MCF7 con un porcentaje de inhibición del 80% a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por otra parte, los estudios de derreplicación realizados indicaron que los metabolitos secundarios presentes en ambos extractos no muestran ninguna similitud con las micotoxinas reportadas en la base de datos especializada, por lo que ambos

extractos son candidatos idóneos para la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades anticancerígenas.

Tabla 1. Resultados de las evaluaciones biológicas y estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados.

Clave	Fuente de obtención	Rendimiento (mg)	Ensayo de citotoxicidad (% inhibición)						Estudio de derreplicación
			HCT15		HeLA		MCF7		
			2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	
<i>ENDÓFITOS</i>									
P7-2	<i>Viscum sp.</i>	66.5	106.1	99.6			111.9	88.5	–
P8-3	<i>Ricinus communis</i>	40.7	123.4	87.3	114.0	71.2			–
P8-9	<i>Ricinus communis</i>	128.8	115.6	106.9	110.2	85.2			–
P8-13	<i>Ricinus communis</i>	86.7	104.1	101.1	106.6	102.8			–
P9-14	<i>Ipomea sp.</i>	37.3	131.9	3.9	82.2	3.7			–
P11-2	<i>Tillandsia sp.</i>	98.5	109.4	108.8	107.9	106.9			–
P11-3	<i>Tillandsia sp.</i>	42.1	108.2	106.8	131.6	121.9			–
P11-6	<i>Tillandsia sp.</i>	85.3	111.0	102.4	116.5	109.9			–
P11-7	<i>Tillandsia sp.</i>	63.2 ^a ; 329.0 ^b	123.4	3.5	120.3	3.7			–
P11-19	<i>Tillandsia sp.</i>	60.6	128.1	121.7	95.3	86.6			–
P12-16	<i>Asclepia sp.</i>	226.2	115.9	108.5	118.4	105.0			Ácido secalónico G
P13-3	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	64.0	113.5	104.4	113.0	103.0			–
P13-8	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	83.8			180.8	170.8	90.1	72.2	–
P21-7	<i>Randia sp.</i>	44.0			189.1	204.9	101.0	94.3	–
P23-19	<i>Asclepia sp.</i>	37.8			163.5	-19.1	81.7	19.0	–
P24-11	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	39.3			197.9	190.3	88.6	63.7	–
P26-16	Helecho	59.6			87.5	103.3	124.0	133.1	–
P29-3	Corteza de árbol	61.5			91.3	101.1	185.0	177.8	–
P29-4	Corteza de árbol	59.5			108.6	118.9	146.6	120.2	–
P29-8	Corteza de árbol	57.7			182.0	146.2	83.4	64.3	–
P30-4	Cáscara de fruto	73.3			72.4	-60.6	79.4	-5.9	–
P30-6	Cáscara de fruto	142.1			111.6	128.8	176.2	103.0	–
P30-8	Cáscara de fruto	64.6			73.0	50.6	157.4	129.4	–
P30-10	Cáscara de fruto	280.0			79.2	-21.0	98.6	63.0	–
P30-15	Cáscara de fruto	139.0			98.7	83.6	100.5	66.5	–
P30-19	Cáscara de fruto	127.0			89.8	21.9	107.1	78.0	–
P30-20	Cáscara de fruto	365.5			194.6	108.6	142.2	115.6	–

^a Pequeña escala; ^b Mediana escala (10×)

Tabla 1. Resultados de las evaluaciones biológicas y estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados (continuación).

Clave	Fuente de obtención	Rendimiento (mg)	Ensayo de citotoxicidad (% inhibición)						Estudio de derreplicación	
			HCT15		HeLA		MCF7			
			2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL		
<i>ENDOLICOGÉNICOS</i>										
L1-4	Liquen	171.7	108.5	3.4	81.1	2.1				Ternatina, Peróxido de ergosterol
L1-7	Liquen	149.4	108.3	103.3	115.6	108.4				-
L1-12	Liquen	97.3	113.5	2.0	106.4	24.8				-
L1-14	Liquen	89.3	100.4	2.0	133.8	4.3				Ácido abscísico
L2-3	Liquen	137.2			126.1	0.6	182.8	29.3		
L2-7	Liquen	165.2			71.3	124.6	78.6	76.5		
L2-11	Liquen	95.2			106.3	109.3	196.9	149.6		
L2-15	Liquen	52.2			151.2	124.8	231.5	183.1		
<i>SAPRÓTROFOS</i>										
T1-1	Suelo	217.5	110.3	57.0			106.55	78.09		Tricodermol
T1-2	Suelo	41.9	-12.8	-12.5			-7.4	-8.4		Roridinas A, D, E y H
T1-3	Suelo	151.1	96.5	92.6			143.3	126.9		-
T1-4	Suelo	196.9	99.0	94.7			79.3	77.3		-
T1-5	Suelo	95.9	2.7	-1.8			-3.4	-6.1		-
T1-6	Suelo	99.4	109.6	94.1			125.6	125.3		-
T1-7	Suelo	194.9	113.4	95.2			81.3	75.2		-
T1-9	Suelo	214.9	96.1	87.2	-	-	8.3	3.1		-
T1-8	Suelo	79.7	3.5	0.8			76.8	61.8		-
T1-10	Suelo	138.7	112.2	119.2			122.6	114.0		-
T1-11	Suelo	131.2	-1.14	-5.34			16.43	22.79		-
T1-12	Suelo	77.4	103.6	108.2			109.5	105.9		-
T1-13	Suelo	229.2	126.8	112.9			113.2	106.0		-
T1-14	Suelo	110.2	116.8	115.2			136.4	116.9		-
T1-15	Suelo	84.8	131.9	105.6			126.7	106.9		-
T1-16	Suelo	80.6	116.5	103.5			123.3	106.3		-
T1-17	Suelo	99.0	135.1	94.27			123.5	110.8		-
T1-18	Suelo	78.2	8.9	2.4			27.3	7.1		-
T1-19	Suelo	93.8	10.6	7.0			23.9	11.1		-

Tabla 1. Resultados de las evaluaciones biológicas y estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados (continuación).

Clave	Fuente de obtención	Rendimiento (mg)	Ensayo de citotoxicidad (% inhibición)						Estudio de derreplicación
			HCT15		HeLA		MCF7		
			2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	
T1-20	Suelo	176.1	53.8	-12.5			51.2	-9.1	-
T1-21	Suelo	36.3	85.0	44.0			66.6	30.7	-
T1-22	Suelo	39.9	115.8	103.8			93.4	89.9	-
T1-23	Suelo	133.0	96.4	93.4			107.1	109.0	-
T1-24	Suelo	72.2	6.36	-0.1			19.2	9.1	-
T1-25	Suelo	83.5	-7.1	-7.2			18.2	16.2	-
T1-26	Suelo	78.0	52.2	48.8			137.4	127.2	-
T1-27	Suelo	178.3	109.7	99.5			123.5	112.0	-
T1-28	Suelo	78.0	4.9	4.2			19.2	16.7	-
T1-29	Suelo	110.1	1.0	-2.7			21.0	12.0	-
T1-30	Suelo	37.5	98.8	90.2			98.7	102.0	-
T1-31	Suelo	29.4	102.6	98.1			95.6	99.2	-
T1-32	Suelo	72.4	60.4	4.0			63.7	10.5	-
T1-36	Suelo	109.3	14.2	5.9			20.7	8.3	Roridina E
T1-37	Suelo	26.7	104.8	83.4			86.7	89.0	-
T1-39	Suelo	82.3	1.4	-0.3			6.8	3.9	-
T1-41	Suelo	206.1 ^a ; 980.5 ^b	105.4	-6.2			70.8	4.3	-
T1-44	Suelo	138.3	98.2	85.4			99.3	80.8	-
T1-46	Suelo	70.0	5.6	0.8			13.2	4.9	-
T1-48	Suelo	85.8	110.2	89.3			78.6	71.6	-
T1-49	Suelo	101.2	13.2	4.1			13.5	4.5	-
T1-50	Suelo	122.9	-1.2	-1.9			-1.3	-4.0	-
T1-52	Suelo	106.1	3.6	-1.5			0.2	-4.2	-
T1-55	Suelo	112.4	65.8	21.1			1.1	3.7	-
T1-56	Suelo	87.5	20.4	8.2			-2.3	-4.9	-
T1-57	Suelo	128.8	20.1	8.2			0.6	-0.9	-
T1-58	Suelo	103.7	131.3	134.8			130.7	119.7	-
T1-60	Suelo	148.5	107.7	23.2			89.6	17.3	-
T1-61	Suelo	66.6	133.9	113.3	78.3	51.2			-
T1-62	Suelo	73.7	102.7	3.8	110.0	3.8			-

^a Pequeña escala; ^b Mediana escala (10×)

Tabla 1. Resultados de las evaluaciones biológicas y estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados (continuación).

Clave	Fuente de obtención	Rendimiento (mg)	Ensayo de citotoxicidad (% inhibición)						Estudio de derreplicación
			HCT15		HeLA		MCF7		
			2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	
T1-63	Suelo	136.2	112.0	106.6	116.5	109.1			–
T1-64	Suelo	78.6	2.5	1.8	60.5	3.0			–
T1-65	Suelo	76.9	2.4	2.4	3.3	2.4			Aurofusarina, Picnidion
T1-66	Suelo	55.9	149.4	126.5	126.2	109.3			–
T1-67	Suelo	57.2	128.7	118.1	136.9	129.6			–
T1-68	Suelo	42.5	128.7	120.7	124.0	116.6			–
T1-69	Suelo	101.5	136.6	112.2	118.5	106.6			–
T1-70	Suelo	50.1	101.8	95.1	128.7	123.3			–
T1-71	Suelo	71.1	101.6	94.7	129.3	114.9			–
T1-72	Suelo	47.2	101.1	94.0	113.8	104.8			2-Hidroxiacoronona, Pestalotina, PC ₃
T1-73	Suelo	70.2	108.7	97.3	105.5	97.4			–
T1-74	Suelo	26.2	91.7	87.5	120.3	107.3			–
T1-75	Suelo	177.0	99.7	94.2	116.3	106.6			–
T1-76	Suelo	115.0	97.8	39.9	115.9	56.8			–
T1-77	Suelo	79.3	2.1	1.9	3.4	1.9			Pestalotina, Peróxido de ergosterol
T1-79	Suelo	149.0	79.2	2.5	100.8	30.0			–
T1-80	Suelo	44.0	95.0	82.6	103.0	100.1			–
T1-81	Suelo	37.8	107.8	89.5	119.2	105.6			–
T1-82	Suelo	39.3	98.7	93.6	116.5	107.2			–
T1-83	Suelo	59.6	1.9	1.1	3.7	2.2			–
T1-84	Suelo	61.5	2.3	2.1	3.4	1.6			–
T1-85	Suelo	59.5	2.5	2.2	10.0	3.2			–
T1-86	Suelo	57.7	121.1	10.0	3.8	2.6			–

5.2 Estudio químico de las especies fúngicas P11-7 y T1-41.

La evaluación de la citotoxicidad y los resultados de los análisis de derreplicación (**Tabla 1**) de todos los extractos orgánicos obtenidos en pequeña escala, utilizando el ensayo descrito en el inciso **4.5**, permitió seleccionar a los extractos de las especies **P11-7** y **T1-41** (**Figura 8**) como candidatos para la obtención de metabolitos bioactivos. Posteriormente, con la finalidad de separar y purificar a los constituyentes presentes en los extractos seleccionados, se realizó el estudio químico de los extractos correspondientes en mediana escala.

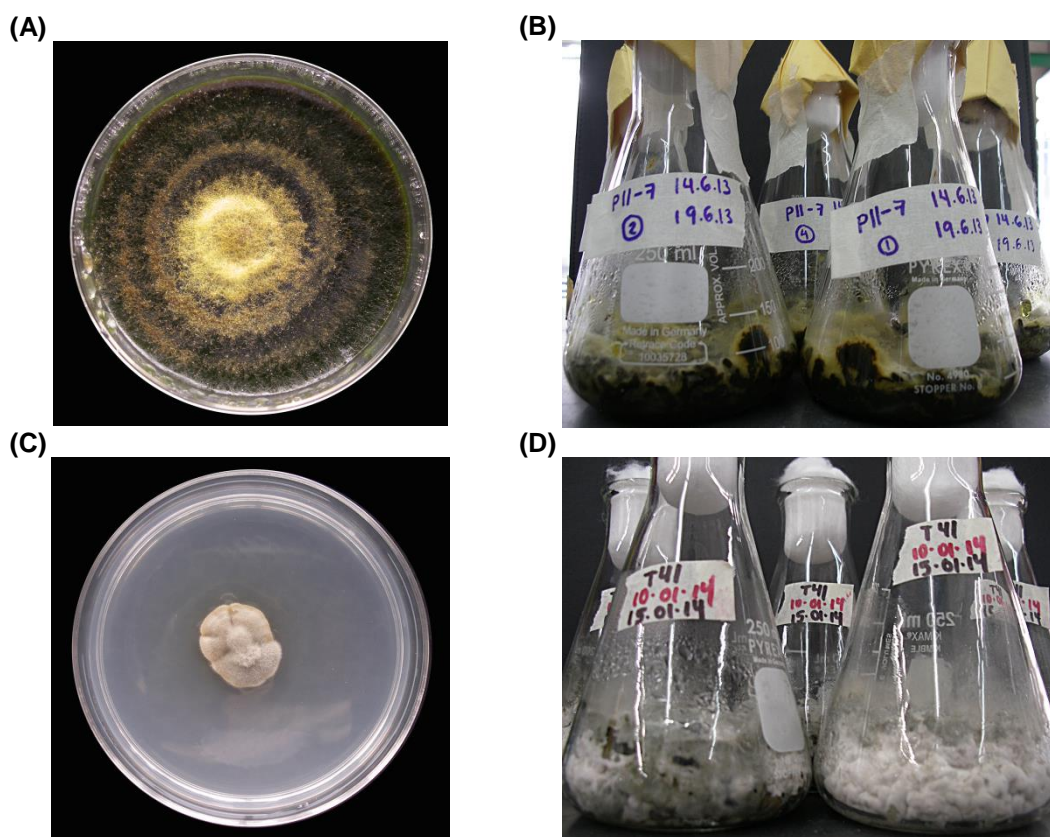


Figura 8. Especies fúngicas **P11-7** [(A) cultivo axénico en medio PDA y (B) cultivo sólido en mediana escala] y **T1-41** [(C) cultivo axénico en medio PDA y (D) cultivo sólido en mediana escala].

5.2.1 Estudio químico de la especie P11-7.

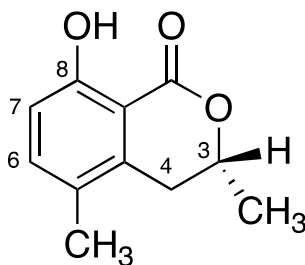
El fraccionamiento primario de 329 mg del extracto orgánico en mediana escala de la especie **P11-7**, mediante una CCA utilizando gel de sílice como fase estacionaria, generó un conjunto de once fracciones primarias. Como se desprende de los análisis cromatográficos realizados por HPLC de cada una de las fracciones primarias obtenidas (**Figura 1**, sección experimental), se seleccionó a la fracción **F_P11-7₆** para la separación de sus componentes individuales debido a que presentó el mejor rendimiento, una baja complejidad y la mejor resolución cromatográfica. El fraccionamiento secundario mediante HPLC preparativo de esta fracción (32.1 mg) condujo al aislamiento de la 5-metilmeleina (**1**), su derivado de aldehído, la 5-formilmeleina (**2**), y a la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (**3**). De manera general, la elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales, y se describe brevemente a continuación.

5.2.1.1 Caracterización de la 5-metilmeleina (**1**).

El producto **1** se aisló como un sólido cristalino amarillo. Los análisis por LC-ESIMS permitieron determinar la fórmula molecular del compuesto como $C_{11}H_{12}O_3$ (m/z 192 uma) la cual permite seis grados de insaturación (**Figura 9**). El análisis detallado de los espectros de UV y NMR (**Tabla 2**; **Figuras 9** y **10**) del compuesto **1** presentaron el perfil característico de una dihidroisocumarina sustituida en las posiciones 3, 5 y 8 del núcleo base (Ballio *et al.*, 1966; Sumarah *et al.*, 2008). Las evidencias más importantes observadas en los espectros de NMR se describen a continuación:

a) En δ_H 7.29 (d, $J = 8.5$ Hz, H-7) y 6.83 (d, $J = 8.5$ Hz, H-6), se observan dos conjuntos de señales asignables a los protones aromáticos del núcleo aromático de la dihidroisocumarina. En el espectro de ^{13}C RMN las señales para este anillo

aparecen en δ_c 143.6 (C-4a), 118.0 (C-5), 138.8 (C-6), 116.6 (C-7), 165.2 (C-8) y 109.2 (C-8a).

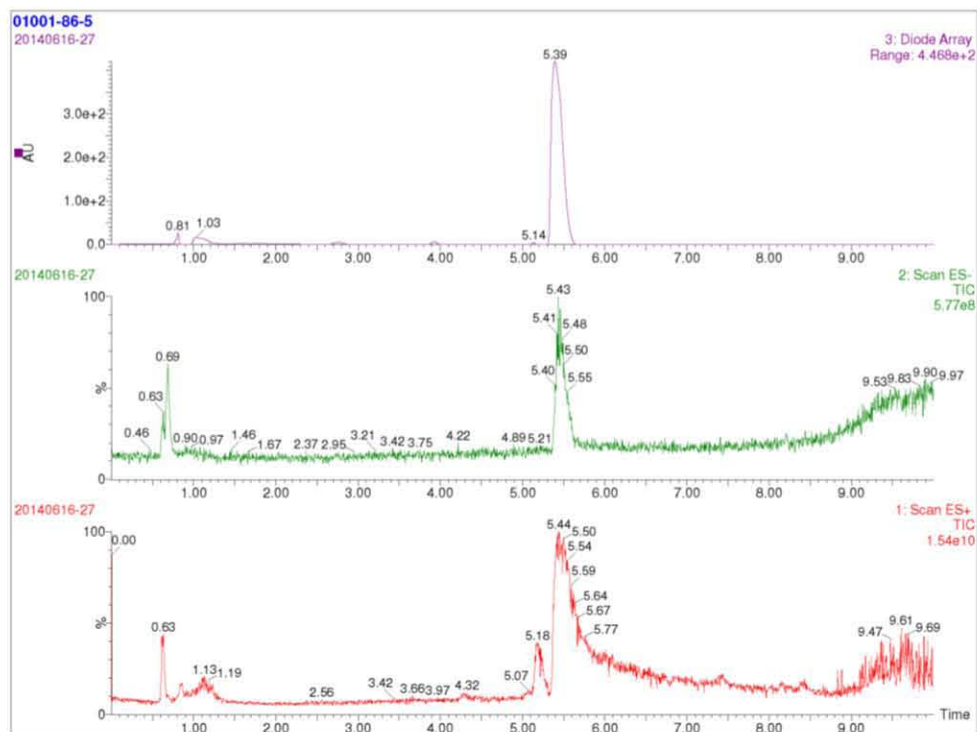


5-metilmelleina (1)

b) En δ_H 4.68 (m) y en δ_H 2.98 (dd, $J = 16.7, 11.4$ Hz) y 2.73 (dd, $J = 16.7, 3.5$ Hz) se observan dos conjuntos de señales diagnósticas con la presencia de un grupo metino y otro metileno, respectivamente. Este conjunto de señales se asignó a los protones H-3 y H-4, respectivamente con base en las correlaciones COSY observadas entre los protones vecinos del grupo metilo ubicado en C-3 (**Figura 11**).

c) Finalmente, en δ_H 2.20 (s) y 1.6 (d, $J = 7.2$ Hz) se aprecian dos señales asignables a dos grupos metilo. También, en δ_H 11.0 (s) se observa un singulete para un protón de un grupo hidroxilo quelatado en la posición C-8.

(A)



(B)

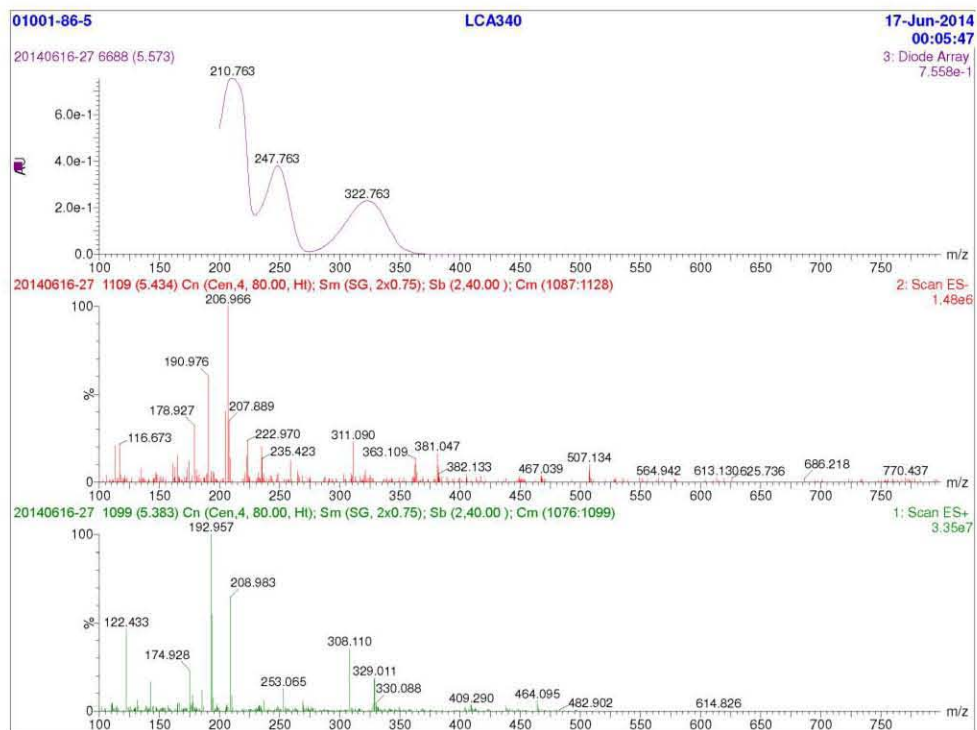


Figura 9. (A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 5-metilmeleina (1).

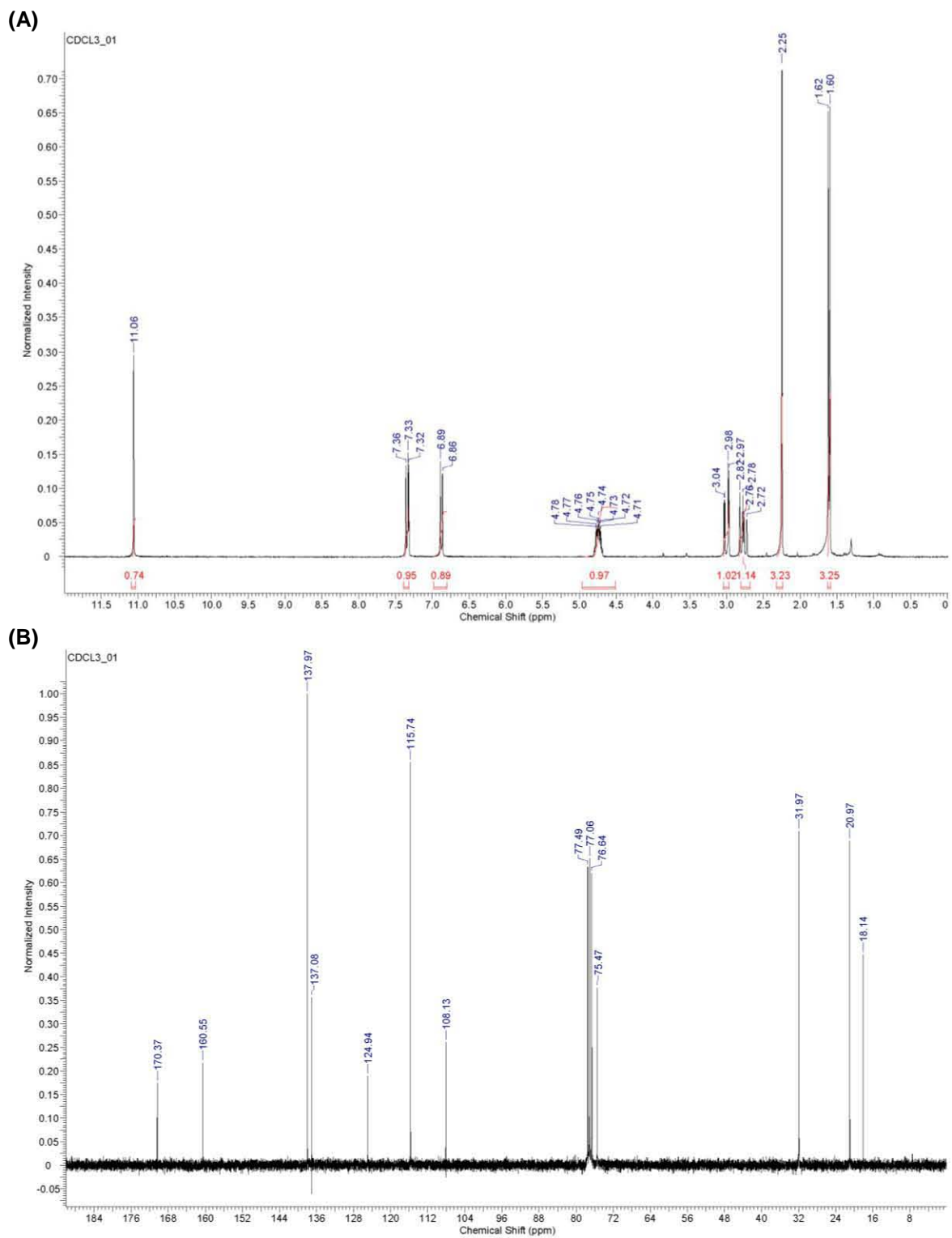


Figura 10. Espectros de (A) ^1H y (B) ^{13}C NMR de la 5-metilmaleina (1).

Tabla 2. Datos espectroscópicos de NMR (^1H , 300 MHz; ^{13}C 75 MHz; δ en ppm; J en Hz) de la 5-metilmeleina (1), 5-formilmeleina (2) y 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3) en CDCl_3 .

Posición	5-metilmeleina (1)		5-formilmeleina (2)		8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3)	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1		170.4		170.2		169.2
3	4.74 (m)	75.5	4.78 (m)	76.1	4.74 (m)	77.1
4	a) 2.74 (dd, $J = 16.7, 11.4$ Hz) b) 3.01 (dd, $J = 16.7, 3.5$ Hz)	32.0	a) 3.08 (dd, $J = 17.7, 11.9$ Hz); b) 3.99 (dd, $J = 17.6, 3.2$ Hz)	37.1	a) 2.70 (dd, $J = 17.7, 11.9$ Hz); b) 3.24 (dd, $J = 17.6, 3.2$ Hz)	33.9
4a		137.1		138.1		131.9
5		125.0		127.1		150.1
6	6.87 (d, $J = 8.5$)	138.0	7.11 (d, $J = 8.8$)	141.1	7.14 (d, $J = 8.8$)	116.9
7	7.34 (d, $J = 8.5$)	115.7	7.98 (d, $J = 8.8$)	115.9	6.93 (d, $J = 8.8$)	117.1
8		160.6		167.1		154.1
8a		108.1		114.2		109.2
CH ₃ -3	1.61 (d, $J = 6.3$ Hz)	18.1	1.64 (d, $J = 6.4$ Hz)	21.1	1.31 (d, $J = 6.4$ Hz)	21.1
CH ₃ -5	2.25 (s)	21.0				
OCH ₃ -5					3.83 (s)	56.3
CHO-5			10.07 (s)	191.0		
OH-8	11.06 (s)		12.00 (s)		10.61 (s)	

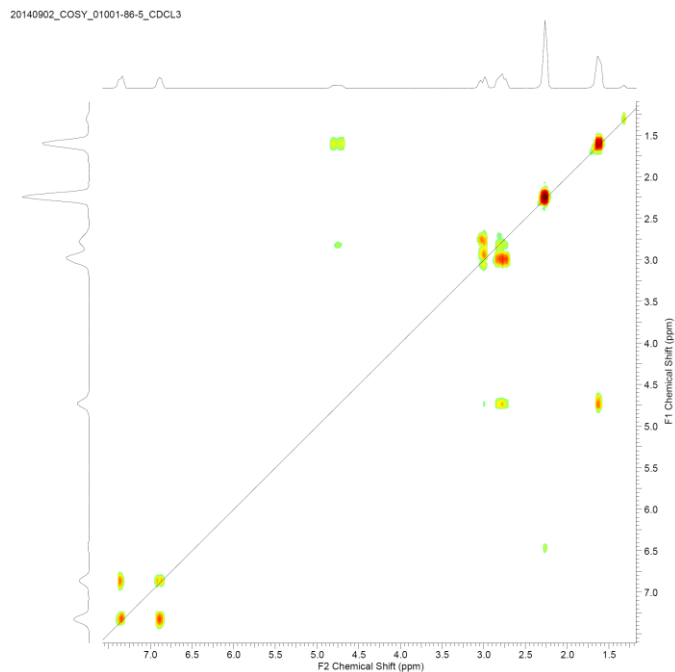


Figura 11. Espectro COSY de la 5-metilmeleina (1).

Este conjunto de señales, aunado con el análisis detallado de los desplazamientos químicos reportados en la literatura para **1**, se encuentran en perfecta armonía, permitiendo establecer y caracterizar a este producto con el nombre trivial de 5-metilmeleina (**1**) (Ballio *et al.*, 1966; Sumarah *et al.*, 2008). Como el valor de rotación óptica registrado experimentalmente ($[\alpha]_D -106$) fue idéntico al descrito en la literatura ($[\alpha]_D -105$), se asumió que la configuración del centro quiral presente en C-3 es *R*.

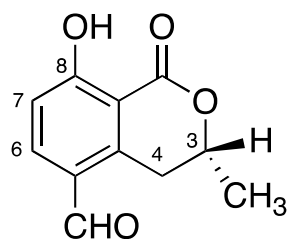
Este producto fue aislado por primera vez del hongo fitopatógeno *Fusicoccum amygdali* (Ballio *et al.*, 1966) y de las especies endófitas pertenecientes a los géneros *Phomopsis* sp y *Picea glauca* (Krohn *et al.*, 1997; Sumarah *et al.*, 2008; Bunyapaiboonsri *et al.*, 2010). Por otra parte, también se ha reportado el aislamiento del compuesto **1** en algunas especies del género *Semecarpus*, plantas endémicas de Sri Lanka (Carpenter *et al.*, 1980), además de algunos cultivos del hongo saprófito *Idriella bambusae* (Krohn *et al.*, 1997). Sin embargo, este es el primer reporte de la presencia del metabolito en especies endófitas pertenecientes al género *Tillandsia*.

Por otra parte, se ha comprobado que la 5-metilmeleina (**1**) presenta propiedades antibacterianas, antimicóticas y citotóxicas importantes (Krohn *et al.*, 1997; Bunyapaiboonsri *et al.*, 2010; Ballia, 1966).

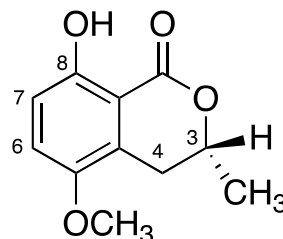
5.2.1.2 Caracterización de la 5-formilmeleina (2) y 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3).

Los iones moleculares observados en los espectros de ESIMS para los productos naturales **2** y **3** corresponden a las fórmulas $C_{11}H_{10}O_4$ y $C_{11}H_{12}O_4$, respectivamente (**Figuras 12 y 13**). El análisis detallado de los espectros de NRM de estos productos permitió establecer que los productos son dos derivados de dihidroisocumarina (Sumarah *et al.*, 2008; **Figura 14**). Los espectros de NMR

(**Tabla 2**) de ambos productos mostraron similitud con los de la 5-metilmeleina (**1**), observándose, en el caso del producto **2**, las siguientes señales:



5-formilmeleina (**2**)



8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-
3,4-dihidroisocumarina (**3**)

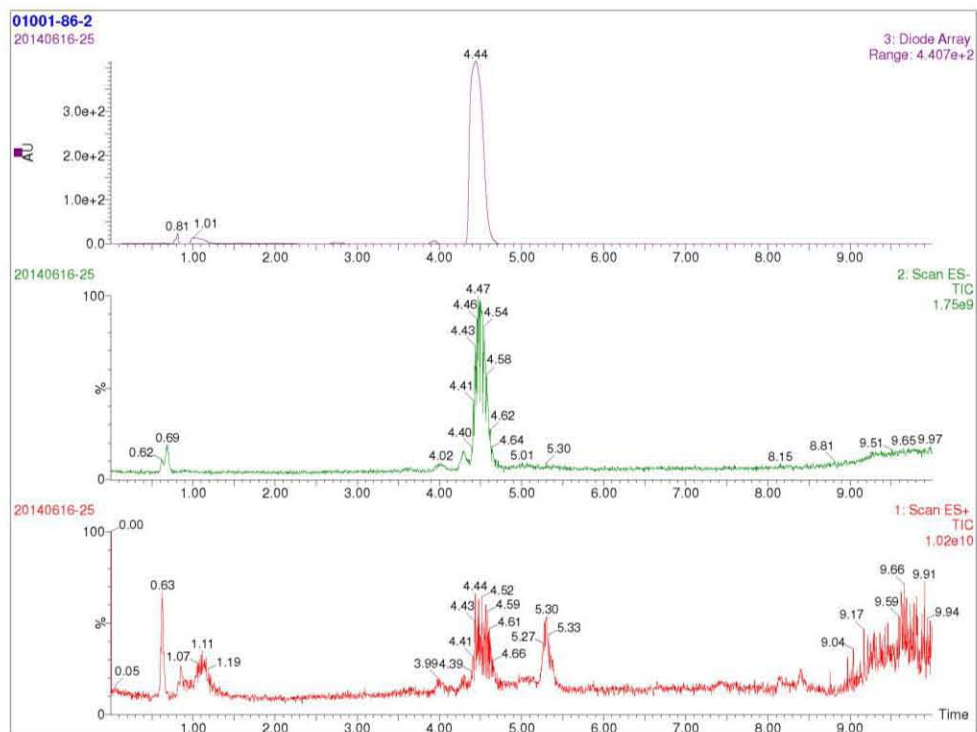
a) En la región aromática del espectro de ^1H NMR en un δ_{H} 7.92 (d, $J = 8.8$ Hz, H-7) y 7.06 (d, $J = 8.8$ Hz, H-6), se observan dos conjuntos de señales asignables a los protones aromáticos del núcleo de la dihidroisocumarina.

b) En la región comprendida en el intervalo δ_{H} 2.2–5 en el espectro de ^1H NMR se aprecian algunas diferencias en los desplazamientos químicos de las señales para H-3 y H-4. Así, la principal diferencia entre los espectros de RMN de los productos **1** y **2** radica en la ausencia de la señal para un singulete (δ_{H} 2.2, CH_3 -5) en **2**. Por lo tanto, los desplazamientos químicos observados en los espectros de ^1H y ^{13}C unidimensionales, comprobaron que el compuesto **2** es el derivado de aldehído en C-5 de **1** y se caracterizó con el nombre trivial de 5-formilmeleina (**2**). Este producto es idéntico al aislado a partir de cultivos de la especie *Nodulisporium* sp. (Sumarah *et al.*, 2008). La configuración en C-3 en este producto se estableció como *R* con base en el valor de rotación óptica ($[\alpha]_{\text{D}} -193$).

Por otra parte, el análisis de los espectros de NMR del producto **3** (**Tabla 2**), permitieron evidenciar que la principal diferencia entre los espectros de **1** y **3** radica en la presencia de un singulete asignable para un grupo metoxilo (δ_{H} 3.8,

OCH₃) en **3** y la ausencia de la señal en 2.20 (s) del grupo metilo observada en el espectro de ¹H RMN de **1**. Este conjunto de evidencias permitieron caracterizar al compuesto **3** como la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (**3**), este producto es idéntico en sus constantes físicas y espectroscópicas al aislado previamente a partir de la especie *Macrolobium bifolium* y éstas se encuentran en perfecta armonía, sin embargo a la fecha, no ha sido reportado su aislamiento a partir de alguna especie fúngica, por lo que este trabajo describe el aislamiento de **3** por primera vez a partir de un hongo endófito (De Alvarenga *et al.*, 1978). Finalmente, la configuración en C-3 en este producto se estableció como *R* con base en el valor de rotación óptica ($[\alpha]_D -60$) y por analogía con los productos **1** y **2**.

(A)



(B)

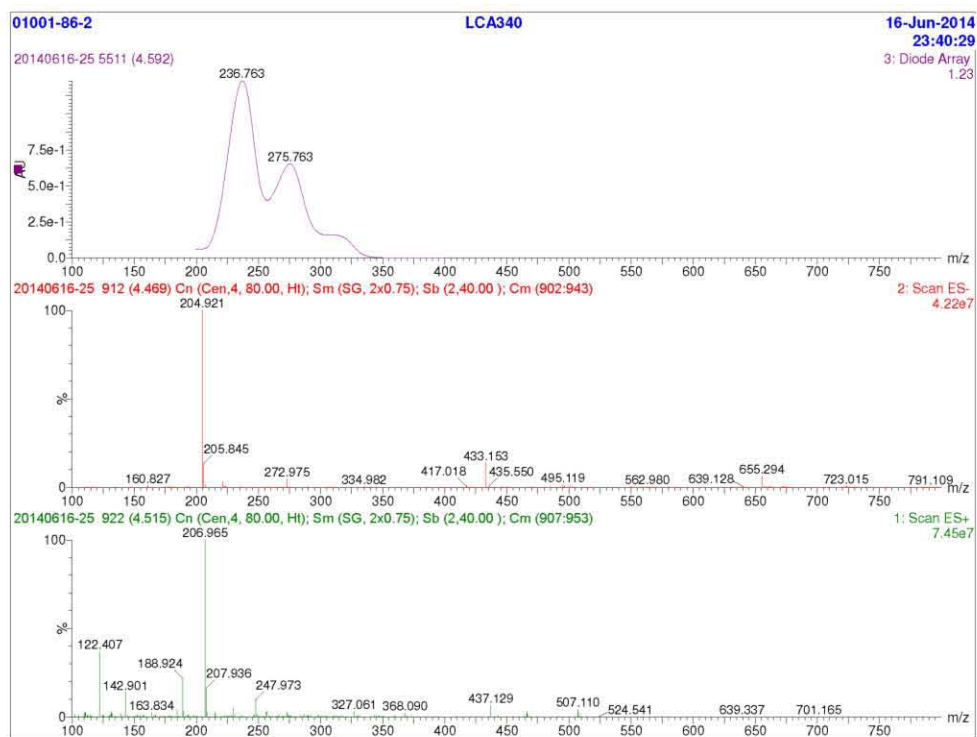
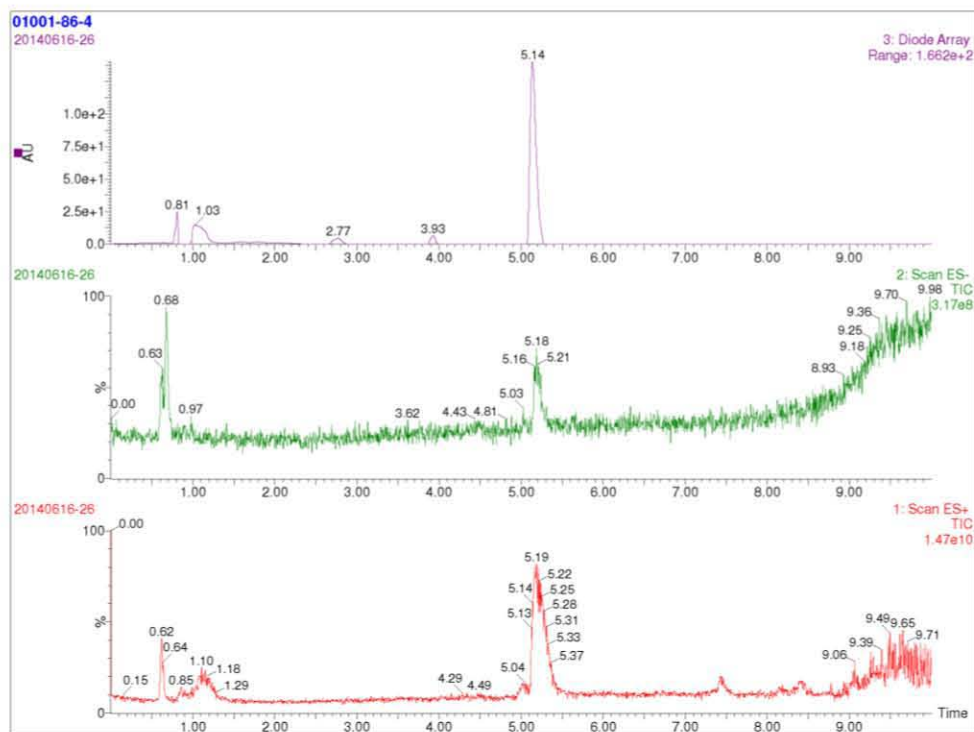


Figura 12. (A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 5-formilmeleina (2).

(A)



(B)

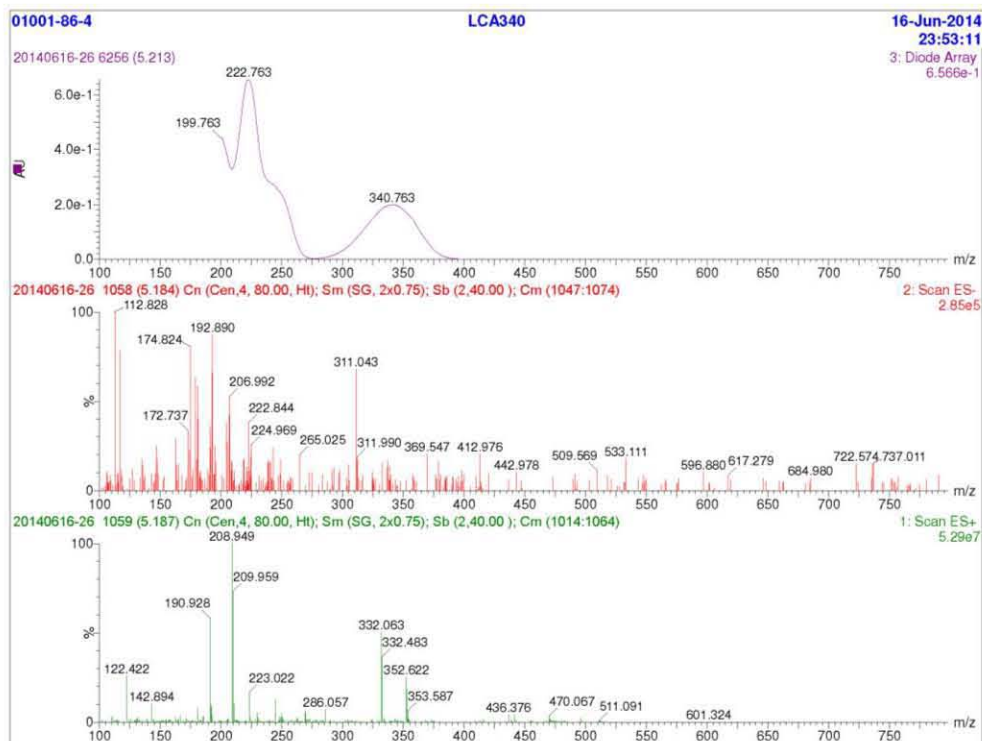


Figura 13. (A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (**3**).

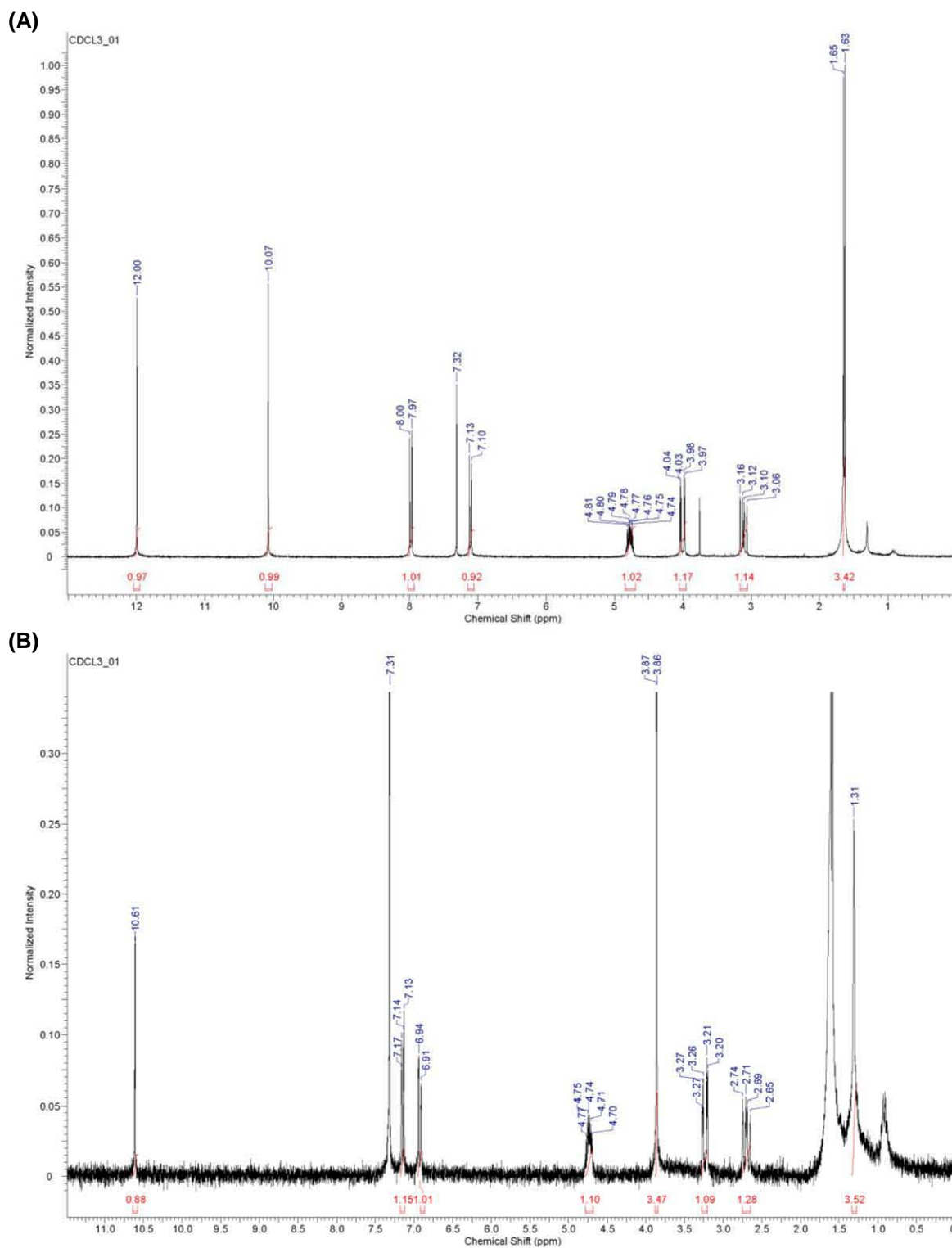


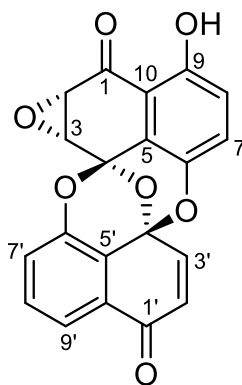
Figura 14. Espectro de ^1H NMR de la (A) 5-formilmeleina (2) y (B) de la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (3).

5.2.2 Estudio químico de la especie T1-41.

El fraccionamiento preliminar de 980 mg del extracto orgánico de **T1-41**, mediante una CCA, permitió la obtención de un conjunto de diez fracciones primarias. Posteriormente, el análisis cromatográfico por HPLC de cada una de las fracciones primarias **Figura 7** (sección experimental), permitió seleccionar a la fracción **F_T1-41₅** como la más adecuada para la obtención del componente mayoritario presente en el extracto orgánico obteniéndose un sólido color naranja (375.2 mg) identificado como la preusomerina G (**4**).

5.2.2.1 Caracterización de la preusomerina G (**4**).

El compuesto **4** se aisló como un sólido naranja con punto de fusión (p.f.) de 224 °C. La ESIMS permitió determinar la fórmula molecular del compuesto como $C_{20}H_{10}O_7$, observándose un ión molecular en m/z 362 uma (**Figura 15**).



preusomerina G (**4**)

Las evidencias más importantes observadas en los espectros de NMR (**Tabla 3** y **Figura 16**) se describen a continuación:

a) En la región aromática del espectro de 1H RMN en δ_H 7.68 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz, H-9'), 7.47 (dd, $J = 8.0, 8.4$ Hz, H-8') y 7.07 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz, H-7') y en δ_H 7.07

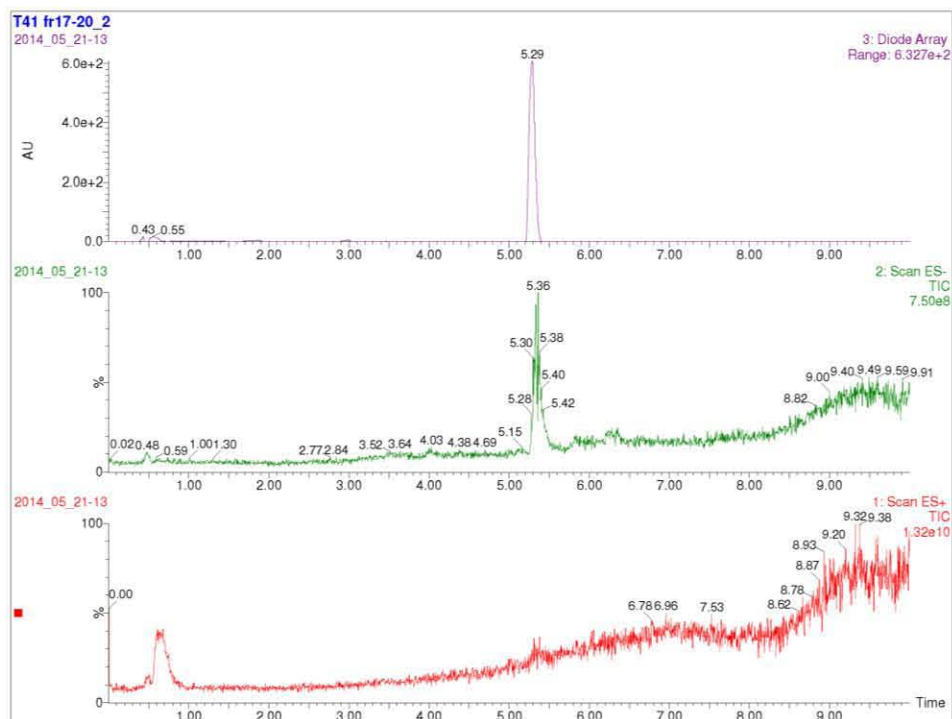
(d, $J = 9.4$ Hz, H-7) y 6.99 (d, $J = 9.2$ Hz, H-8), se observan dos conjuntos de señales asignables a un sistema ABX y otro AB, respectivamente, para cinco protones aromáticos.

b) En δ_H 7.27 (d, $J = 10.0$ Hz) y 6.64 (dd, $J = 10.0$ Hz) se observan un grupo de señales adicionales atribuibles a dos protones vinílicos.

c) Finalmente, en δ_H 3.89 (d, $J = 4.0$ Hz) y 4.28 (d, $J = 4.0$ Hz), se observan un grupo de señales adicionales asignadas a dos metinos de una función epóxido. Además de la señal para un grupo hidroxilo quelatado en δ_H 10.2 (s).

Este análisis detallado de los espectros de NMR del producto **4** permitieron corroborar que este compuesto pertenece a la familia de las preusomerinas, compuestos estrechamente relacionados con diversas categorías de compuestos como son: las deoxipreusomerinas, palmarumicinas, diepoxinas, y otros derivados de espirocetales con núcleo 1,8-naftalendiol; y fue caracterizado como la preusomerina G (**4**), mediante la comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con aquellos reportados en la literatura (Singh *et al.*, 1994; Barrett *et al.*, 2002; Weerapreeyakul *et al.*, 2007).

(A)



(B)

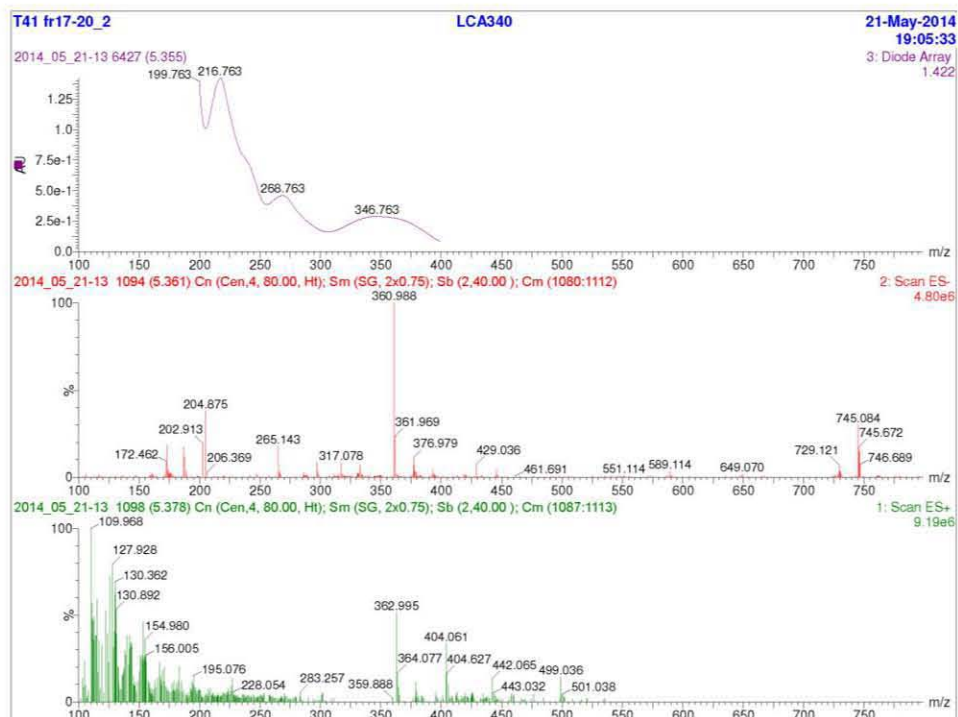


Figura 15. (A) Cromatogramas en el UV (arriba) y de masas (-)-ESI (centro) y (+)-ESI; **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la preusomerina G (4).

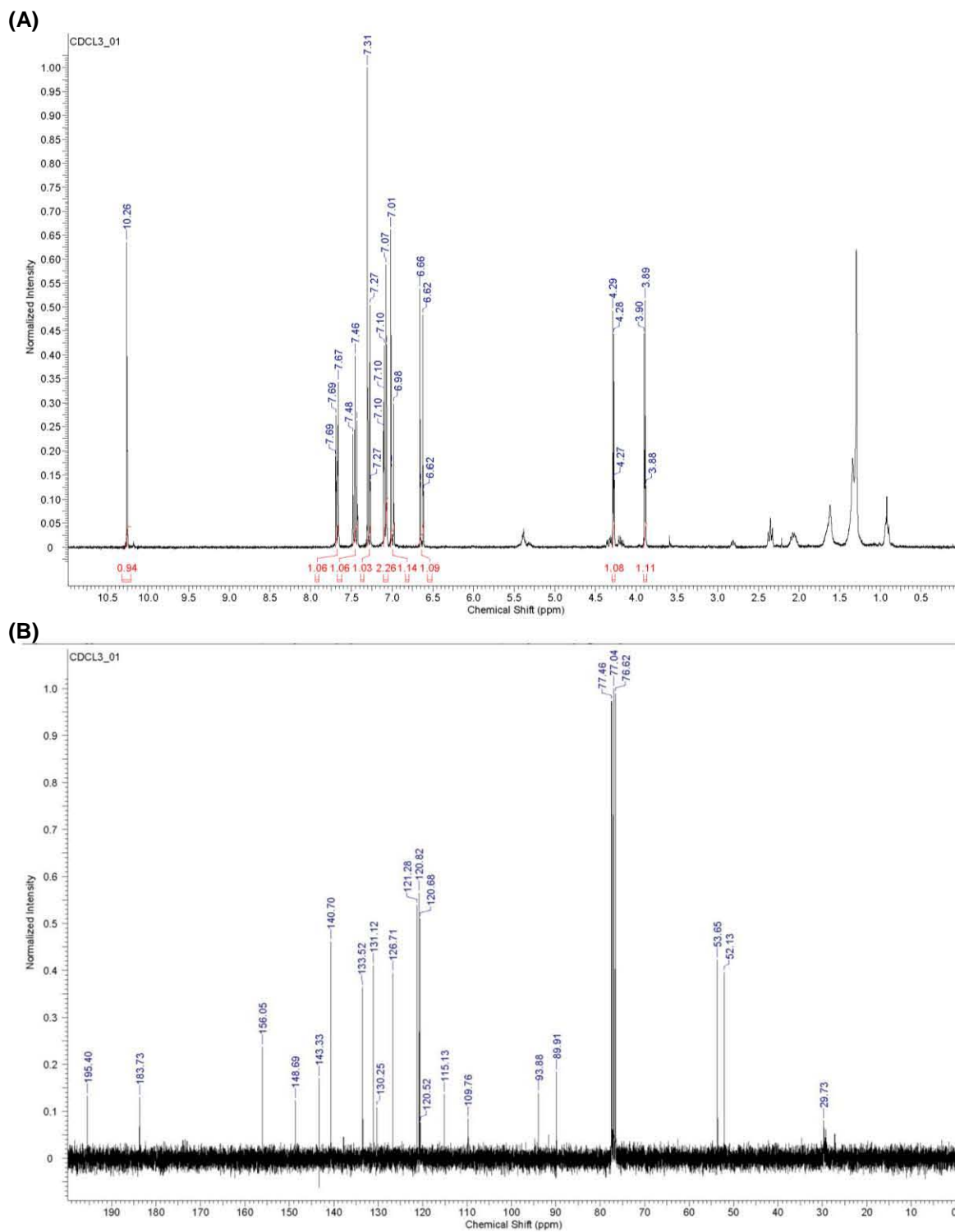


Figura 16. Espectros de (A) ^1H y (B) ^{13}C NMR de la preusomerina G (4).

Tabla 3. Datos espectroscópicos de NMR (^1H , 300 MHz; ^{13}C 75 MHz; δ en ppm; J en Hz) de la preusomerina G (**4**) en CDCl_3 .

Posición	δ_{H}	δ_{C}
1		195.4
2	3.89 (d, $J = 4.0$ Hz)	53.7
3	4.28 (d, $J = 4.0$ Hz)	52.1
4		93.9
5		109.8
6		143.3
7	7.07 (d, $J = 9.4$ Hz)	126.7
8	6.99 (d, $J = 9.2$ Hz)	121.3
9		156.1
10		115.1
OH-9	10.2 (s)	
1'		183.7
2'	6.64 (d, $J = 10.0$ Hz)	133.5
3'	7.27 (d, $J = 10.0$ Hz)	140.7
4'		89.9
5'		120.6
6'		148.7
7'	7.07 (dd, $J = 8.4, 1.2$ Hz)	120.8
8'	7.47 (dd, $J = 8.0, 8.4$ Hz)	131.1
9'	7.68 (dd, $J = 7.8, 1.2$ Hz)	120.7
10'		130.3

Las preusomerinas son productos naturales que se forman a partir de dos unidades de decalinas insaturadas unidas por tres puentes de oxígeno a través de dos carbonos espirocetales (Singh *et al.*, 1994). De estos metabolitos las preusomerinas (**A–F**) fueron la primer serie de este tipo de compuestos con actividad antifúngica reportados en la literatura, y fueron aisladas del hongo coprófilo *Preussia isomera* (Weber y Gloer, 1991). También la preusomerina D aislada de la especie endófito *Harmonema dematioides* ha sido reportada por sus propiedades antibacterianas significativas (Polishook *et al.*, 1993). Otra serie de preusomerinas (**G–I**) aisladas a partir de otra especie coprófila poseen propiedades citotóxicas (Singh *et al.*, 1994), debido a su acción inhibitoria sobre la proteína farnesil transferasa de Ras, la cual es una enzima heterodimérica que cataliza la transferencia del grupo farnesil del pirofosfato de farnesilo a la cisteína 186 del péptido Ras, durante la etapa previa al proceso de post-traducción y de la unión del péptido Ras a la membrana plasmática para realizar la activación del oncogén Ras e iniciar el proceso de proliferación celular. Cabe destacar, que este

tipo de inhibición representa un blanco de acción novedoso y específico para el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales de particular interés para el tratamiento del cáncer de colon y de páncreas, principales órganos blanco que presentan diversas mutaciones sobre el gen Ras (Singh *et al.*, 1994).

6. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento axénico de numerosas especies fúngicas endófitas, endolicogénicas y saprótrofas, a partir de fuentes inexploradas de nuestro país.
- La evaluación biológica de los extractos orgánicos preparados a partir de los diferentes aislamientos, utilizando como monitoreo de la actividad biológica el ensayo de citotoxicidad contra tres líneas cancerígenas humanas, permitió la selección de numerosas especies fúngicas para el descubrimiento de moléculas bioactivas.
- Los estudios de metabolómica realizados, con la finalidad de explorar el contenido metabólico de las diferentes especies cultivadas de manera preliminar, permitió realizar la selección de aquellas especies fúngicas no productoras de micotoxinas, y que constituyen una fuente potencial de productos novedosos.
- El fraccionamiento del extracto total obtenido a partir de la especie endófitas **P11-7** permitió el aislamiento y la caracterización de tres derivados de dihidroisocumarinas, incluyendo un producto natural reportado por primera vez para una especie endófitas, caracterizado como la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina (**3**).
- El fraccionamiento del extracto total obtenido a partir de la especie saprófita **T1-41** permitió el aislamiento y la caracterización de la preusomerina G (**4**), reportada como un inhibidor de la proteína farnesil transferasa de Ras, que constituye un blanco molecular eficaz en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, particularmente de colon y páncreas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, G.P., Weiner, L.M. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nature Biotechnology*, **2005**, 23, 1147-1157.
- Afroz, A.M., Naik, P.K. Molecular modelling evaluation of the cytotoxic activity of podophyllotoxin analogues. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, **2009**, 23, 209-225.
- Anthony, D.A., Kaye, S.B. Drug resistance. The clinical perspective. En *Cytotoxic Drug Resistance Mechanisms*. Editado por Brown, R., Böger, Bronw, U. Methods in Molecular Medicine. New Jersey. **1999**, 1-11.
- Ballio, A., Barcellona, S., Santurbano, B. 5-methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin. *Tetrahedron Letters*, **1966**, 31, 3723-3726.
- Barrett, A.G.M., Blaney, F., Campbell, A.D., Hamprecht, D., Meyer, T., White, A.J.P., Witty, D., Williams, D.J. Unified Route to the Palmarumycin and Preussomerin Natural Products. Enantioselective Synthesis of (-)-Preussomerin G. *The Journal of Organic Chemistry*, **2002**, 67, 2735-2750.
- Bérdy, J. Bioactive Microbial Metabolites: A Personal View. *The Journal of Antibiotics*, **2005**, 58, 1-26.
- Bérdy, J. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, **2012**, 65, 385-395.
- Blackwell, M. The Fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *American Journal of Botany*, **2011**, 98, 426-38.
- Blackwell, M., Hibbett, D.S., Taylor, J.W., Spatafora, J.W. Research Coordination Networks: a phylogeny for kingdom Fungi (Deep Hypha). *Mycologia*, **2006**, 98, 829-837.
- Broxterman, H.J., Lankelman, J., Hoekman, K. Resistance to cytotoxic and anti-angiogenic anticancer agents: similarities and differences. *Drug Resistance Updates*, **2003**, 6, 111-127.
- Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Srikitikulchai, P., Srichomthong, K., Lumyong, S. Oblongolides from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789. *Journal of Natural Products*, **2010**, 73, 55-59.

- Carpenter, R.C., Sotheeswaran, S., Sultanbawa, M.U.S. (-)-5-methylmellein and catechol derivatives from four *Semecarpus* species. *Phytochemistry*, **1980**, *19*, 445-447.
- Cole, S.P.C., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M.V., Deeley, R.G. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **1992**, *258*, 1650-1654.
- Damia, G., Garattini, S. The pharmacological point of view of resistance to therapy in tumors. *Cancer Treatment Reviews*, **2014**, *40*, 909-916.
- De Alvarenga, M.A., Braz, F.R., Gottlieb, O.R., Dias, J.P.P., Magalhães, E.G., Magalhães, G.C., Magalhães, M.T., Maia, J.G.S., Marques, R., Marsaioli, A.J., Mesquita, A.A.L., Moraes, A.A., Oliveira, A.B., Oliveira, G.G., Pedreira, G., Pereira, S.A., Pinho, S.L.V., Sant´ana, A.E.G., Santos, C.C. Dihydroisocoumarins and phthalide from Wood samples infested by fungi. *Phytochemistry*, **1978**, *17*, 511-516.
- Dictionary of Natural Products 20.1. Taylor & Francis Group. **2012**.
- Eissa, S., Khalifa, A., el-Gharib, A., Salah, N., Mohamed, N.K. Multivariate analysis of DNA ploidy, p53, c-erbB-2 proteins, EGFR, and steroid hormone receptors for prediction of poor short term prognosis in breast cancer. *Anticancer Research*, **1997**, *17*, 1417-1423.
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B.M., Cech, N.B., Pearce, C.J., Oberlies, N.H. High-Resolution MS, MS/MS, and UV Database of Fungal Secondary Metabolites as a Dereplication Protocol for Bioactive Natural Products. *Journal of Natural Products*, **2013**, *73*, 1709-1716.
- Feng, X., Siegel, M.M. FTICR-MS applications for the structure determination of natural products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2007**, *389*, 1341-1363.
- Figueroa-González, G., Efecto de los oligosacáridos de las convolvuláceas sobre la modulación de la glicoproteína P en células de mamíferos resistentes a fármacos antitumorales. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM. **2013**.

- Gloer, J.B. Applications of fungal ecology in the search for new bioactive natural products. En *The Mycota*. Vol. IV. Editado por Wicklow D.T., Soderstrom, B.E. Environmental and Microbial Relationship. New York. **1997**, 249-268.
- Goldstein, L.J., Galski, H., Fojo, A., Willingham, M., Lai, S.L., Gazdar, A., Pirker, R., Green, A., Crist, W., Brodeur, G.M., Lieber, M., Cossman, J., Gottesman, M.M., Pastan, I. Expression of multidrug resistance gene in human cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **1989**, *81*, 116-124.
- Gottesman M.M. Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual Review of Medicine*, **2002**, *53*, 615-627.
- Grant, C.E., Valdimarsson, G., Hipfner, D.R., Almquist, K.C., Cole, S.P.C., Dudley, R.G., Overexpression of multidrug resistance-associated protein (MRP) increases resistance to natural products drugs. *Cancer Research*, **1994**, *54*, 357-361.
- Green, J.A., Robertson, L.J., Clark, A.H. Glutathione-S-transferase expression in benign and malignant ovarian tumours. *British Journal of Cancer*, **1993**, *68*, 235-239.
- Hamada, S., Kamada, M., Furumoto, H., Hirao, T., Aono, T. Expression of glutathione S-transferase pi in human ovarian cancer as an indicator of resistance to chemotherapy. *Gynecologic Oncology*, **1994**, *52*, 313-319.
- Hawksworth, D.L., Rossman, A.Y. Where Are All the Undescribed Fungi? *Phytopathology*, **1997**, *87*, 888-891.
- Hawksworth, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*, **1991**, *95*, 641-655.
- Hawksworth, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*, **2001**, *105*, 1422-1431.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten H.L., Lutzonig, F., Matheny, P.B, Mclaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C.C., Hawksworth, D.L.; Hestmark, G.,

Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.C., Mozley, S.S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schübler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G. Tibell, L., Untereiner, M.W., Walker, C., Wang, Z., Weir, A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.J., Zhang, N.. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, **2007**, *111*, 509-547.

- Hoffmeister, D., Keller, N.P. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, **2007**, *24*, 393-416.

- International Agency for Research on Cancer. *GLOBOCAN 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012*. 2012. http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, Consultado el 22 de agosto de 2014.

- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. *Estadísticas a propósito de... día mundial contra el cáncer (4 de febrero)*. **2014**. <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>, Consultado el 22 de agosto de 2014.

- Izquierdo, M.A., van der Zee, A.G.J., Vermorker, J.B., van der Valk, P., Belien, J.A.M., Giaccone, G., Scheffer, G.L., Flens, M.J., Pinedo, H.M., Kenemans, P., Meijer, C.J.L.M., de Vries, E.G.E., Scheper, R.J. Drug resistance-associated marker Lrp for prediction of response to chemotherapy and prognoses in advanced ovarian carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **1997**, *87*, 1230-1237.

- James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A. Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M. Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schübler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K. Standridge, S.M. Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber, R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A,

Kohlmeyer, J., Volkmann, K.B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lücking, R., Büdel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Spatafora, J.W., Vilgalys, R. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature*, **2006**, *443*, 818-822.

- Johansen, K.T., Wubshet, S.G., Nyberg, N.T. HPLC–NMR Revisited: Using Time-Slice High-Performance Liquid Chromatography–Solid-Phase Extraction–Nuclear Magnetic Resonance with Database-Assisted Dereplication. *Analytical Chemistry*, **2013**, *85*, 3183-3189.
- Kartner, N., Riordan, J.R., Ling, V. Cell surface-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science*, **1983**, *221*, 1285-1288.
- Katzung, B.G., Farmacología básica y clínica, 8^a ed., Ed. El Manual Moderno, México, 2002, pp. 1035-1056.
- Keller, N.P., Turner, G., Bennett, J.W. Fungal secondary metabolism: from biochemistry to genomics. *Nature Reviews. Microbiology*, **2005**, *3*, 937-947.
- Kreitman, R.J., Pastan, I. Immunotoxins for targeted cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **1998**, *31*, 53-88.
- Krohn, K., Bahramsari, R., Flörke, U., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry*, **1997**, *45*, 313-320.
- Lacombe, L., Dalbagni, G., Zhang, Z., Cardon-Cordo, C., Fair, W.R., Herr, H.W., Reuter, V.E. Overexpression of p53 protein in a high risk population of patients with superficial bladder cancer before and after bacillus Calmette-Guerin therapy: correlation to clinical outcome. *Journal Clinical of Oncology*, **1996**, *14*, 2626-2652.
- Lang, G., Mayhudin, N.A., Mitova, M.I., Sun, L., Sar, S., Blunt, J.W., Cole, A.L.J., Ellis, G., Laatsch, H., Munro, M.H.G. Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts: New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts. *Journal of Natural Products*, **2008**, *71*, 1595-1599.

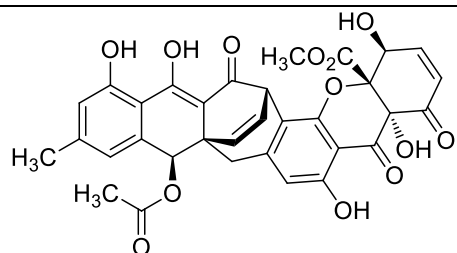
- McGregor, D. Carcinogenicity. En *Fundamental Toxicology for Chemists*. Editado por Duffus, J.H., Worth, G.J. The Royal Society of Chemistry. UK. **1996**, 90-99.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, **2007**, 70, 461-477.
- Newman, D.J., Cragg, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, **2012**, 75, 311-335.
- Nielsen, K.F., Månsson, M., Rank, C., Frisvad, J.C., Larsen, T.O. Dereplication of Microbial Natural Products by LC-DAD-TOFMS. *Journal of Natural Products*, **2011**, 74, 2338-2348.
- Ng, J. S. Vinflunine: review of a new vinca alkaloid and its potential role in oncology. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, **2011**, 17, 209-224.
- Raistrick, H. A region of biosynthesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **1950**, 136, 481-508.
- Organización Mundial de la Salud. *Cáncer*. **2014**. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>, Consultado el 22 de agosto de 2014.
- Pai, V.B., Nahata, M.C. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. *Drug Safety*, **2000**, 22, 263-302.
- Pelaez, F. Biological activities of fungal metabolites. En *Handbook of Industrial Mycology*. Editado por An, Z. Marcel Dekker. New York. **2005**, 49-92.
- Polishook, J.D., Dombrowski, A.W., Tsou, N.N., Salituro, G.M., Curotto, J.E. Preussomerin D from the endophyte *Hormonema Dematioides*. *Mycologia*, **1993**, 85, 62-64.
- Scheper, R.J., Broxterman, H.J., Scheffer, G.L. Overexpression of a M(r) 110,000 vesicular protein in non-P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Research*, **1995**, 53, 1475-1479.
- Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Rommert, A.K., Krohn, K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, **2002**, 106, 996-1004.

- Secretaría de Salud (SSA), Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud (SPPS). *Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos*. **2013**. <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>, Consultado el 22 de agosto de 2014.
- 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., Pelaez, F., Cascales, C., Gibbs, J.B., Lingham, R.B. Preussomerins and Deoxypreussomerins: Novel Inhibitors of Ras Farnesyl-Protein Transferase. *The Journal of Organic Chemistry*, **1994**, *59*, 6296-6302.
- Singla, A. K., Garg, A., Aggarwal, D. Paclitaxel and its formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, **2002**, *235*, 179-192.
- Sumarah, M.W., Puniani, E., Blackwell, B.A., Miller, J.D. Characterization of Polyketide Metabolites from Foliar Endophytes of *Picea glauca*. *Journal of Natural Products*, **2008**, *71*, 1393-1398.
- Vichai, V., Kirtikara, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, **2006**, *1*, 1112-1116.
- Weber, H.A., Gloer, J.B. The Preussomerins: Novel Antifungal Metabolites from the Coprophilous Fungus *Preussia isomera* Cain. *The Journal Organic Chemistry*, **1991**, *56*, 4355-4360.
- Weerapreeyakul, N. Anorach, R., Khuansawad, T. Yenjai, C., Isaka, M. Synthesis of Bioreductive Esters from Fungal Compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2007**, *55*, 930-935.
- Yang, J., Liang, Q., Wang, M., Jeffries, C., Smithson, D., Tu, Y., Boulos, N., Jacob, M.R., Shelat, A.A., Wu, Y., Ravu, R.R., Gilbertson, R., Avery, M.A., Khan, I.A., Walker, L.A., Guy, R.K., Li, X.C. UPLC-MS-ELSD-PDA as a Powerful Dereplication Tool to Facilitate Compound Identification from Small-Molecule Natural Product Libraries. *Journal of Natural Products*, **2014**, *77*, 902-909.
- Zee, A.G.J., Hollema, H., Suurmeijer, A.J.H., Krans, M., Sluiter, W.J., Willemse, P.H.B., Aadlers, J.G., de Vries, E.G.E. Value of P-glycoprotein, glutathione S-transferase ppi, c-erbB-2, and p53 as prognostic factors in ovarian carcinomas. *Journal of Clinical Oncology*, **1995**, *13*, 70-78.

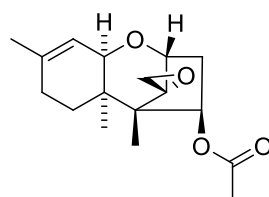
- Zhang, T., Omar, R., Siheri, W., Al-Mutairi, S., Clements, C., Fearnley, J., Edrada-Ebel, R., Watson, D. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterisation and dereplication of African propolis. *Talanta*, **2014**, *120*, 181-190.

8. ANEXO 1

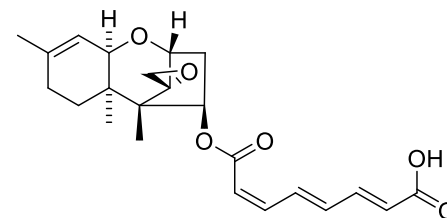
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos.



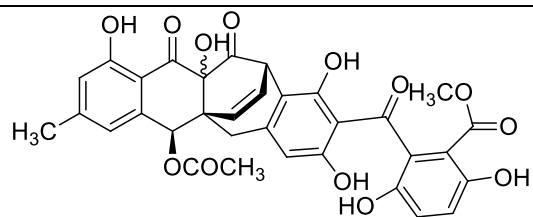
Acremoxantona D



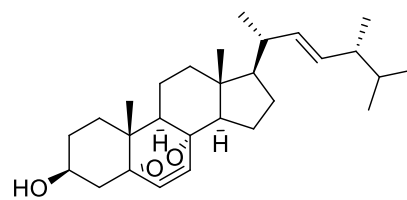
Tricodermina



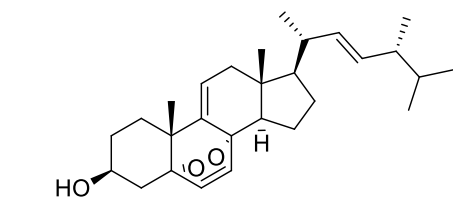
Harzianumina A



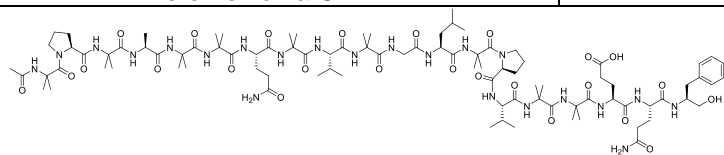
Acremonidina C



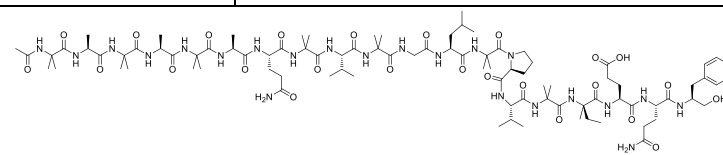
Peróxido de ergosterol



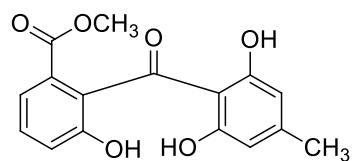
5,8-Epidioxiergosta-6,9(11),22-trien-3-ol



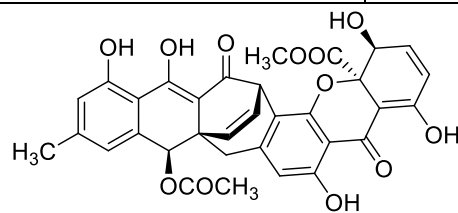
Alamecicina II



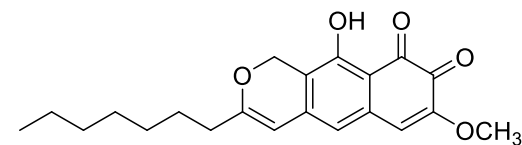
Longibrancina III



Monilifenona

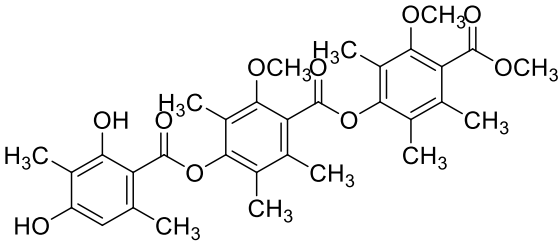
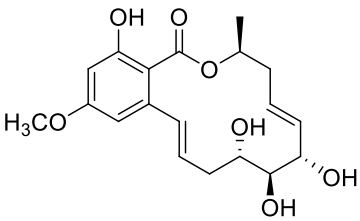
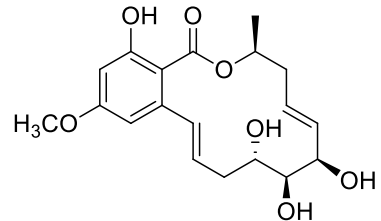
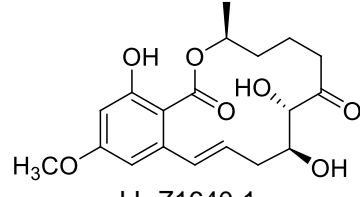
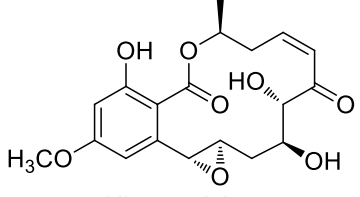
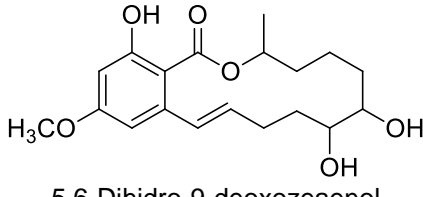
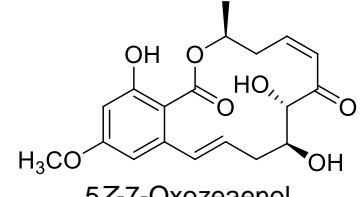
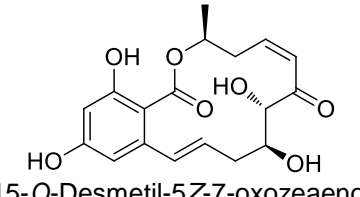
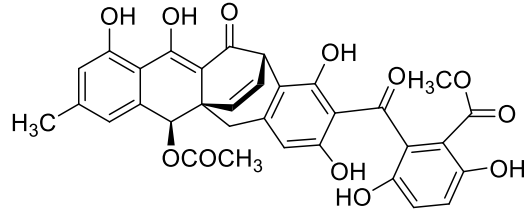
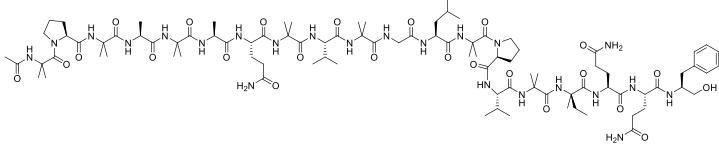
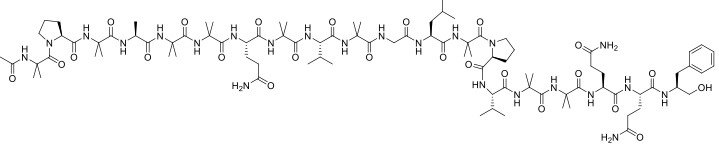


Acremoxantona C

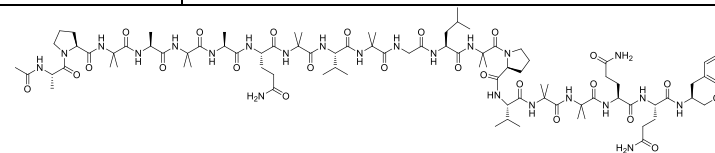
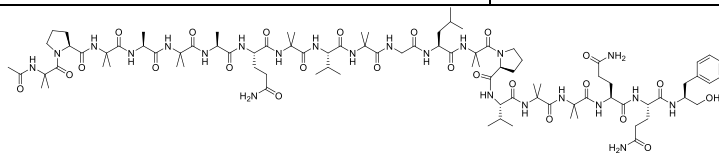
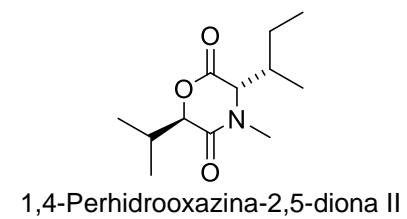
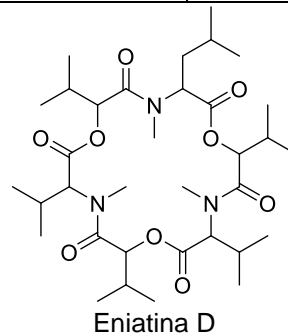
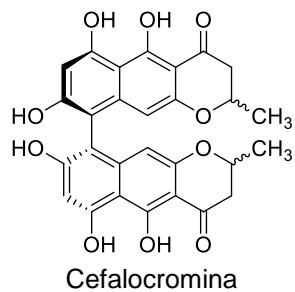
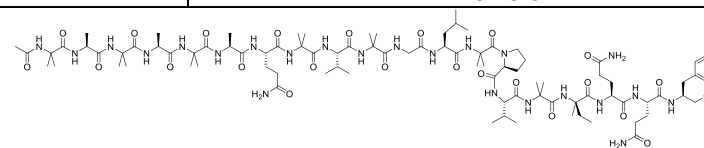
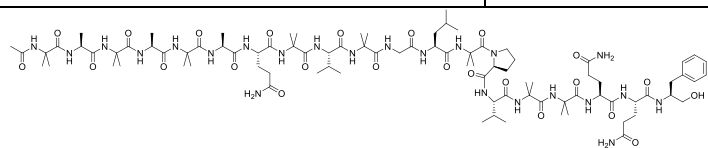
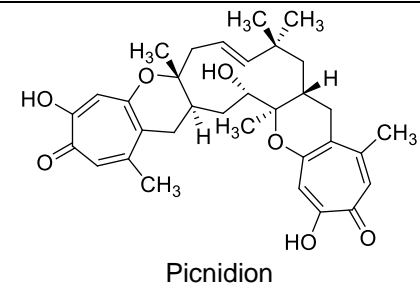
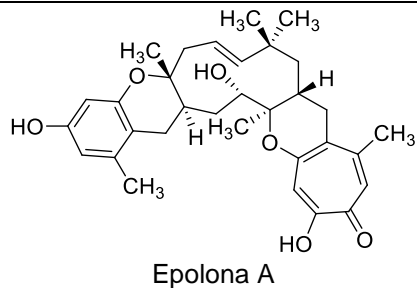
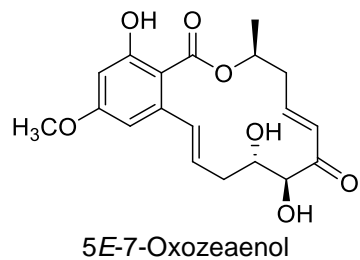


Obionina B

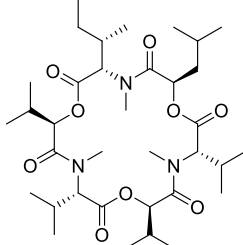
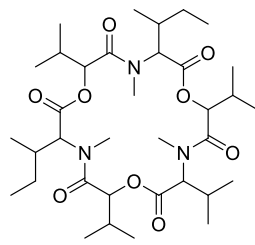
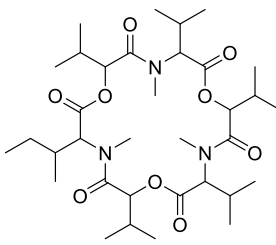
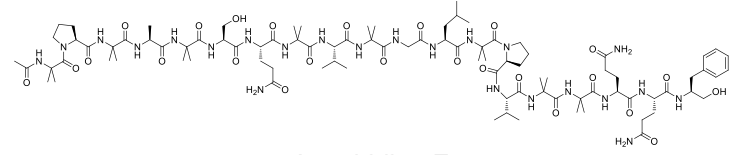
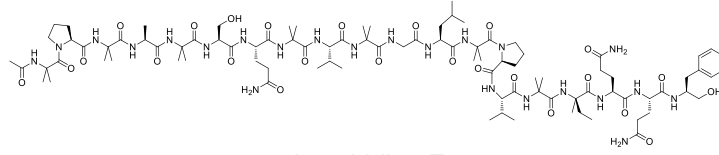
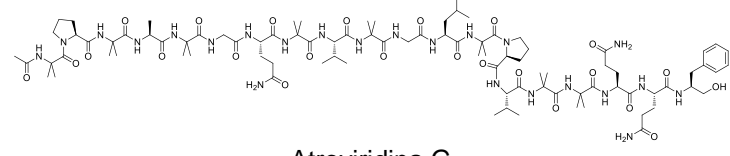
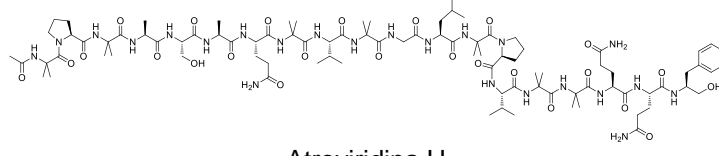
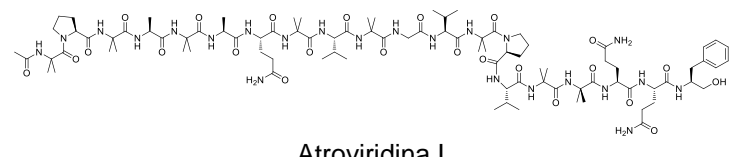
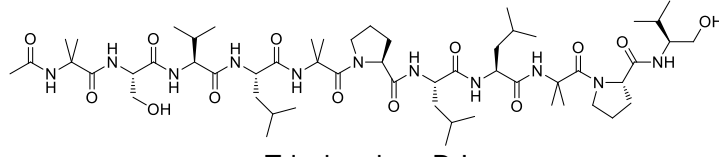
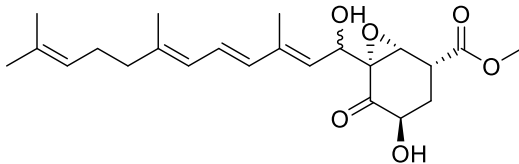
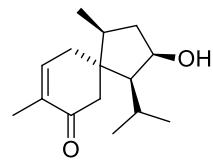
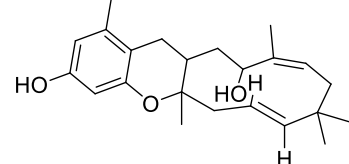
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>Tielavina Q</p>	 <p>Zeaenol</p>	 <p>7-<i>epi</i>-Zeaenol</p>
 <p>LL-Z1640-1</p>	 <p>Hipotemicina</p>	 <p>5,6-Dihidro-9-deoxozeaenol</p>
 <p>5Z-7-Oxozeaenol</p>	 <p>15-O-Desmetil-5Z-7-oxozeaenol</p>	 <p>Acremonidina A</p>
 <p>Atroviridina B</p>	 <p>Polisporina B</p>	

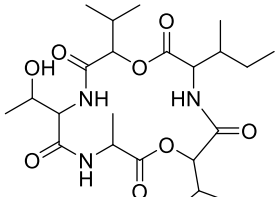
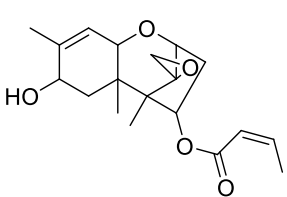
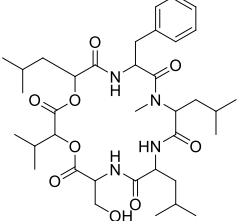
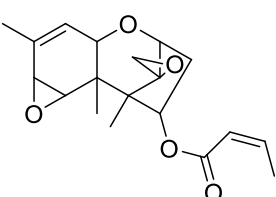
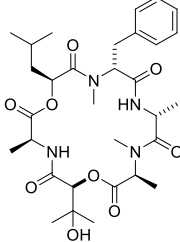
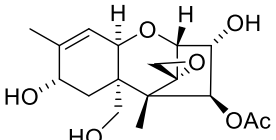
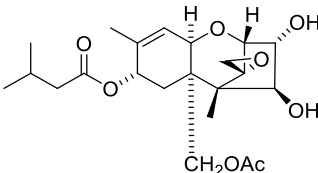
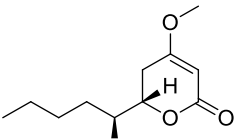
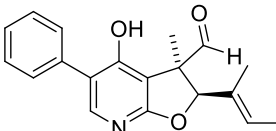
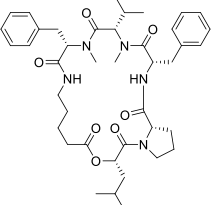
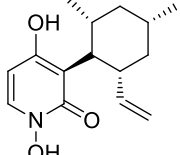
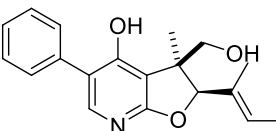
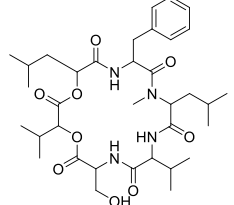
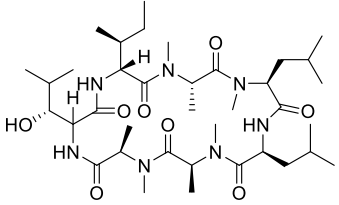
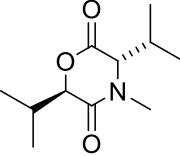
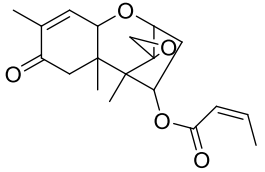
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).



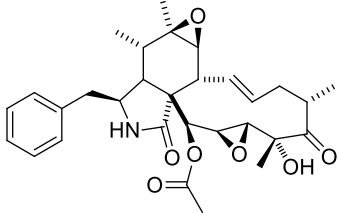
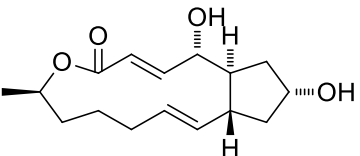
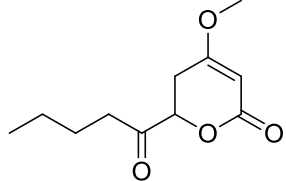
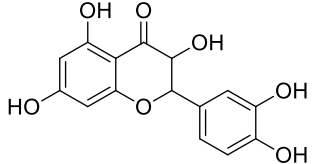
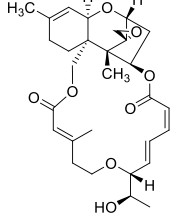
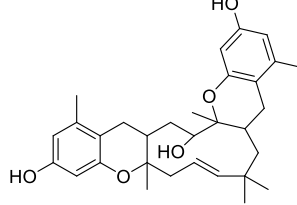
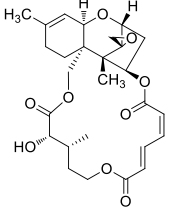
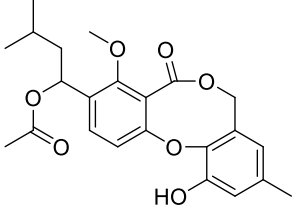
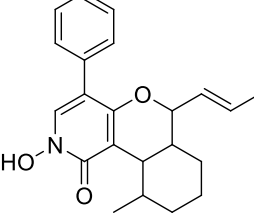
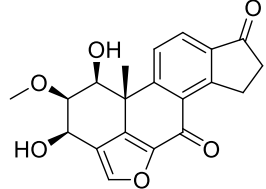
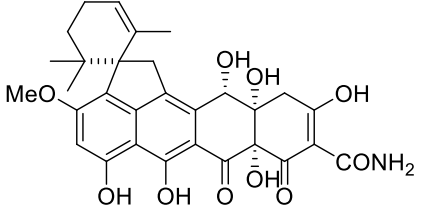
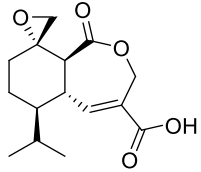
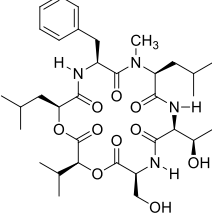
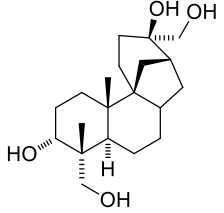
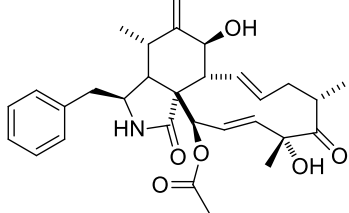
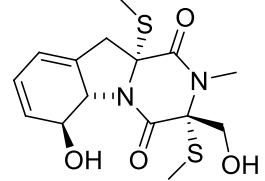
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>Eniatina E1</p>	 <p>Eniatina I</p>	 <p>Eniatina B1</p>
 <p>Atroviridina E</p>	 <p>Atroviridina F</p>	
 <p>Atroviridina G</p>	 <p>Atroviridina H</p>	
 <p>Atroviridina I</p>	 <p>Tricobracinas D-I</p>	
 <p>Tricospirona A</p>	 <p>2-Hidroxiacoronona</p>	 <p>Puginina A</p>

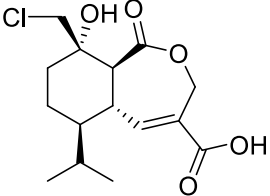
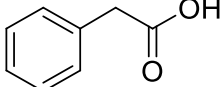
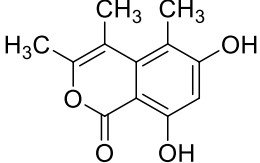
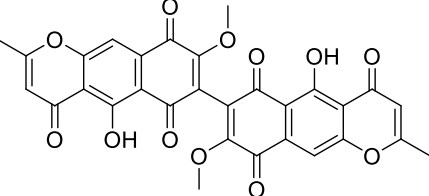
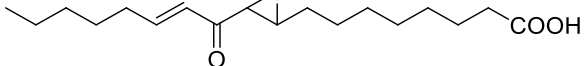
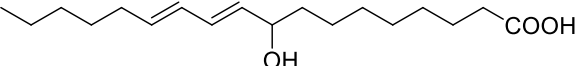
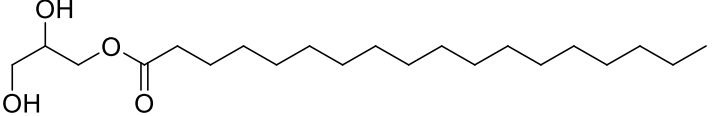
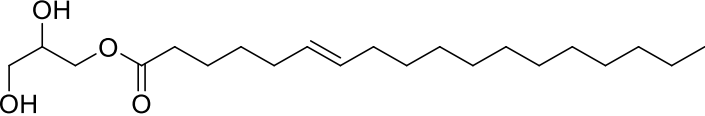
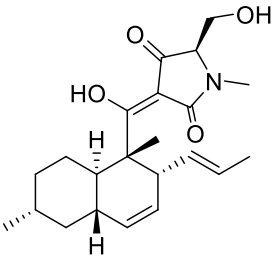
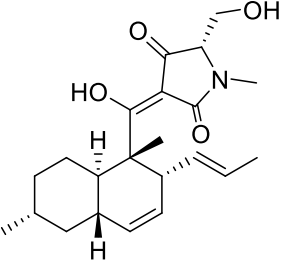
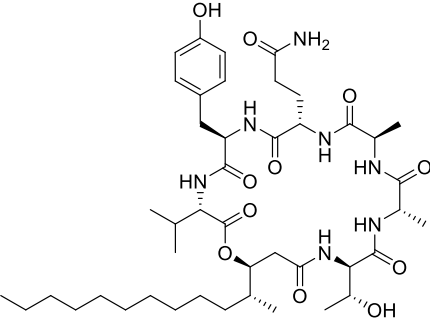
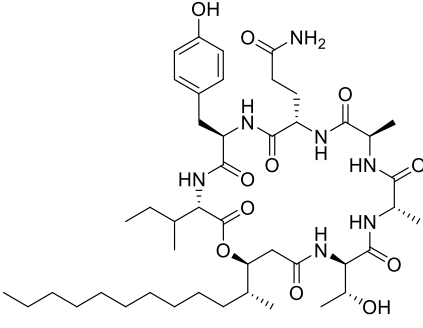
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>Roseotoxina S</p>	 <p>Tricotecinol B</p>	 <p>Tricodepsipéptido A</p>	 <p>Crotocina</p>
 <p>Guangomida A</p>	 <p>Neosolanol</p>	 <p>Toxina HT-2</p>	 <p>Pestalotina</p>
 <p>CJ-15,696</p>	 <p>T987A</p>	 <p>Piridoxatina</p>	 <p>CJ-16,169</p>
 <p>Tricodepsipéptido B</p>	 <p>Ternatina</p>	 <p>1,4-Perhidrooxazina-2,5-diona I</p>	 <p>Tricotecina</p>

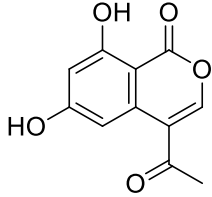
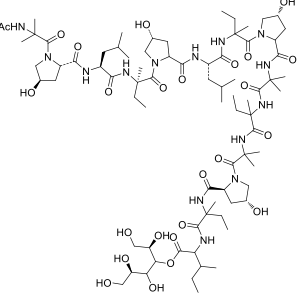
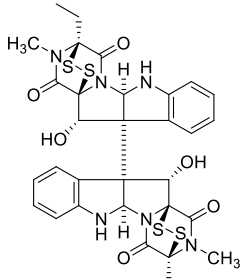
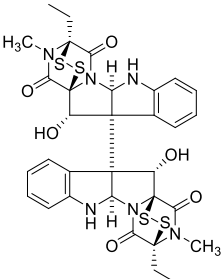
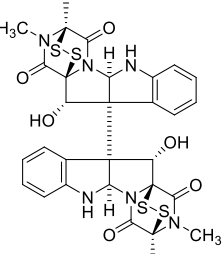
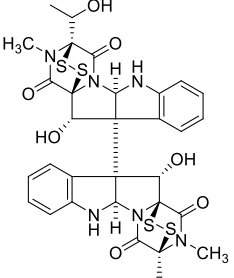
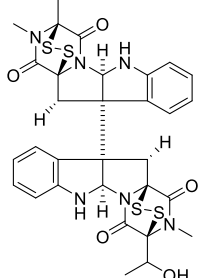
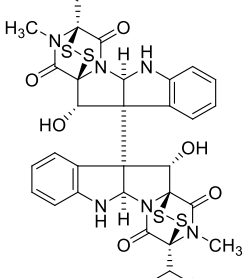
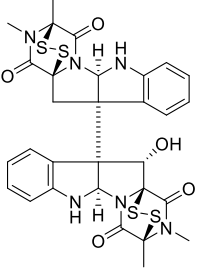
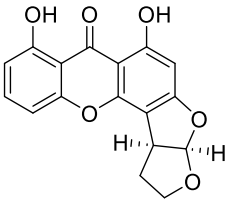
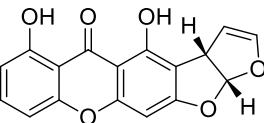
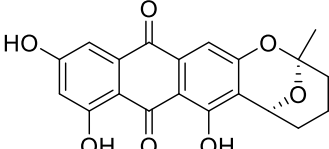
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>19,20-epoxicalasina Q</p>	 <p>Brefeldina A</p>	 <p>PC₃</p>	 <p>Dihidroquercetina</p>
 <p>Roridina E</p>	 <p>Ramiferina</p>	 <p>Verrucarina A</p>	 <p>Purpactina A</p>
 <p>Leporina B</p>	 <p>Viridiol</p>	 <p>Viridicatumtoxina</p>	 <p>Ácido heptelídico</p>
 <p>Hirsutatina A</p>	 <p>Afidicolina</p>	 <p>Citocalasina D</p>	 <p>Bisdetiobis(metilto) gliotoxina</p>

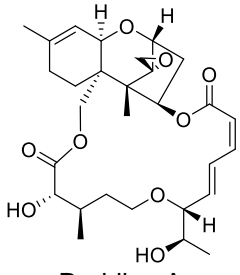
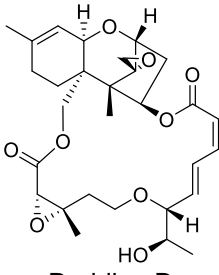
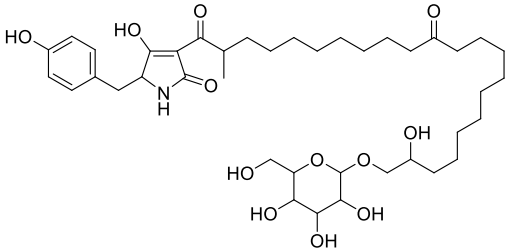
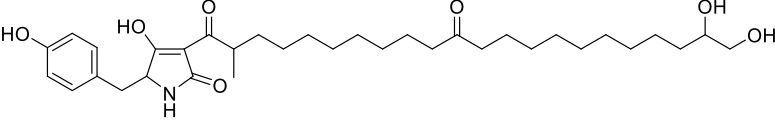
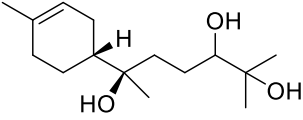
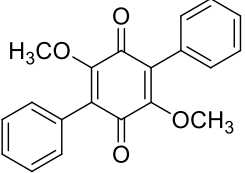
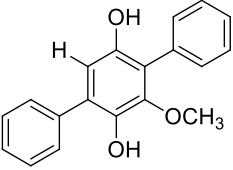
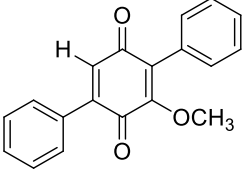
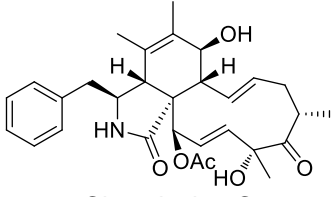
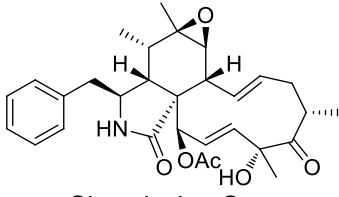
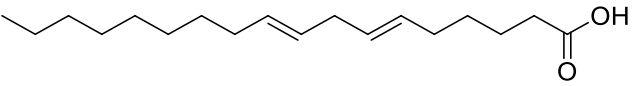
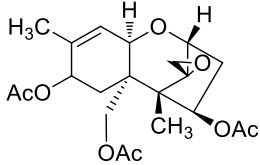
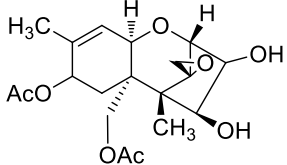
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>Clorhidrina del ácido heptelídico</p>	 <p>Ácido fenilacético</p>	 <p>Decarboxicitrinona</p>	 <p>Aurofusarina</p>
 <p>Ácido (<i>E</i>)-8-(3-(oct-2-enoil)oxiran-2-il)octanóico</p>		 <p>Ácido (10<i>E</i>,12<i>E</i>)-9-hidroxiocetadeca-10,12-dienóico</p>	
 <p>Estearato de 2,3-dihidroxiopropilo</p>	 <p>Octadec-6-enoato de (<i>E</i>)-2,3-dihidroxiopropilo</p>		
 <p>Equisetina</p>	 <p>5'-epiequisetina</p>	 <p>Acuminatum C</p>	 <p>Acuminatum B</p>

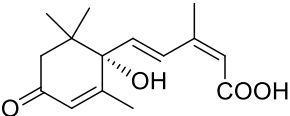
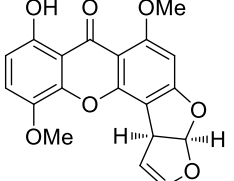
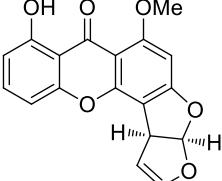
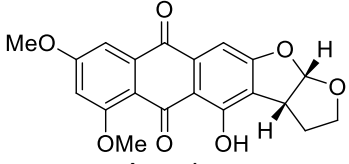
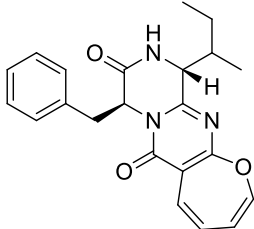
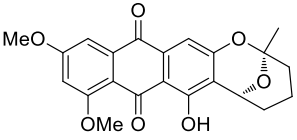
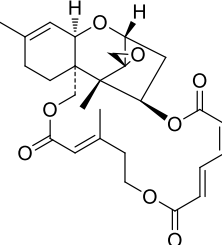
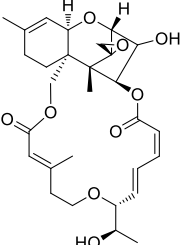
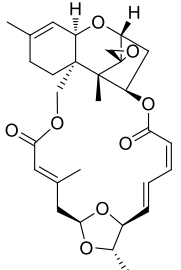
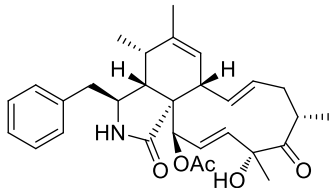
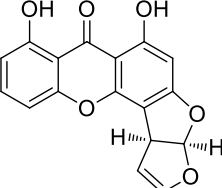
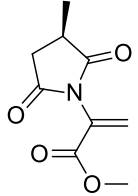
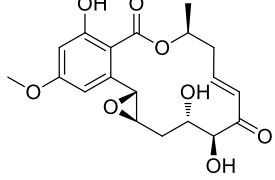
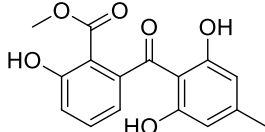
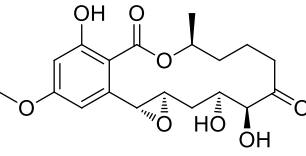
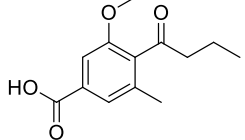
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>AGI-7</p>	 <p>Clonostachina</p>	 <p>Sch 52901</p>	 <p>Verticilina H</p>
 <p>Verticilina A</p>	 <p>Sch 52900</p>	 <p>Gliocladicilina A</p>	 <p>Gliocladicilina C</p>
 <p>11-Deoxiverticilina A</p>	 <p>De-O-metildihidroesterigmatocistina</p>	 <p>Esterigmatina</p>	 <p>Averufina</p>

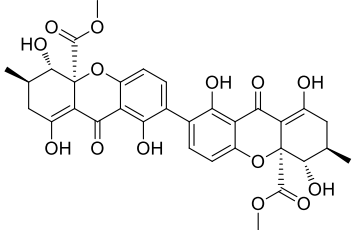
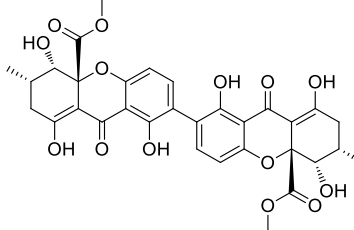
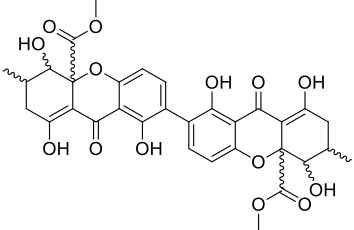
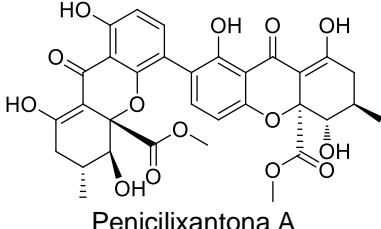
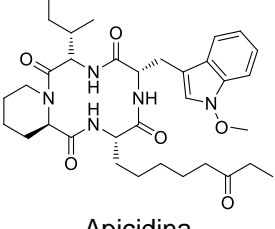
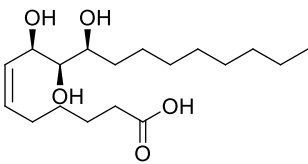
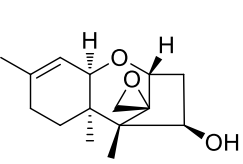
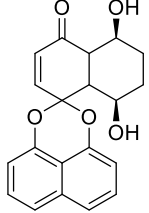
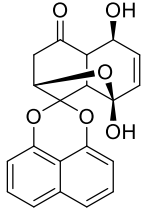
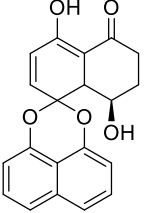
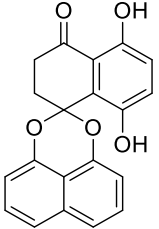
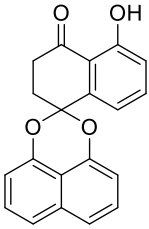
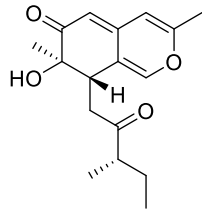
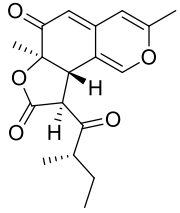
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>Roridina A</p>	 <p>Roridina D</p>	 <p>Virgineona</p>	
 <p>Virgineona aglicona</p>	 <p>5,6-dihydrobisabolol</p>	 <p>Betulinona A</p>	
 <p>BTH-II0204-207:A</p>	 <p>Betulinona C</p>	 <p>Citocalasina C</p>	 <p>Citocalasina Q_{HYP}</p>
 <p>Ácido 6,9-Octadecadienóico</p>	 <p>8-Acetoxineosolaniol</p>	 <p>Iseosolaniol</p>	

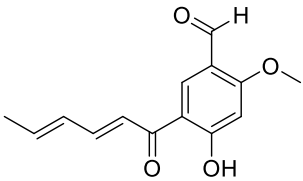
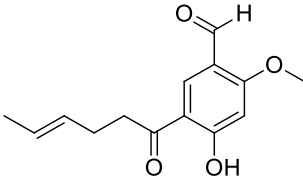
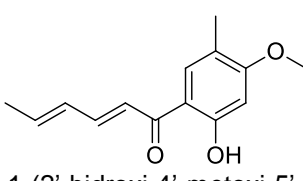
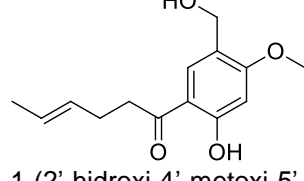
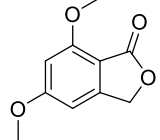
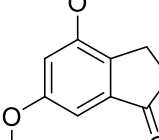
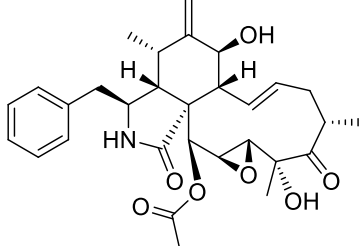
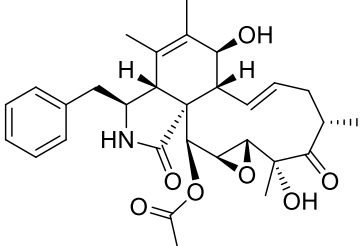
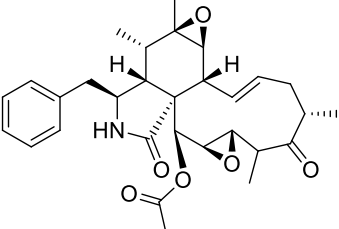
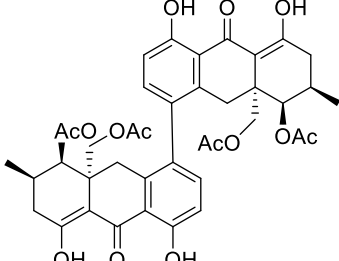
8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>Ácido abscísico</p>	 <p>5-Metoxiesterigmatocistina</p>	 <p>Esterigmatocistina</p>	 <p>Aversina</p>
 <p>Brevianamida P</p>	 <p>6,8-Di-O-Metil averufina</p>	 <p>Verrucarina J</p>	 <p>Rorodina L</p>
 <p>Roridina H; Verrucarina H</p>	 <p>Zigosporina G</p>	 <p>De-O-metilesterigmatocistina</p>	 <p>Versimida</p>
 <p>Aigialomicina A</p>	 <p>Nidulalina B</p>	 <p>Dihidrohipotemicina</p>	 <p>Ácido pirenocaético C</p>

8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>Ácido secalónico A</p>	 <p>Ácido secalónico E</p>	 <p>Ácido secalónico G</p>	
 <p>Penicilixantona A</p>	 <p>Apicidina</p>	 <p>Oxilipina</p>	
 <p>Tricodermol</p>	 <p>Decaspirona C</p>	 <p>Palmarumicina CP3</p>	 <p>Palmarumicina CP4</p>
 <p>Palmarumicina CP₁₇</p>	 <p>Palmarumicina CP₂</p>	 <p>Quermesinona A</p>	 <p>Quermesinona B</p>

8.1 Micotoxinas contenidas en la base de datos utilizada para los estudios de derreplicación de los extractos fúngicos (continuación).

 <p>5'-formilo-2'-hidroxi-4'-metoxi- (<i>E,E</i>)-sorbofenona</p>	 <p>5'-formilo-2'-hidroxi-4'-metoxi-(<i>E</i>)- 4-hexenofenona</p>	 <p>1-(2'-hidroxi-4'-metoxi-5'- metilfenil)-2,4-<i>E, E</i>-hexadien-1-ona</p>	 <p>1-(2'-hidroxi-4'-metoxi-5'- hidroximetilfenil)- <i>E</i>-4-hexen-1-ona</p>
 <p>5,7-dimetoxi-1(3<i>H</i>)- isobenzofuranona</p>	 <p>4,6-Dimetoxi-1(3<i>H</i>)- isobenzofuranona</p>	 <p>19,20-Epoxicitocalasina D</p>	 <p>19,20-Epoxicitocalasina C</p>
 <p>18-Deoxi-19,20-epoxicitocalasina Q</p>		 <p>Fomoxantona A</p>	

8.2 Cartel presentado en la Semana de la Investigación de la Facultad de Química, UNAM.



AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN, ACTIVIDAD CITOTÓXICA, Y PERFILES METABÓLICOS DE HONGOS SAPROTRÓTROS DEL VOLCÁN DE SAN MARTÍN TUXTLA

Arnulfo Bautista, Abdiel Esquivel, Osmaly Villedas y Mario Figueroa
 Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,
 México DF 04510, México.

INTRODUCCIÓN

Como parte de nuestro trabajo de investigación enfocado al descubrimiento de nuevos agentes biodinámicos a partir de organismos fúngicos obtenidos de hábitats inexplorados de México, una serie de 130 especies de hongos saprotrofos fueron aislados de dos muestras de suelo colectadas a las faldas del volcán de San Martín Tuxtla, Veracruz (Figuras 1 y 2). La diversidad taxonómica de algunas de estas especies fue determinada mediante el análisis genético de su espaciador interno ribosomal (ITS), conocido también como "código de barras" (Tabla 1).¹



Figura 1. Localización geográfica de los sitios de colecta de las muestras de suelo.

RESULTADOS

A partir de los fermentados preparados en medio sólido (arroz húmedo) de los 130 taxones aislados, se obtuvieron los extractos orgánicos (CHCl₃-MeOH) mediante la técnica de maceración y procesos de partición, para posteriormente ser evaluados biológicamente contra las líneas celulares cancerígenas HCT-15 (colon) y MCF-7 (mama), además de ser sometidos a un proceso de derreplicación vía UPLC-PDA-HRMS/MS realizando un análisis comparativo con una base de datos que contenía más de 180 micotoxinas comunes. Este último proceso se realizó mediante la determinación de los tiempos de retención, los perfiles en el UV y los espectros de masas de alta resolución masas/masas (MS2) por electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo.² Los extractos activos (inhibición del crecimiento celular ≥80% a 20 µg/mL; Tabla 2) con resultados de derreplicación negativos (Figura 3) fueron escalados (10x) para su posterior estudio químico con la finalidad de obtener los principios activos.

Tabla 1. Algunas especies identificadas taxonómicamente mediante el análisis de ITS.

Aislamiento	Nombre*	Cobertura GenBank	Similitud en la Secuencia GenBank
T1-2	<i>Myrothecium verrucaria</i>	98%	100.0%
T1-11	<i>Eupenicillium</i> sp.	70%	71.0%
T1-21	<i>Neosartorya</i> sp.	70%	100.0%
T1-62	<i>Microdiplodia</i> sp.	50%	52.8%
T1-79	<i>Dokmaia</i> sp.	90%	90.8%
T1-86	<i>Phoma macrostoma</i>	98%	100.0%
T2-14	<i>Trichosporon porosum</i>	98%	100.0%
T2-25	<i>Penicillium commune</i>	98%	99.0%
T2-52	<i>Trichosporon wieringae</i>	98%	100.0%
T2-56	<i>Penicillium</i> sp.	70%	98.0%

* Para considerarse la misma especie vía el análisis BLAST en el GenBank, la secuencia de ITS debe tener ≥80% de cobertura y ≥97% de identidad en la secuencia.

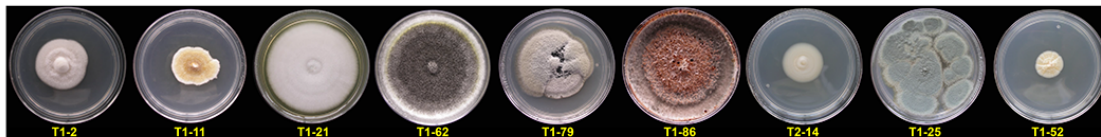


Figura 2. Especies selectas de hongos aislados de las muestras de suelo del volcán de San Martín Tuxtla.

Tabla 2. Resultados de la actividad citotóxica y estudios de derreplicación de extractos fúngicos selectos.

Aislamiento	% de Inhibición del Crecimiento Celular				Resultados de Derreplicación
	HCT-15		MCF-7		
	2 (µg/mL)	20 (µg/mL)	2 (µg/mL)	20 (µg/mL)	
T1-2	-12.8	-12.5	-7.4	-8.4	Tricotecenos
T1-11	-1.1	-5.3	22.7	16.4	-
T1-21	85.0	43.9	66.6	30.6	-
T1-62	102.7	3.8	110.0	3.8	-
T1-79	79.2	2.5	100.8	30.0	-
T1-86	10.0	3.8	3.8	2.6	-
T2-14	103.0	59.0	72.0	45.3	-
T2-25	97.2	32.0	102.3	40.7	-
T2-52	15.9	19.2	96.2	7.3	-
T2-56	33.3	-24.3	82.3	80.6	-

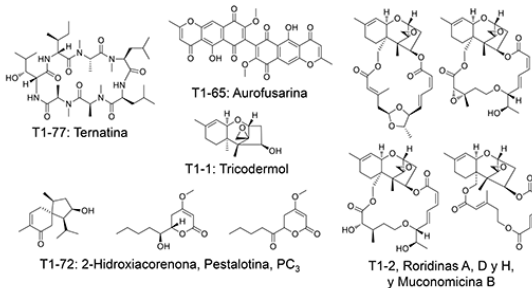


Figura 3. Resultados de derreplicación de algunos extractos activos.

Los estudios químicos de los extractos activos en mediana escala y con resultados de derreplicación negativos se encuentran en proceso.

REFERENCIAS

- Schoch C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 6241-6246 (2012).
- El-Elimat T. et al. *J. Nat. Prod.*, 76, 1709-1716 (2013).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por el financiamiento otorgado para realizar esta investigación a través del proyecto PAPIIT RR260213 (IB200213). Los autores agradecen también al Dr. Juan Espindola (Instituto de Geofísica, UNAM) por proporcionar las muestras de suelo volcánico; a los Dres. Mariana del Olmo (Instituto de Ecología, UNAM) y Huzefa Raja (UNCG, Greensboro, NC, USA) por su apoyo en el aislamiento e identificación de las especies fúngicas; a los Dres. Mabel Fragozo y Rogelio Pereda (FQ, UNAM) por su apoyo en los ensayos de citotoxicidad; y a los Dres. Tamam El-Elimat y Nicholas Oberlies (UNCG, Greensboro) por permitirle realizar los estudios de derreplicación.