



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

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

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**OSMALLY VILLEDAS HERNÁNDEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
<b>VOCAL:</b>	Dra. Rachel Mata Essayag
<b>SECRETARIO:</b>	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
<b>1<sup>er</sup> SUPLENTE:</b>	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
<b>2<sup>do</sup> SUPLENTE:</b>	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

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:**

- Osmaly Villedas Hernández

# ÍNDICE

Lista de figuras

Lista de cuadros

Lista de tablas

Lista de abreviaturas

<b>1.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hongos microscópicos como fuente para la obtención de metabolitos     biodinámicos. ....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Hongos endoligogénicos: importancia terapéutica. ....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Líquenes en el Pedregal de San Ángel. ....</b>	<b>9</b>
<b>1.4 Cáncer, un problema de salud pública. ....</b>	<b>10</b>
<b>2. HIPÓTESIS.....</b>	<b>13</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL. ....</b>	<b>15</b>
<b>4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio.....</b>	<b>15</b>
<b>4.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala. ....</b>	<b>15</b>
<b>4.3 Preparación de extractos orgánicos.....</b>	<b>16</b>
<b>4.4 Estudios de derreplicación.....</b>	<b>16</b>
<b>4.5 Ensayo de citotoxicidad.....</b>	<b>17</b>
4.5.1 Cultivo y suspensión de las líneas celulares. ....	17
4.5.2 Procedimiento:.....	18
<b>4.6 Fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala.....</b>	<b>19</b>
<b>4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios de L1-4. ....</b>	<b>19</b>
<b>4.8 Caracterización de los productos naturales. ....</b>	<b>22</b>
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos a partir del liquen.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2 Estudio químico de la especie fúngica L1-4.....</b>	<b>28</b>
5.2.1 Estudio químico del extracto en mediana escala. ....	28
5.2.1.1 Caracterización de la o-metilmeleína (1). ....	29
5.2.1.2 Caracterización de la 5-carbometoximeleína (2) .....	34
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>39</b>
<b>7.- PERSPECTIVAS.....</b>	<b>40</b>
<b>8.- BIBLIOGRAFÍA. ....</b>	<b>41</b>

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Ceftobiprol (A); <i>Acremonium</i> (B).	1
2	Umirelimus (A) ; <i>Streptomyces hygroscopicus</i> (B).	2
3	Tebipemen (A); <i>Streptomyces catleya</i> (B).	2
4	Telavancina (A); <i>Nocardia orientalis</i> (B).	3
5	Romidepsina (A); <i>Chromobacterium violaceum</i> (B).	3
6	Fingolimod (A); <i>Isaria sinclairii</i> (B).	4
7	Etapas de formación (A) y microscopía de un líquen (B).	7
8	Corynesporol (A), herbarina (B) y 1-hidroxidehidroherbarina (C).	9
9	Tipos más comunes de cáncer en el mundo; incidencia por región y por cada 100,000 personas.	11
10	Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones L1-4 <sub>1</sub> -L1-4 <sub>9</sub> ( $\lambda$ = 254 nm).	21
11	Análisis cromatográfico por HPLC a nivel preparativo del fraccionamiento secundario de L1-4 <sub>4</sub> ( $\lambda$ =254 nm).	22
12	Fuente líquénica (A); especies endoligogénicas aisladas: L1-4 (B), L1-7 (C), L1-12 (D) y L1-14 (E).	25
13	Diagrama de flujo de la metodología para la realización de los estudios de derreplicación de los extractos orgánicos (adaptado de El-Elimat <i>et al.</i> , 2013).	27
14	Ternatina (A), peróxido de ergosterol (B), ácido abscísico (C).	28
15	<i>o</i> -metilmeleína (1).	29
16	Espectros de (A) <sup>1</sup> H RMN y (B) <sup>13</sup> C RMN de la <i>o</i> -metilmeleína (1).	32
17	(A) Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la <i>o</i> -metilmeleína (1).	33

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
18	Espectro COSY de la <i>o</i> -metilmeleína (1).	34
19	5-carbometoximeleína (2).	34
20	Espectros de (A) <sup>1</sup> H RMN y (B) <sup>13</sup> C RMN de la 5-carbometoximeleína (2).	36
21	(A) Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 5-carbometoximeleína (2).	37
22	Espectro COSY de la 5-carbometoximeleína (2).	38

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico de L1-4 (Stadler, 2011).	20
2	Fraccionamiento secundario de la fracción L1-4 <sub>4</sub> a nivel preparativo.	22

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Ejemplos selectos de productos naturales de interés obtenidos a partir de especies endófitas (Adaptado de Mishra & Singh 2014).	5
2	Resultados de las evaluaciones biológicas, estudios de derreplicación y rendimiento obtenido de los extractos en pequeña y mediana escala de los diferentes organismos fúngicos aislados.	26
3	Datos espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$ , 300 MHz; $^{13}\text{C}$ 75 MHz; $\delta$ en ppm; $J$ en Hz) <i>o</i> -metilmeleína ( <b>1</b> ) y 5-carbometoximeleína ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$ .	31



°C	Grado Celsius	mg	Miligramos
δ	Desplazamiento químico	MHz	Megahertz
μg	Microgramos	min	Minutos
μL	Microlitros	mL	Mililitros
μm	Micrómetros	mm	Milímetros
mM	Milimolar		
Abs	Absorbancia	mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico	NEQs	Nuevas entidades químicas
CCA	Cromatografía en columna abierta	nm	Nanómetros
CCF	Cromatografía en capa fina	NO	Óxido nítrico
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado	NRPS	Péptido sintasa no ribosomal
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDA	Agar papa dextrosa		
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos		
DMBA	7,12-dimetil-1,2-benz[a]antraceno		
DMSO	Dimetilsulfóxido	ppm	Partes por millón
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	psi	Libras por pulgada cuadrada
EM	Espectrometría de masas	rADN	Ácido desoxirribonucleico ribosomal
ESI	Técnica de ionización por electrospray	RMN	Resonancia magnética nuclear
g	Gramos	RMR	Red mold rice
rpm	Revoluciones por minuto		
HCT15	Adenocarcinoma colorrectal	RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
HeLA	Cáncer cervical		
TCA	Ácido tricloroacético		
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	TIC	Total ion current
Hz	Hertz	TMS	Tetrametilsilano
ITS	Espaciador interno de transcripción	TPA	Activador tisular del plasminógeno
kcal	Kilocalorías	TRIS	Tris-hidroximetil-aminoetano
kV	Kilovolts	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultraeficiencia
UV	Espectroscopia en el ultravioleta		
M	Millones	V	Volts
MEA	Agar extracto de malta		
MeCN	Acetonitrilo	YESD	Extracto de levadura peptona dextrosa
MeOH	Metanol		

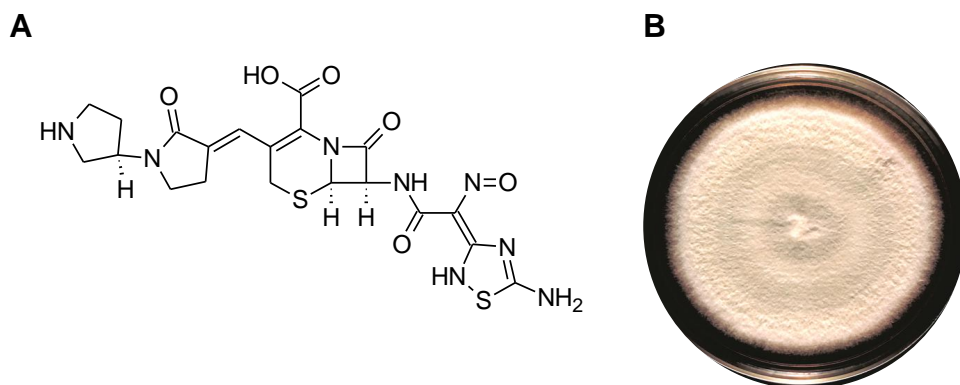
## 1.INTRODUCCIÓN

### 1.1 Hongos microscópicos como fuente para la obtención de metabolitos biodinámicos.

Desde el descubrimiento de la penicilina a principios del siglo XX, los microorganismos han representando una fuente invaluable de metabolitos secundarios estructuralmente diversos, y han contribuido al descubrimiento de una gran variedad de agentes biodinámicos como antibióticos, inmunosupresores (ciclosporina y rapamicina), hipocolesteromiantes (lovastatina, mevastatina), antiparasitarios (ivermectina), antidiabéticos (acarbosa) y anticancerígenos (pentostatina y epirubicina), entre otros (Cragg & Newman, 2013).

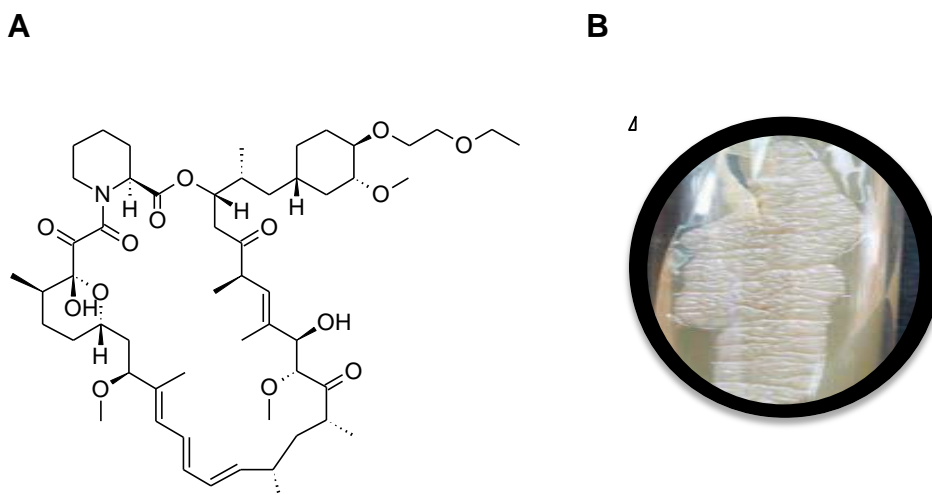
En años recientes, algunos laboratorios farmacéuticos han lanzado al mercado diversos productos derivados de microorganismos como son:

1. El ceftobiprol, un derivado de cefalosporina aislado de hongos del género *Acremonium* (**Figura 1**), eficaz contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina (Fernández et al., 2010).



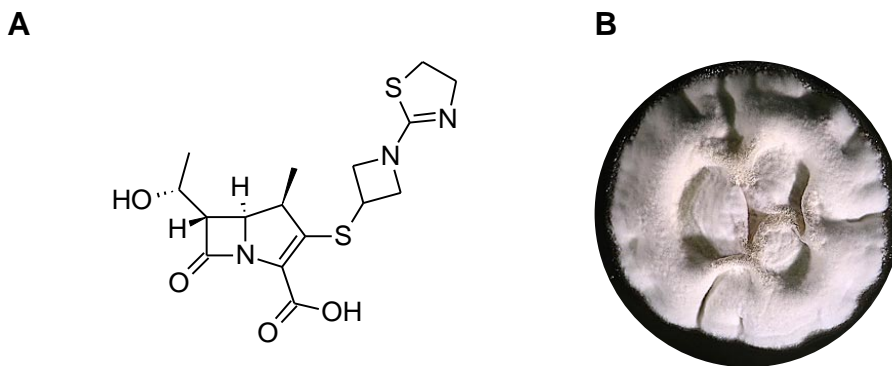
**Figura 1.** Ceftobiprol (**A**); *Acremonium* (**B**).

2. El umirolimus, un inmunosupresor derivado de sirolimus obtenido de *Streptomyces hygroscopicus* (**Figura 2**) (Christiansen et al., 2013; Sprimont et al., 2014).



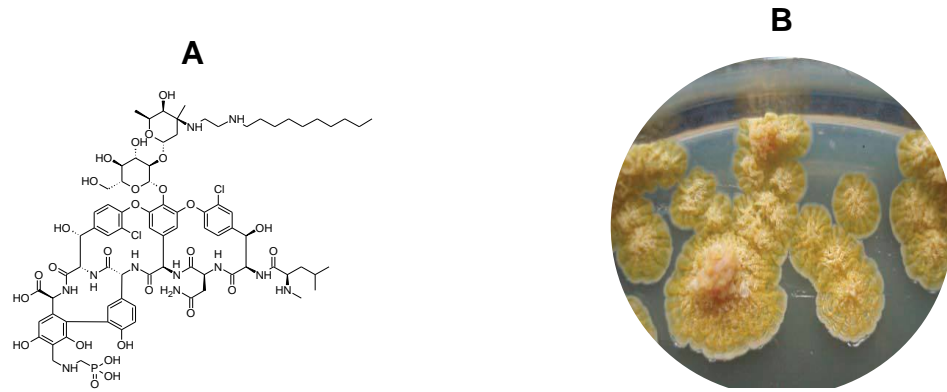
**Figura 2.** Umirolimus (**A**); *Streptomyces hygroscopicus* (**B**).

3. El tebipemen, un producto de semisíntesis de la tienamicina, obtenida de *Streptomyces catleya* (**Figura 3**) (Kahan et al., 1979);



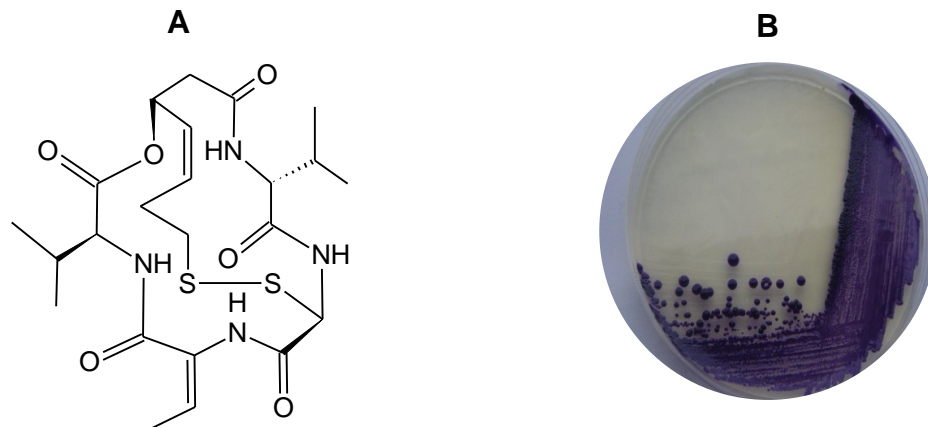
**Figura 3.** Tebipemen (**A**); *Streptomyces catleya* (**B**).

4. La telavancina, un derivado de la vancomicina obtenida de la especie *Nocardia orientalis* (**Figura 4**) (Song et al., 2013).



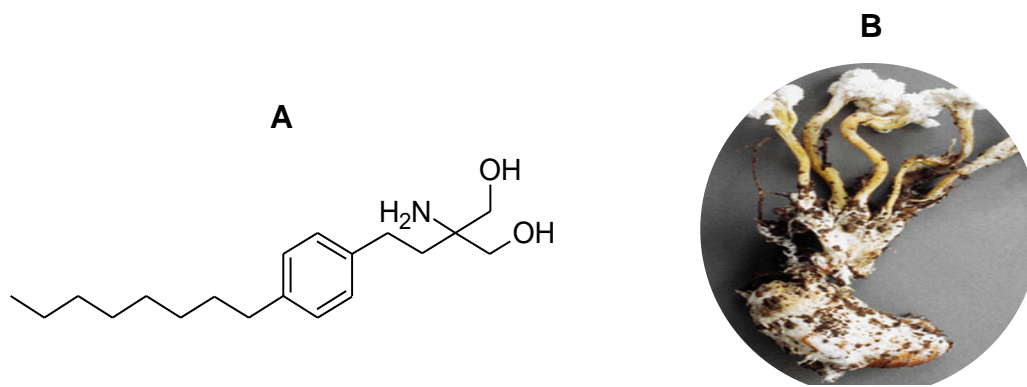
**Figura 4.** Telavancina (**A**); *Nocardia orientalis* (**B**).

5. La romidepsina, un péptido cíclico producido por la bacteria *Chromobacterium violaceum* (**Figura 5**), eficaz para el tratamiento de cáncer de piel.



**Figura 5.** Romidepsina (**A**); *Chromobacterium violaceum* (**B**).

6. El fingolimod, un derivado semisintético de la miriocina aislada de la especie fúngica *Isaria sinclairii* (**Figura 6**), de interés para el tratamiento de la esclerosis múltiple (Peláez et al., 2000).



**Figura 6.** Fingolimod (**A**); *Isaria sinclairii* (**B**).

Así es evidente que los hongos constituyen un grupo de microorganismos muy importante para la obtención de nuevos fármacos, además de ser megadiverso y cosmopolita. A la fecha se han descrito más de 100,000 especies diferentes de hongos y se estima que podrían existir entre 1.5 y 5 millones de especies a nivel mundial (Dictionary of Natural Products, Data & References, 1993), de los cuales cerca de 20,000 han sido estudiados químicamente, lo que justifica que en la actualidad exista este renovado interés en el estudio químico y biológico de estos organismos con la finalidad obtener nuevas moléculas biodinámicas con mecanismos de acción novedosos.

Dentro de los organismos más estudiados, los hongos endófitos representan una de las fuentes con mayor biodiversidad e interés para su bioprospección (**Tabla 1**). Por otra parte, la colonización por endófitos ya ha sido observada también en otras fuentes naturales como son: algas marinas, musgos, líquenes y helechos; y las condiciones ambientales en las que el anfitrión crece también afectan a la población y el metabolismo de los endófitos. Finalmente, la mayoría de los endófitos aislados

pertencen a los grupos de los ascomicetos y sus anamorfos, y a los basidiomicetos (Abhijeet Singh, 2014).

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos selectos de productos naturales de interés obtenidos a partir de especies endófitas (Adaptado de Mishra & Singh 2014).			
<b>Organismo hospedero</b>	<b>Organismo endófito</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad biológica</b>
<i>Ananas ananassoids</i>	<i>Muscodor crispans</i>	compuestos orgánicos volátiles, ácido propanóico, metil éster, 2-metilbutiléster, etanol	Antibiótico
<i>Annona squamosa</i>	<i>Penicillium</i> sp.	meleargina y crisogina	Anticancerígeno, Antibacteriana
<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	<i>Cloridium</i> sp.	avanicina	Antibacteriana
<i>Camptotheca acuminata</i>	<i>Fusarium solani</i>	camptotecina, 9-metoxi-camptotecina, 10-hidroxicamptotecina	Anticancerígeno
<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Mycelia sterilia</i>	vincristina	Anticancerígeno
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>Muscodor albus</i>	1-butano,3-metil-acetato	Antimicrobiano
<i>Cryptosporiopsis quercina</i>	<i>Cryptosporiopsis</i> sp.	criptocandina	Antimicrobiano
<i>Ephedra fasciculata</i>	<i>Chaetomium chiversii</i>	radicol	Citotóxico
<i>Erythrina cristagalli</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	isoflavonoides	Antimicrobiano
<i>Eucryphia cordifolia</i>	<i>Gliocladium roseum</i>	hidrocarburos volátiles	Biocombustible
<i>Garcinia hombroniana</i>	<i>Guignardia bidwelii</i>	guignarenonas A-D	Citotóxico
<i>Garcinia</i> sp.	<i>Phomopsis</i> sp.	fomoxantonas A, B	Antimicobacteriano
<i>Gastrodia elata</i>	<i>Armillaria mellea</i>	ésteres sesquiterpeneáricos	Antimicrobiano
<i>Ginkgo biloba</i>	<i>Xylaria</i> sp.	7-amino-4-metilcumarina	Antimicrobiano
<i>Guazuma ulmifolia</i>	<i>Muscodor albus</i>	cariofileno, alcohol fenilacético, 2-feniletil éster, bulneseno	Antibiótico
<i>Justicia gendarussa</i>	<i>Colletotrichum gloesporioides</i>	taxol	Anticancer
<i>Melia azedarach</i>	<i>Penicillium janthinellum</i>	citrinina	Antimicrobiano

**Tabla 1.** Ejemplos selectos de productos naturales de interés obtenidos a partir de especies endófitas (continuación) (Adaptado de Mishra & Singh 2014).

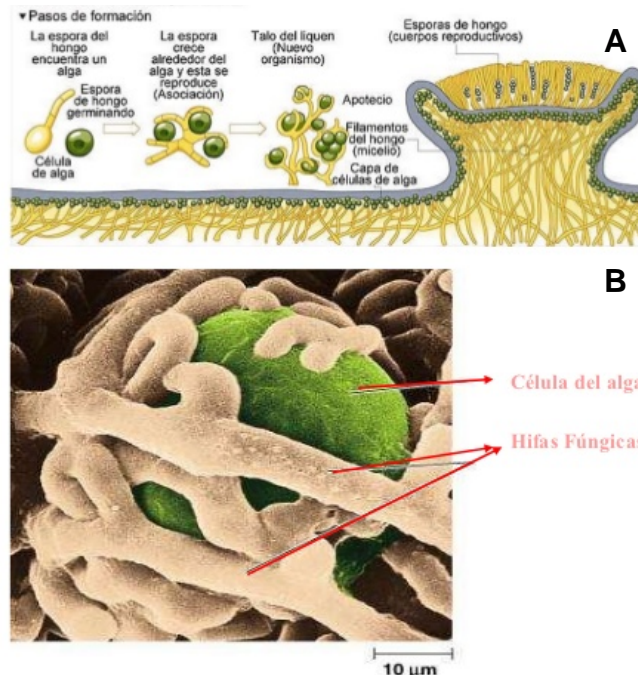
<i>Nothapodytes foetida</i>	<i>Entrophospora infrequens</i>	camptotecina	Anticancerígeno
<i>Ocimum basilicum</i>	<i>Phyllosticta</i> sp.	taxol	Anticancerígeno
<i>Piptadenia adiantoides</i>	<i>Cochliobolus</i> sp.	cochlioquinona A, isocochlioquinona A	Antiparasitario
<i>Plumeria</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	terpenoides	Antimicrobiano
<i>Plumeria acutifolia</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	taxol	Anticancerígeno
<i>Plumeria acutifolia</i>	<i>Phomopsis</i> sp.	terpenoides	Antimicrobiano
<i>Podophyllum hexandrum</i>	<i>Thametes hirsute</i>	podofilotoxina	Anticancerígeno
<i>Rhizophora annamalayaa</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	taxol	Anticancerígeno
<i>Salvia officinalis</i>	<i>Chaetomium</i> sp.	cochliodinol, isocochliodinol	Citotóxico
<i>Scapania ciliata</i> (Liverwort)	<i>Aspergillus sydowii</i>	sidoxantona A y B	Inmunosupresor
<i>Spondias mombin</i>	<i>Guignardia</i> sp.	fomopsidina y fomopsicalasina	Antimicrobiano, Anticancerígeno, Antimalárico
	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>		
	<i>Phomopsis</i> sp.		
<i>Taxus baccata</i>	<i>Acremonium</i>	leucinostatinas	Antifúngico y Anticancerígeno
<i>Taxus brevifolia</i>	<i>Taxomyces adreanae</i>	diterpenoides	Anticancerígeno
<i>Taxus chinensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	taxol	Anticancerígeno
<i>Taxus wallichinia</i>	<i>Phoma</i> sp.	altersolanol A y ácido $\alpha$ -hidroxi-6-metil benzoico	Antimicrobiano
<i>Terminalia morobensis</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1,3-dihidroisobenzofuranos	Antioxidante
<i>Terminalia morobensis</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	1,3-dihidroisobenzofuranos	Antioxidante
<i>Tinospora cordifolia</i>	<i>Fusarium culmorum</i>	taxol	Anticancerígeno
<i>Torreya mairei</i>	<i>Aspergillus clavatonanicus</i>	clavatul	Antimicrobiano
<i>Torreya taxifolia</i>	<i>Pestalotiopsis microspora</i>	ácido torreyánico	Anticancerígeno
<i>Tripterygium wilfordii</i>	<i>Fusarium subglutians</i>	subglutinol A y B	Inmunosupresor
<i>Tripterygium wilfordii</i>	<i>Rhinocladiella</i> sp.	22-oxa-(12)-citocalasina	Anticancerígeno

**Tabla 1.** Ejemplos selectos de productos naturales de interés obtenidos a partir de especies endófitas (continuación) (Adaptado de Mishra & Singh 2014).

<i>Viscum album</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	lectinas	Anticancerígeno y Antioxidante
	<i>Fusarium oniforme</i>		
	<i>Fusarium oxysporium</i>		

## 1.2 Hongos endolicogénicos: importancia terapéutica.

Algunos autores han descrito a los hongos endolicogénicos como hongos endófitos, ya que presentan características similares a éstos. Los líquenes se forman a partir de la asociación de una especie fúngica (micobionte) y un alga (fotobionte) (**Figura 7**) con un tipo de simbiosis considerada como mutualista, es decir, con un beneficio mutuo para las dos o tres especies que lo forman (Scott, 1973; Hale, 1983; Honegger, 1998, 2008; Nash, 2008a). Sin embargo, esta asociación también se considera como parasitismo controlado por parte del micobionte, el cual se beneficia de los carbohidratos producidos por el fotobionte, provocando que éste crezca más lentamente que en vida libre (Ahmadjian, 1993).



**Figura 7.** Etapas de formación (A) y microscopía de un líquen (B).

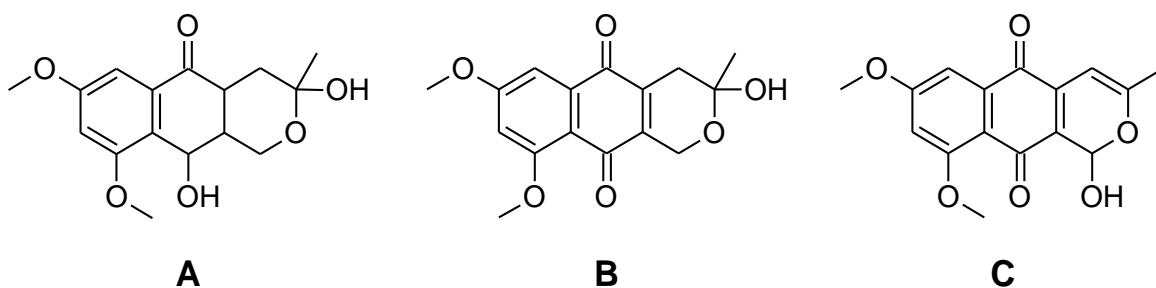


Los líquenes crecen en cualquier lugar que contenga una superficie estable y bien iluminada, como es suelo, las rocas o incluso las cortezas de los árboles, además de que están presentes en cualquier tipo de clima (templado, ártico, tropical, desértico, etc.) (Kannangarae et al., 2009).

Por otra parte, los hongos endolicogénicos viven en estrecha asociación con las algas fotobiontes dentro de los talos de los líquenes de manera asintomática, y se asemejan a los hongos endófitos de plantas en términos de taxonomía, diversidad, modo de transmisión, e historia evolutiva. Alrededor del 8% del ecosistema terrestre está dominado por líquenes. Los talos de los líquenes proporcionan un nicho ecológico, en su mayoría inexplorado, para una amplia variedad de microorganismos.

Existen pocos reportes en la literatura sobre el aislamiento de hongos endolicogénicos, y desde el punto de vista químico y biológico, es aún menor el número de reportes en donde se describen moléculas bioactivas a partir de estas fuentes naturales. El papel ecológico de estos organismos es bien reconocido ya que contribuyen al desarrollo de los huéspedes en condiciones hostiles, inhiben el crecimiento de bacterias, incrementan la permeabilidad de las paredes celulares de los ficobiontes, absorben la luz en el UV, forman complejos con metales como el potasio, cobre, hierro, etc. y resultan tóxicos para insectos, caracoles y nematodos, entre otros organismos dando protección contra los depredadores.

En el año 2007, Paranagama y colaboradores (2007) reportaron uno de los primeros trabajos sobre el aislamiento de compuestos bioactivos a partir del hongo endolicogénico *Corynespora* sp., aislado del liquen *Usnea cavernosa*. Los taquetidos novedosos, corinesporol y 1-hidroxidehidroherbarina, junto con la herbarina, mostraron propiedades citotóxicas contra células cancerígenas de mama y próstata (Kannangara et al., 2009).



**Figura 8.** (A) corinesporol, (B) herbarina e (C) 1-hidroxi-dehidroherbarina

Así, con los antecedentes antes descritos, y considerando la biodiversidad de líquenes existentes en nuestro país, se estableció este proyecto de investigación que pretende contribuir al descubrimiento de nuevos metabolitos biodinámicos a partir de hongos endoligocénicos. La riqueza de especies de líquenes de México no se conoce con certeza, sin embargo, se estima que sólo en la porción tropical del país puede haber más de 3,600 especies. Adicionalmente, debido a que México es un país también diverso en climas y tipos de vegetación no tropicales, el número de especies de líquenes podría alcanzar las 5,000 especies. De ser así, el país ocuparía el segundo lugar en este rubro entre los países neotropicales, después de Brasil (4,900 especies sólo en sus partes tropicales), y representaría entre el 37% de las especies de líquenes a nivel mundial, que se ha estimado entre 13,500 y 20,000 especies (Herrera-Campos *et al.*, 2014).

### 1.3 Líquenes en el Pedregal de San Ángel.

El Pedregal de San Ángel es una de las regiones más reconocidas en el Distrito Federal, resultado de la erupción volcánica del Xitle aproximadamente en el año 300 a.C., y se extiende desde las faldas del Ajusco hasta los alrededores de las actuales Delegaciones de Tlalpan, Coyoacán, Magdalena Contreras y Álvaro Obregón. Actualmente esta reserva natural se ha visto fraccionada por el desarrollo urbano de la ciudad, quedando reducida su área a 2,373,000 m<sup>2</sup>, y una parte se encuentra protegida

en la Ciudad Universitaria conocida como Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) (Lot & Cano-Santana, 2009).

A pesar de ser una región muy conocida en el país, su flora liquénica no ha sido estudiada química o biológicamente (Lot & Cano-Santana, 2009), además de que el Pedregal alberga una diversidad liquénica potencialmente elevada debido a la preservación de diversos microhábitats, lo que nos permite establecer a esta región como una fuente invaluable de biodiversidad única de nuestro país y refugio de algunas especies endémicas (Lot & Cano-Santana, 2009).

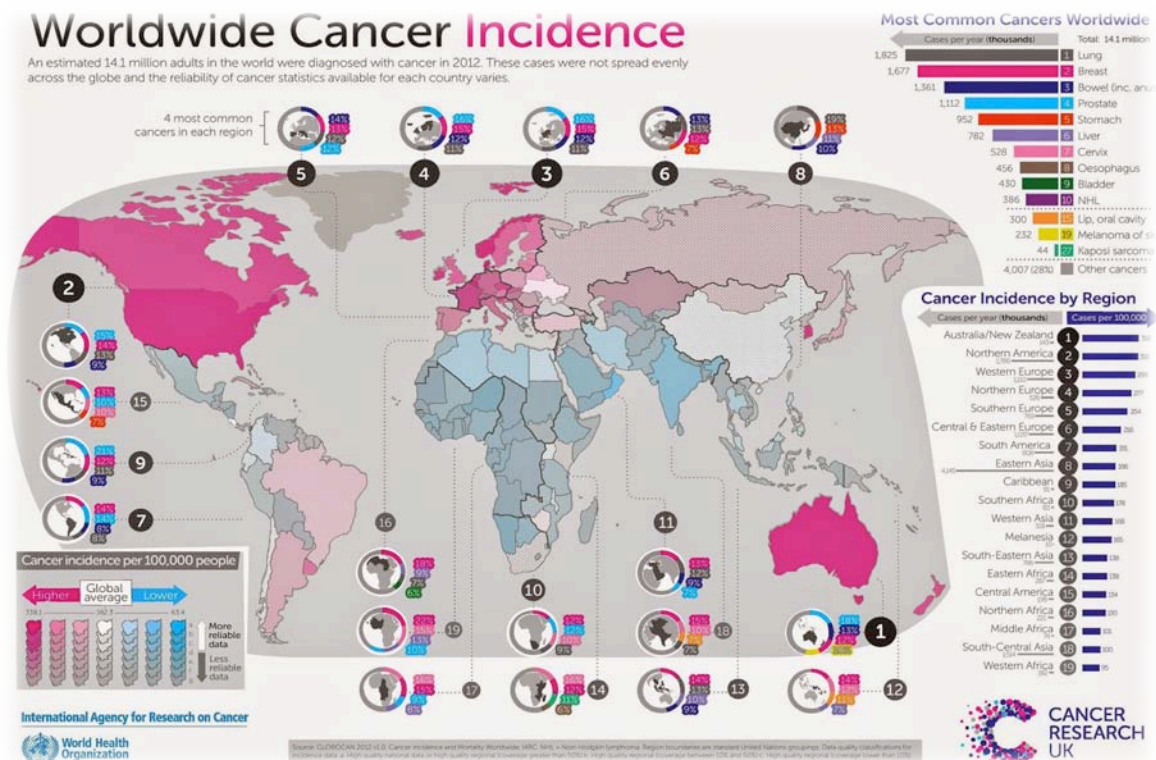
#### **1.4 Cáncer, un problema de salud pública.**

La palabra cáncer se utiliza para agrupar a un conjunto de alrededor de 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 de crecimiento y la función celular (NCI, 2014). En esta enfermedad, la multiplicación rápida de las células anormales puede extenderse más allá de los límites normales e invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos y/o tejidos proceso conocido como metástasis, la principal causa de muerte por este padecimiento (OMS, 2015).

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, así como tres categorías de agentes externos, clasificados como:

- a) carcinógenos físicos, como las radiaciones ultravioleta e ionizantes;
- b) carcinógenos químicos, como los asbestos, los componentes del humo de tabaco, las aflatoxinas, el arsénico, entre otros; y
- c) carcinógenos biológicos, como las infecciones causadas por determinados virus, bacterias o parásitos (OMS, 2015).

Los tipos de cáncer más comunes en términos de mortalidad a nivel mundial son el de: pulmón (1.2 millones), mama (1.05 millones), colorrectal (945,000), estómago (876,000) e hígado (564,000) (**Figura 9**). Por otro lado, el crecimiento de la población mundial y el envejecimiento implica un aumento progresivo en los casos de cáncer: aproximadamente 15 millones de nuevos casos y 10 millones de nuevas muertes se espera para el año 2020 (Parkin, 2001).



**Figura 9.** Tipos más comunes de cáncer en el mundo: incidencia por región y por cada 100,000 personas (CancerResearch UK; OMS, 2012).

El diagnóstico temprano del cáncer puede incrementar las tasas de sobrevivencia mediante el tratamiento que incluye una cirugía o 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, la quimioterapia 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 la pérdida de cabello, falta de apetito, vómito,

inmunosupresión, entre otras (Katzung, 2002). Otro aspecto de interés en la terapia del cáncer, es el fenómeno de resistencia a fármacos lo cual es un problema frecuente que presentan y que reduce los efectos citotóxicos de los fármacos anticancerígenos (Anthony y Kaye., 1999). Este fenómeno se ha observado en más del 30% de los casos de cáncer, lo que ha generado la búsqueda de nuevas moléculas activas con mecanismos de acción novedosos o fármacos más selectivos.

En este sentido, los productos naturales aislados a partir de microorganismos y plantas han jugado un papel líder en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer, resultando en un gran número de agentes útiles clínicamente. A partir de 1940 hasta la fecha, de las 175 moléculas pequeñas que actúan como fármacos contra el cáncer, 131 (75%) pertenecen a la categoría de "otras moléculas no sintéticas"; de éstos, 85 (49%) son productos naturales o derivados (Huryñ & Wipf, 2014). Actualmente el 47% de los medicamentos contra el cáncer y el total del 52% de los nuevos productos químicos introducidos en el mercado son de origen natural (Mishra & Singh, 2014). Un ejemplo es la actinomicina, primer producto natural aprobado con una indicación en oncología. Otros medicamentos basados en productos naturales tales como las antraciclinas, alcaloides de la vinca, lignanos, epipodofilotoxinas, derivados de camptotecina y taxoides que se lanzaron antes de 1997, siguen siendo una parte importante en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Basmadjian *et al.*, 2014).

## **2. HIPÓTESIS.**

La selección de fuentes naturales inexploradas de nuestro país para el aislamiento de organismos fúngicos endoligogénicos, en conjunto con los ensayos biológicos y estudios de derreplicación, permitirá el aislamiento de compuestos biodinámicos novedosos que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

El presente trabajo de investigación forma parte de un proyecto dirigido a la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios bioactivos de origen fúngico, que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos contra diversos tipos de cáncer y otros padecimientos y, por otro lado, contribuir al conocimiento de la biodiversidad microbiana de la reserva del Pedregal de San Ángel y de nuestro país.

Así, el objetivo general de este proyecto es realizar el aislamiento de metabolitos fúngicos biodinámicos con actividad citotóxica a partir de hongos endolicogénicos. Para lograr este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar el aislamiento de especies fúngicas endolicogénicas a partir de un líquen recolectado en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, mediante técnicas microbiológicas convencionales.
2. Preparar los cultivos en pequeña escala de cada especie y obtener sus correspondientes extractos orgánicos mediante las técnicas de maceración y reparto.
3. Realizar la evaluación de citotoxicidad y los estudios de derreplicación de cada uno de los extractos orgánicos preparados.
4. Preparar el cultivo en mediana escala de al menos una de las especies fúngicas seleccionadas con base en los resultados de las evaluaciones de citotoxicidad y estudios de derreplicación.
5. Realizar el fraccionamiento preliminar del extracto seleccionado mediante técnicas cromatográficas convencionales.
6. Realizar la purificación y caracterización de algunos de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en la especie seleccionada mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).
7. Realizar la identificación filogenética de las especies objeto de estudio.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL.**

### **4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio.**

El aislamiento de las especies fúngicas endoligocénicas se realizó a partir una muestra de líquen (100 mg) colectada en la reserva ecológica del Pedregal de San Ángel de la UNAM (coordenadas 19°19'22" N; 99°10'41" O) y que se encontraba sobre rocas volcánicas. Posteriormente, 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. Enseguida, se esterilizó superficialmente la muestra 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). Así, fragmentos entre 1 y 2 mm<sup>2</sup> del líquen estéril superficialmente fueron inoculados en tubos de reacción Eppendorff conteniendo medio de agar papa dextrosa (PDA). 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.

### **4.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala.**

Una vez obtenidos los cultivos fúngicos axénicos de la muestra objeto de estudio (inciso 4.1), 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. 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-oscuridad 12/12 horas.

El cultivo en mediana escala del microorganismo seleccionado fue realizado siguiendo la misma estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior, pero en una



preparación 30x (450 g de arroz / 900 mL de agua). El proceso de fermentación también se realizó durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-oscuridad 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  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) [90 y 900 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente]. Transcurrido el tiempo de extracción se separaron los residuos de medio y al extracto obtenido se le adicionaron 60 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 40 mL de  $\text{CHCl}_3$  para los cultivos en pequeña escala, o 1800 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 1200 mL de  $\text{CHCl}_3$  para los cultivos en mediana escala. El extracto se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos y enseguida se separó la fase orgánica de la fase acuosa. Esta última se sometió a un proceso de extracción con  $\text{CHCl}_3$  (20 o 200 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente). Las fases orgánicas obtenidas se reunieron y secaron a presión reducida. Posteriormente, cada extracto orgánico seco fue resuspendido en una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) [60 y 120 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente] y se sometió a un proceso de desgrase con hexano. Finalmente, la fracción de hexano se descartó y la fracción MeCN-MeOH resultante se evaporó a sequedad a presión reducida.

### **4.4 Estudios de derreplicación.**

Los estudios de derreplicación se realizaron utilizando la técnica de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS), y siguiendo la metodología descrita por El-Elimat y colaboradores (2013). Brevemente, para la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) se utilizó un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp., MA, EEUU) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA). El control del equipo, adquisición, procesamiento y manipulación de los datos fue realizado utilizando el programa

Empower versión 2.0 (Waters). Todos los análisis se realizaron a una temperatura de 40 °C empleando una columna Acquity BEH C<sub>18</sub> (Waters Co., MO, EEUU) [1.7 µm, 2.1 × 10 mm]. 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% de **A** e incrementando la composición hasta 100% de **A** durante 8 minutos, manteniendo una composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 minutos, con flujo de 1 mL/min. La detección se realizó mediante un barrido en el UV desde 200 hasta 400 nm, con una resolución de 4 nm.

Los análisis por espectrometría de masas de alta resolución se realizaron por la técnica de electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI<sup>+</sup> y ESI<sup>-</sup>, respectivamente) en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Inc., MA, EEUU). Las condiciones del equipo en el modo de ionización positivo fueron las siguientes: temperatura y voltaje del capilar: 275°C y 20 V, respectivamente; voltaje de la fuente de ionización, 4.5 kV, y voltaje del lente del tubo 95 V. Para el modo de ionización negativo las condiciones del equipo fueron: temperatura y voltaje del capilar: 275°C y 42 V, respectivamente; voltaje de la fuente de ionización, 3.5 kV, y voltaje del lente del tubo 110 V. El gas acarreador fue el nitrógeno a un flujo de 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).

#### **4.5 Ensayo de citotoxicidad.**

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos, y compuestos puros se realizó utilizando el ensayo de MTT, contra dos líneas celulares: HCT15 (adenocarcinoma colorrectal) y HeLA (cáncer cervical) de humano. A continuación se describe brevemente el procedimiento experimental (Vichai & 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 CO<sub>2</sub> al 5% y 100% de

humedad relativa, hasta obtener células en fase logarítmica de crecimiento. Enseguida, 24 h previas al ensayo, se realizó el cambio de medio de cultivo mediante 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 desprender a las células de la caja de crecimiento y se incubó durante 5 minutos; transcurrido el tiempo de incubación, se analizó en el microscopio que las células se hubieran desprendido por completo, y se adicionaron 2 mL de medio RPMI 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  $\mu$ L de capacidad) con una suspensión de células de aproximadamente  $10^4$  células. Para cada extracto a evaluar se prepararon dos diferentes concentraciones (2 y 20  $\mu$ g/mL en DMSO al 10%). A continuación, se transfirieron a los pozos de la placa 190  $\mu$ L de la suspensión de células y 40  $\mu$ L de las muestras de prueba conteniendo las concentraciones indicadas. Posteriormente, las cajas se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 100% de humedad relativa. Al cabo del periodo de incubación, se realizó la fijación celular mediante la adición 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) y 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  $\mu$ L de una solución de MeOH del colorante sulforodamida (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  $\mu$ L de una solución de tris-hidroximetil-aminoetano (TRIS) (10 mM). Como control positivo se utilizó vinblastina (2  $\mu$ g/mL) y como control negativo el disolvente DMSO. Finalmente, el porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó mediante la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ Inhibición del crecimiento} = \frac{Abs_{células+muestra} - Abs_{blanco}}{Abs_{células+DMSO 10\%} - Abs_{blanco}} \times 100$$

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

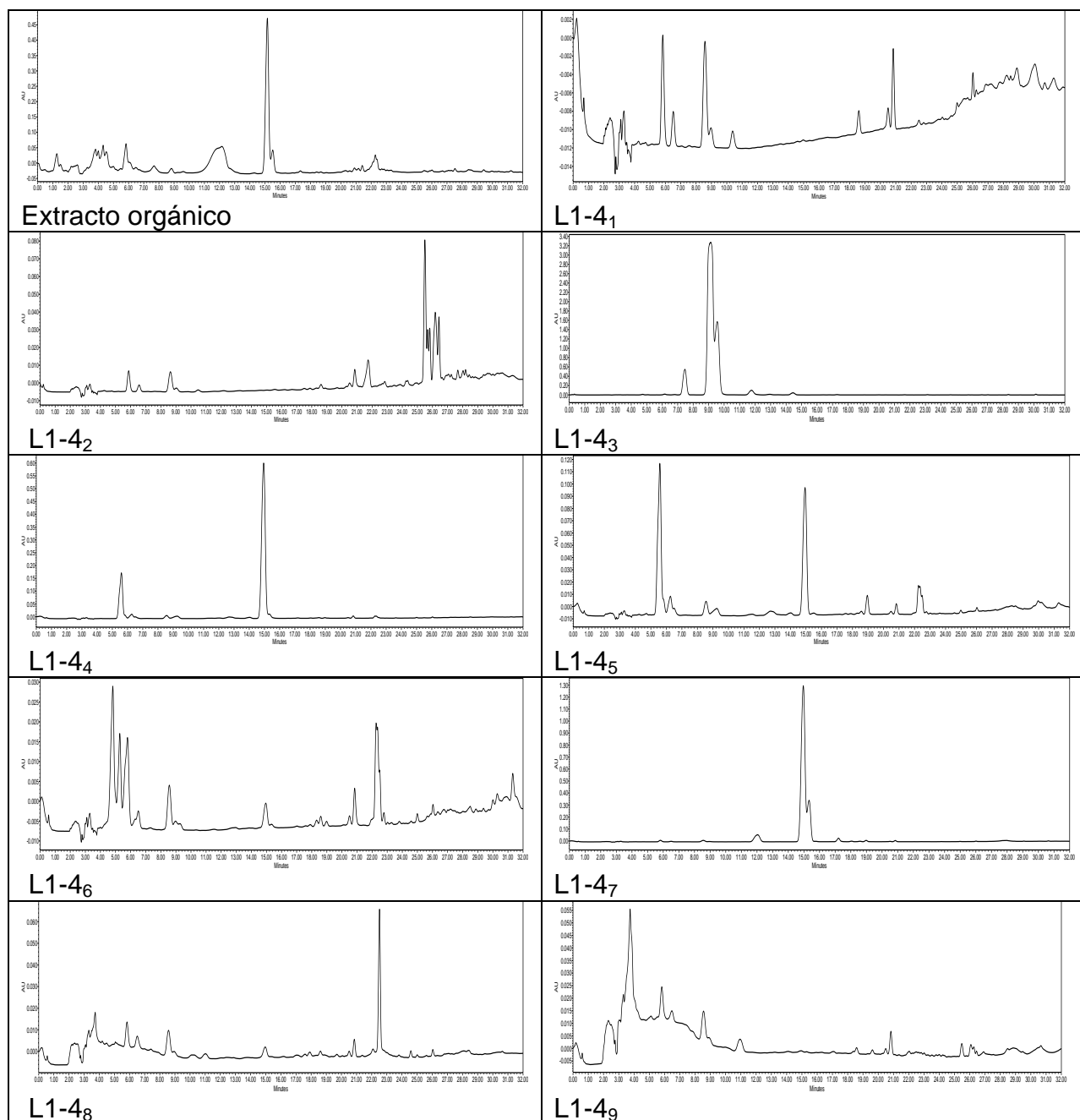
#### **4.6 Fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala.**

El fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala (30×) de la especie L1-4 (1.3979 g) se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) empacada con 150 g de gel de sílice (tamaño de partícula 10-12 mm, Merck Corp. NJ, EEUU). Como fase móvil se utilizó hexano y mezclas de hexano-CHCl<sub>3</sub> y CHCl<sub>3</sub>-MeOH, en orden creciente de polaridad. Este proceso cromatográfico generó un total de 108 fracciones (**Cuadro 1**), las cuales fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica para generar nueve fracciones primarias (L1-4<sub>1</sub>–L1-4<sub>9</sub>).

#### **4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios de L1-4<sub>4</sub>.**

Con la finalidad de analizar la complejidad de cada una de las fracciones primarias obtenidas a partir del fraccionamiento primario del extracto orgánico de L1-4, se realizó un análisis por HPLC de cada una de las fracciones (Figura 10). El cromatógrafo está equipado con un detector PDA y un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD). 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 muestras se llevó a cabo en una columna Phenomenex Gemini C18 (5 µm, 250 × 4.6 mm); fase móvil: MeCN (**A**) y ácido fórmico (0.1%) (**B**); gradiente: 40% a 100% (**A**); tiempo de corrida: 30 min; flujo: 1 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm.

<b>Cuadro 1. Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico de L1-4</b>		
Sistema de elución	Fracciones	Clave/peso (mg)
Hex	1-6	L1-4 <sub>1</sub> / 6.2
Hex-CHCl <sub>3</sub> (9:1)	7-12	
Hex-CHCl <sub>3</sub> (8:2)	13-18	
Hex-CHCl <sub>3</sub> (7:3)	19-24	L1-4 <sub>2</sub> / 11.3
Hex-CHCl <sub>3</sub> (6:4)	25-30	
Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:1)	31-36	L1-4 <sub>3</sub> / 38.1
Hex-CHCl <sub>3</sub> (4:6)	37-42	
Hex-CHCl <sub>3</sub> (3:7)	43-48	L1-4 <sub>4</sub> / 189
Hex-CHCl <sub>3</sub> (2:8)	49-54	L1-4 <sub>5</sub> / 105.6
Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:9)	55-60	L1-4 <sub>6</sub> / 171.5
CHCl <sub>3</sub>	61-66	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (9:1)	67-72	L1-4 <sub>7</sub> / 338.2
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (8:2)	73-78	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (7:3)	79-84	L1-4 <sub>8</sub> / 82.3
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (6:4)	85-90	
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1)	91-96	
MeOH	97-108	L1-4 <sub>9</sub> / 45.1

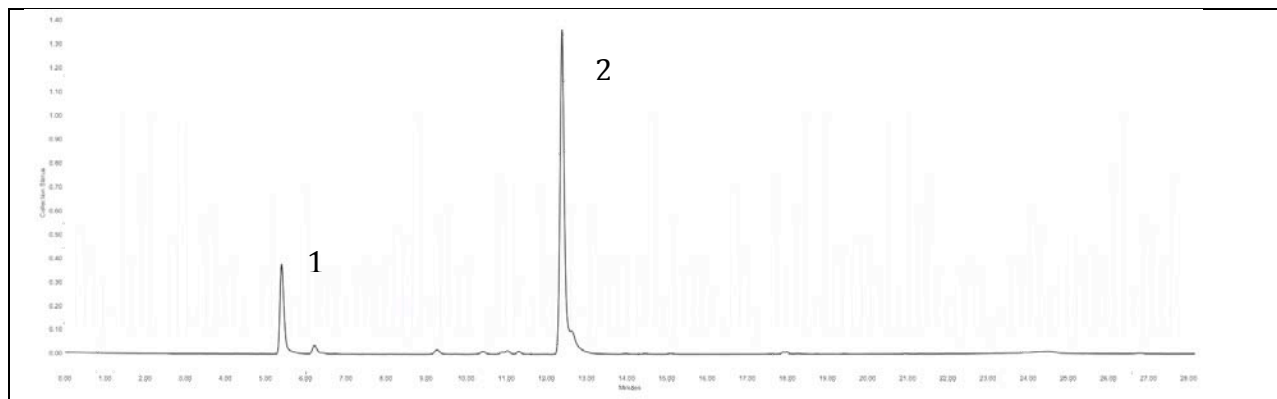


**Figura 10.** Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones L1-4<sub>1</sub> - L1-4<sub>9</sub> ( $\lambda = 254$  nm).

La separación y purificación de los compuestos de interés presentes en la fracción primaria L1-4<sub>4</sub> (189 mg) se realizó mediante el escalamiento de las condiciones analíticas a nivel preparativo: en una columna Phenomenex Gemini C18 (5  $\mu$ m, 250  $\times$  21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico 1% (A) y MeCN (B); gradiente 55 a 100% (B);

tiempo de corrida: 32 min; flujo: 21.24 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm; tiempo de recolección: cada 15 segundos (**Figura 11**).

Este procedimiento permitió el aislamiento de dos compuestos identificados como, la *o*-metilmeleina ((**1**)  $t_R$  5.24 min; 13.8 mg) y la 5-carbometoximeleina ((**2**)  $t_R$  12.24 min; 10.9 mg).



**Figura 11.** Análisis cromatográfico por HPLC a nivel preparativo del fraccionamiento secundario de L1-4<sub>4</sub> ( $\lambda = 254$  nm).

<b>Cuadro 2.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción L1-4 <sub>4</sub> a nivel preparativo.	
Fracción	Peso (mg)
L1-4 <sub>4-1</sub>	13.8
L1-4 <sub>4-2</sub>	2.0
L1-4 <sub>4-3</sub>	10.9
L1-4 <sub>4-4</sub>	31.2
L1-4 <sub>4-5</sub>	0.7

#### 4.8 Caracterización de los productos naturales.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 300 MHz (<sup>1</sup>H)/75 MHz (<sup>13</sup>C) se registraron en los equipos Varian VNMRS o JEOL-ECA 500, respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano

(TMS) utilizado como estándar interno. En todos los casos se empleó  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron por la técnica de electro spray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI+ y ESI-, respectivamente) se registraron en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Inc., MA, EEUU). El registro de los espectros de RMN, EM y DC se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, así como en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, NC, EEUU.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo como parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de metabolitos secundarios de origen fúngico, que presenten una actividad citotóxica importante. Para el cual, se realizó el estudio químico y biológico de hongos microscópicos aislados a partir de una especie de líquen recolectada en un hábitat inexplorado como es la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel en la UNAM.

Para el desarrollo de este trabajo se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1.- Aislamiento de los hongos endoligogénicos a partir de UNA muestra de líquen recolectado en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel en la UNAM.
- 2.- Obtención de los cultivos axénicos de cada una de las especies endoligogénicas aisladas a partir de la fuente natural.
- 3.- Preparación de los cultivos en pequeña escala utilizando las técnicas microbiológicas apropiadas.
- 4.- Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico del extracto orgánico de cada especie sobre las líneas celulares humanas de adenocarcinoma colorrectal (HTC15) y cáncer cervicouterino (HeLA).
- 5.- Realización de los estudios de metabolómica con la finalidad de seleccionar a los candidatos adecuados para la obtención de metabolitos secundarios novedosos y/o no reportados en la base de datos especializada mediante UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS.
- 6.- Preparación del cultivo en mediana escala (30x) y obtención del extracto orgánico de una de las especies más activas seleccionada con base en los resultados obtenidos en los incisos 4 y 5 de este protocolo.
- 7.- Realización del fraccionamiento preliminar del extracto orgánico de la especie seleccionada mediante CCA.
- 8.- Aislamiento y purificación de los constituyentes mayoritarios presentes en las fracciones primarias mediante HPLC.

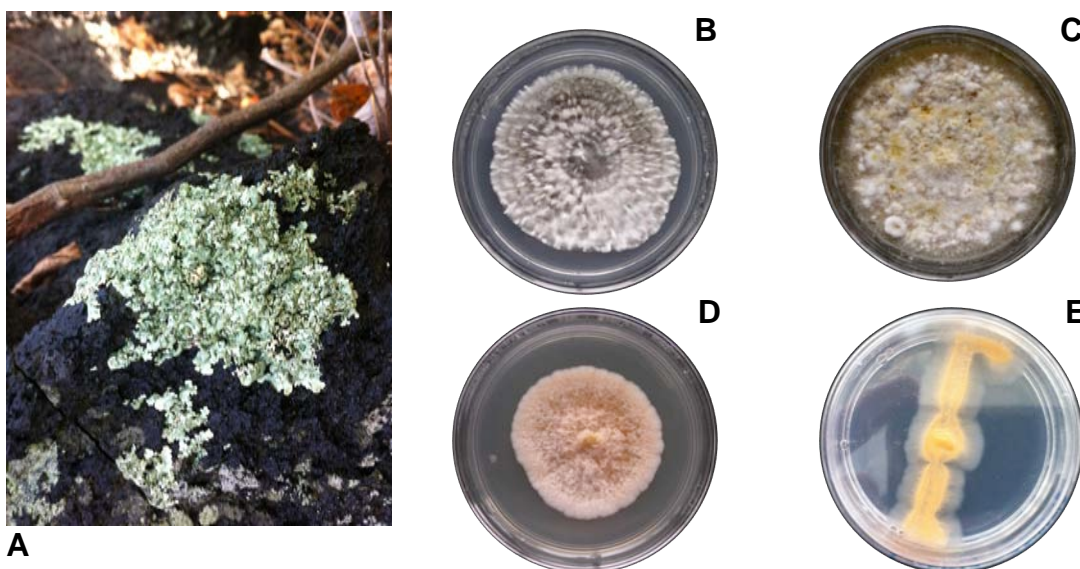
9.- Caracterización de la estructura molecular de los metabolitos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

10.- Evaluación de la actividad citotóxica de los productos puros utilizando el mismo ensayo biológico indicado en el inciso 4 de este protocolo experimental.

Siguiendo la metodología antes descrita, se obtuvieron los resultados que se describen a continuación. En primer lugar se discutirán los resultados derivados del aislamiento de los organismos a partir de su fuente natural y posteriormente se analizarán los resultados derivados del estudio químico de la especie seleccionada.

### 5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos a partir del líquen.

A partir de la muestra de líquen colectada en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, ubicada en el campus de la UNAM (19°19'22" N; 99°10'41" O), empleando las técnicas descritas con detalle en el inciso 4.1 (parte experimental), se realizó el aislamiento axénico de cuatro taxones fúngicos endolicogénicos (**Figura 12**).



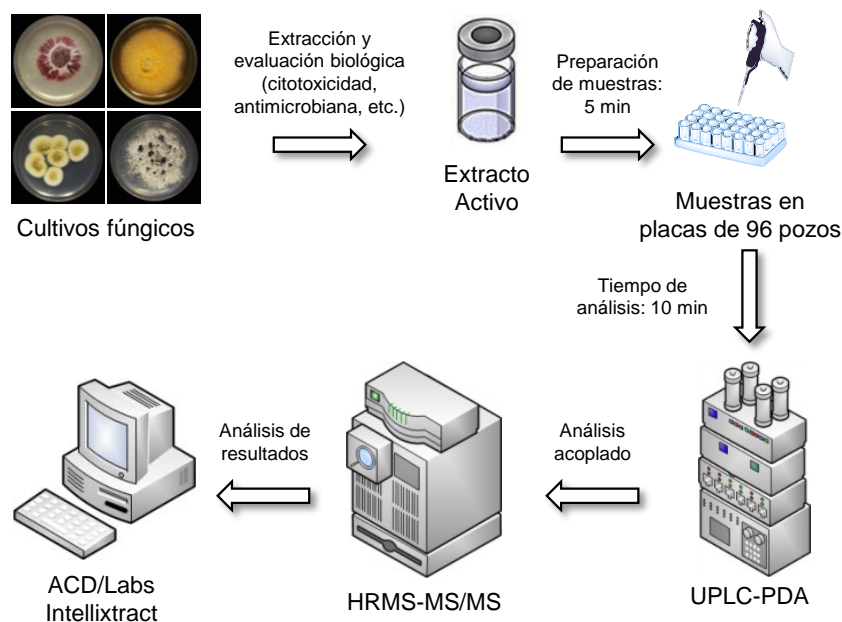
**Figura 12.** Líquen sobre roca volcánica (A); especies endolicogénicas aisladas: L1-4 (B), L1-7 (C), L1-12 (D) y L1-14 (E).

A continuación, se realizó la fermentación de las especies fúngicas aisladas en pequeña escala. Para este propósito, se prepararon cultivos en sustrato sólido empleando arroz húmedo y como se indica en el inciso **4.2** de la parte experimental. Posterior al periodo de fermentación, se prepararon los extractos orgánicos correspondientes mediante los procesos de maceración y partición (inciso **4.3**, parte experimental). Enseguida, cada extracto fue evaluado para establecer su potencial citotóxico empleando las líneas celulares de HCT15 y HeLA de humano, a las concentraciones de prueba de 2 y 20  $\mu\text{g/mL}$ . Los resultados obtenidos en ésta evaluación biológica se resumen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Resultados de las evaluaciones biológicas, estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados y rendimientos obtenidos de los extractos en pequeña y mediana escala.

Clave	Fuente de obtención	Rendimiento (mg)	Ensayo de citotoxicidad (% crecimiento)				Estudio de derreplicación	Rendimiento 30x (g)
			HCT15		HeLA			
			2 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$		
L1-4	Liquen	171.7	108.5	3.4	81.1	2.1	Ternatina y peróxido de ergosterol	1.3979
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	-	0.761
L1-14	Liquen	89.3	100.4	2.0	133.8	4.3	Ácido abscísico	

Posteriormente, se realizaron los estudios de metabolómica utilizando la técnica acoplada de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, como se indica en el inciso **4.4** (parte experimental) y siguiendo el procedimiento (**Figura 13**) desarrollado por El-Elimat y colaboradores (2013).

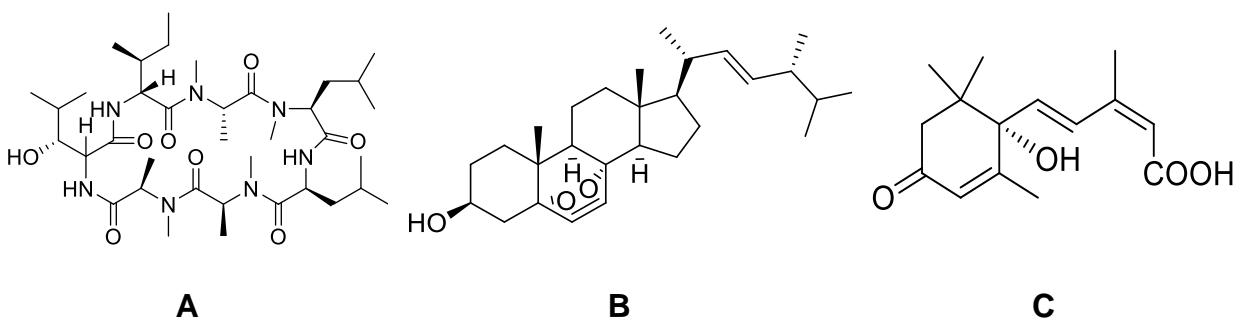


**Figura 13.** Diagrama de flujo de la metodología para la realización de los estudios de derreplicación de los extractos orgánicos (adaptado de El-Elimat *et al.*, 2013).

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 la especie fúngica que presentó una actividad biológica significativa (porcentaje de inhibición del crecimiento celular mayor al 80% a la concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ ), y que no contenía a las micotoxinas reportadas en la base de datos utilizada con fines comparativos en los estudios de derreplicación (Bautista López, 2014). Con base en estos análisis, se seleccionó a la especie endolicogénica L1-4 para su estudio químico (**Tabla 2**).

Como se desprende de los resultados enlistados en la **Tabla 2**, la especie seleccionada L1-4 fue capaz de abatir el crecimiento celular de HCT15 y HeLa con un porcentaje de inhibición mayor al 80% a la concentración de 20  $\mu\text{g/mL}$ . Por otra parte, los estudios de metabolómica indicaron que sólo dos metabolitos secundarios presentes en el extracto orgánico muestran similitud con aquellas moléculas reportadas en la base de datos especializada (**Figura 14**). A pesar de que la ternatina ha sido reportado como un

metabolito citotóxico, se decidió estudiar a la especie L1-4 debido a que su concentración fue muy escasa.



**Figura 14.** Ternatina (A), peróxido de ergosterol (B), ácido abscísico (C)

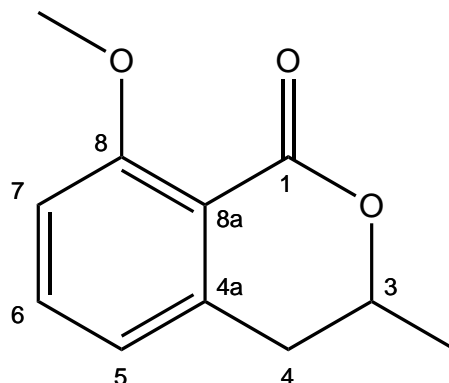
## 5.2 Estudio químico de la especie fúngica L1-4.

Con la finalidad de separar y purificar a los constituyentes presentes en la especie endolicogénica L1-4, se realizó, en primer lugar, la preparación del extracto orgánico en mediana escala (30x), siguiendo la metodología descrita en el inciso 4.3 de la parte experimental.

### 5.2.1 Estudio químico del extracto en mediana escala.

El fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala (1.3979 g, **Tabla 2**), empleando CCA y gel de sílice como fase estacionaria, como se indica en el punto 4.6 de la parte experimental, generó un conjunto de nueve fracciones primarias. A partir de los perfiles cromatográficos obtenidos mediante CLAE de cada una de las fracciones primarias obtenidas (**Figura 10**), se seleccionó a la fracción L1-4<sub>4</sub> (189.0 mg) para la separación de sus componentes individuales debido a que es la fracción que presentó el mejor rendimiento y su complejidad cromatográfica fue menor. La purificación de los productos se llevó a cabo mediante HPLC preparativo; permitiendo el aislamiento de 13.8 mg (L1-4<sub>4-1</sub>) y 10.9 mg (L1-4<sub>4-3</sub>) de los productos identificados con los nombres de *o*-metilmeleina (**1**) y 5-carbometoximeleina (**2**), respectivamente. La elucidación de los compuestos se realizó mediante el análisis de sus espectros de RMN y HRMS, como se describe brevemente a continuación.

### 5.2.1.1 Caracterización de la *o*-metilmeleína (1).



**Figura 15.** *o*-metilmeleína (1).

El producto **1** se aisló como un compuesto cristalino blanco (p.f. 88-89 °C). Los análisis por LC-ESIMS permitieron determinar la fórmula molecular del compuesto como  $C_{11}H_{12}O_3$  ( $m/z$  192.08 uma), la cual permite 7 grados de insaturación (**Figura 15**). El análisis detallado de los espectros en el UV y de RMN (**Tabla 3**; **Figuras 16** y **17**) reveló que el compuesto **1** presenta un perfil característico de una dihidroisocumarina sustituida en las posiciones 3 y 8 del núcleo base. Las evidencias más importantes observadas en los espectros de RMN para la elucidación inequívoca de **1** se describen a continuación:

a) En  $\delta_H$  7.46 (t,  $J = 7.5$  Hz, H-6), 6.93 (d,  $J = 9.0$  Hz, H-5) y 6.81 (d,  $J = 9.0$  Hz, H-7) se observan tres señales asignables a los protones del núcleo aromático de la dihidroisocumarina. En el espectro de  $^{13}C$  RMN las señales para este anillo aparecen en  $\delta_C$  161.2 (C-1), 74.1 (C-3), 36.1 (C-4), 141.9 (C-4a), 119.1 (C-5), 134.4 (C-6), 110.9 (C-7), 162.7 (C-8), 113.6 (C-8a).

b) En  $\delta_H$  4.56 (m) y en  $\delta_H$  2.9 (dd,  $J = 17.9, 11.7$  Hz) se observan dos conjuntos de señales que evidencian la presencia de un grupo metino y otro metileno, respectivamente. Estas señales se asignaron a los protones H-3 y H-4 del núcleo base,

mediante el análisis de las correlaciones COSY observadas entre los protones vecinos del grupo metilo ubicado en C-3 (**Figura 18**).

c) En  $\delta_C$  161.2 (C-1) y 56.1 (8-OCH<sub>3</sub>) se observan las señales características para dos carbonos base de oxígeno, uno correspondiente a una función carbonilo y otro a una función éter.

d) Finalmente, en  $\delta_H$  3.95 (s) y 1.49 (d,  $J = 6.0$  Hz) se aprecian dos señales asignables a dos grupos metilo, el primero de ellos base de oxígeno.

El grupo de señales recién descrito, se encuentran en armonía con la estructura del éster metílico de la meleína, al cual se le designó el nombre trivial de *o*-metilmeleína (**1**).

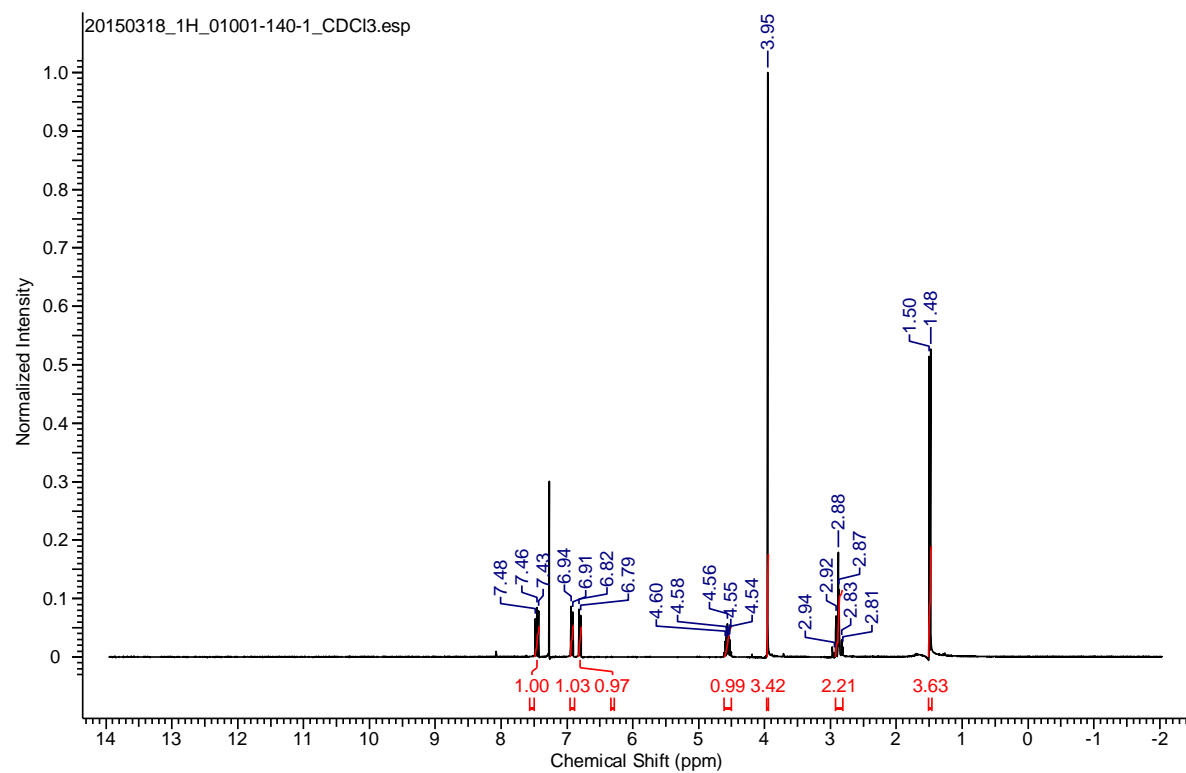
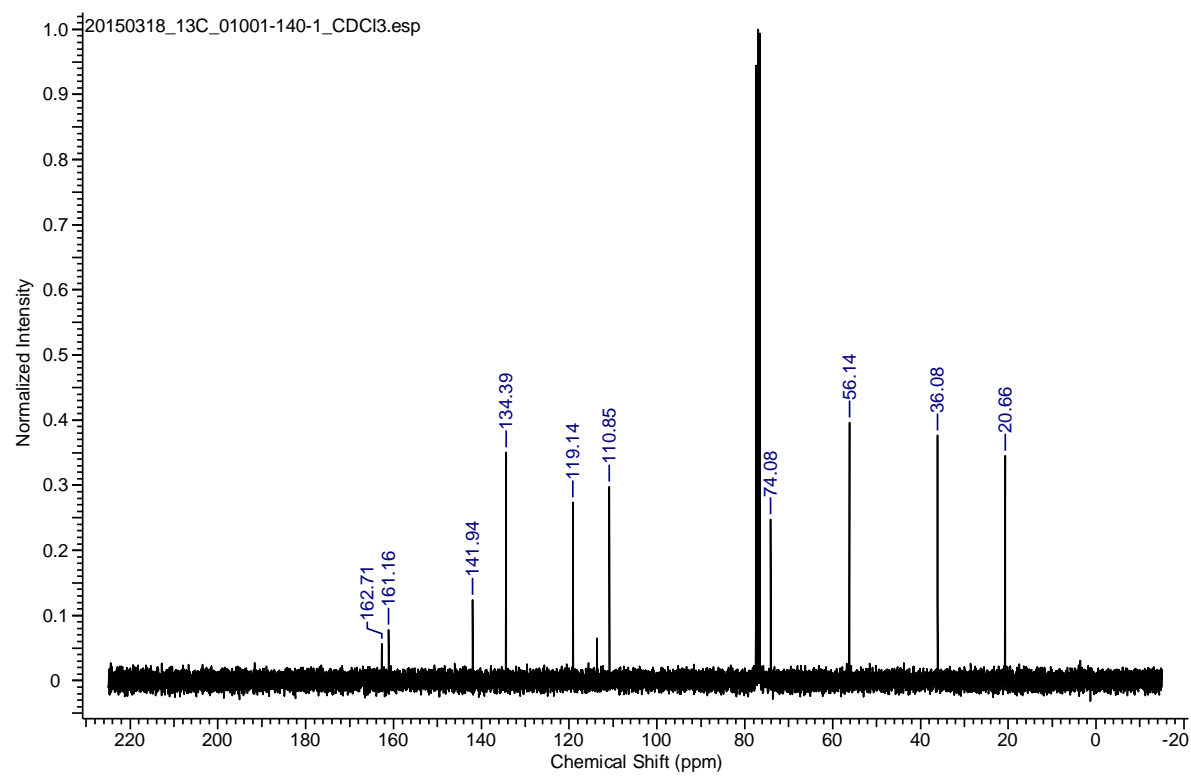
La *o*-metilmeleína ha sido aislada a partir de otras especies fúngicas como son: *Botryosphaeria obtusa*, *Eutypa lata* y *Septoria nodorum*, (Krohn *et al.*, 1997; Sumarah *et al.*, 2008; Bunyapaiboonsri *et al.*, 2010). Sin embargo, la presencia de este producto en un organismo endoligocénico no ha sido reportada en la literatura científica.

Por otra parte, se ha establecido que la 5-metilmeleína y algunos de sus derivados como la *o*-metilmeleína, presentan propiedades antibacterianas, antimicóticas y citotóxicas importantes (Krohn *et al.*, 1997; Bunyapaiboonsri *et al.*, 2010; Ballia, 1966).

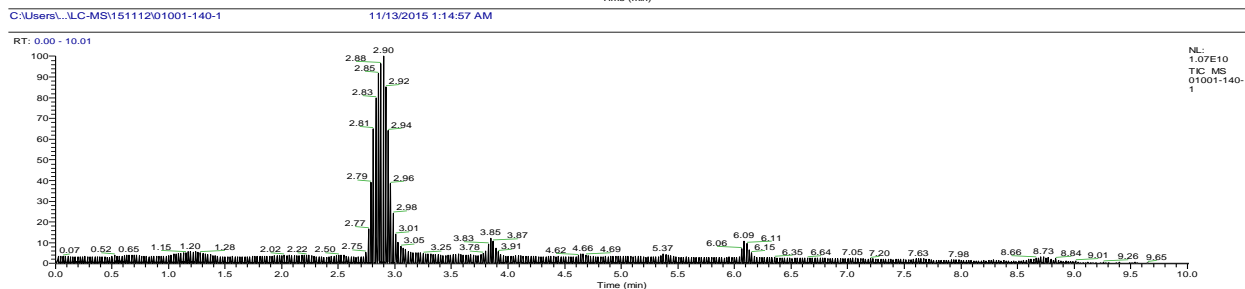
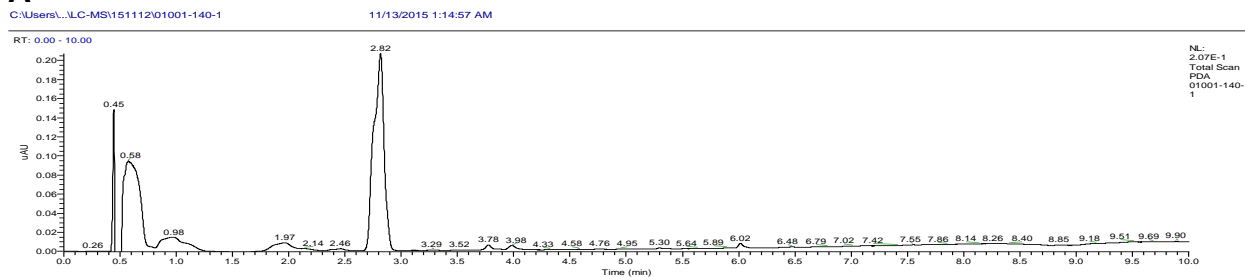
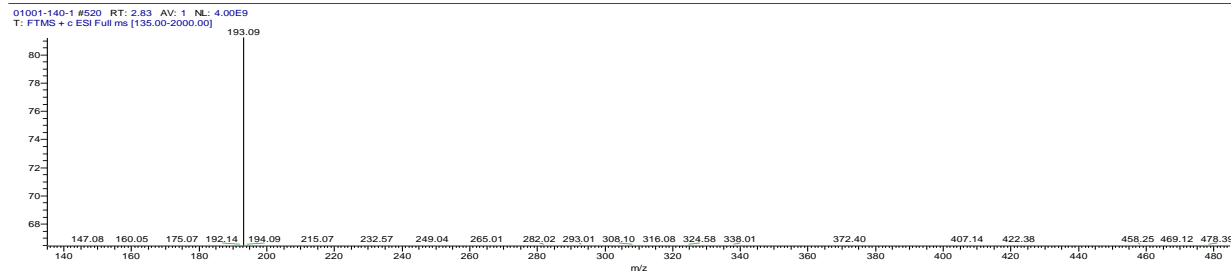
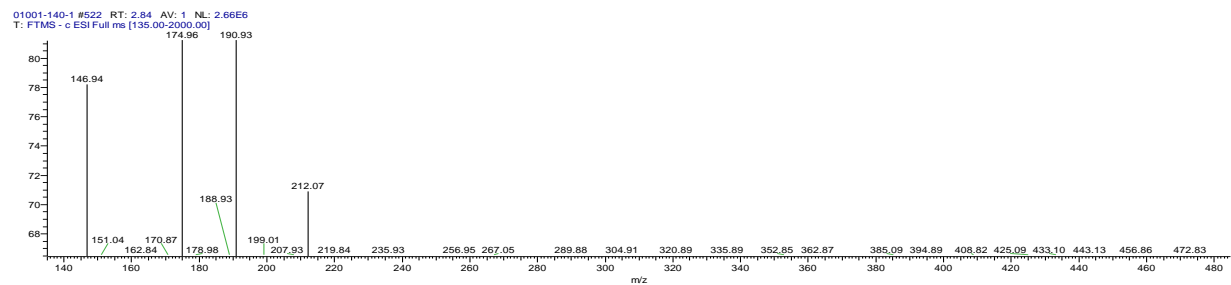
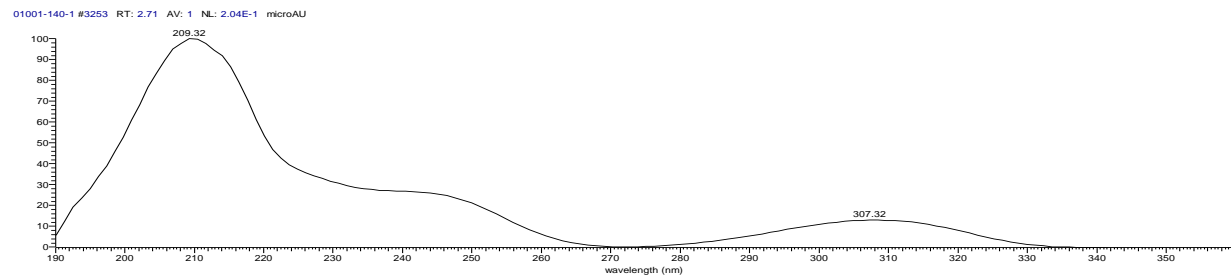
**Tabla 3.** Datos espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$ , 300 MHz;  $^{13}\text{C}$  75 MHz;  $\delta$  en ppm;  $J$  en Hz) 8-metilmeleína (**1**) y de la 5-carbometoximeleína (**2**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Posición	8-metilmeleína ( <b>1</b> )		5-carbometoximeleína ( <b>2</b> )	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		161.2		170.0
3	4.56 m	74.1	4.67 m	75.6
4	2.9 dd ( $J = 17.9, 11.7$ )	36.1	3.04 dd ( $J=16.7,$ 3.5) 3.87 dd ( $J=16.7,$ 11.4)	32.6
4a		141.9		143.4
5	6.93 d ( $J =$ 9.0)	119.1		118.6
6	7.46 t ( $J = 7.5$ )	134.4	8.13 d ( $J = 9.0$ )	138.5
7	6.81 d ( $J =$ 9.0)	110.9	6.94 d ( $J = 9.0$ )	116.2
8		162.7		165.5
8a		113.6		108.9
8-OH			11.84 s	
3- $\text{CH}_3$	1.49 d ( $J =$ 6.0)	20.7	1.57 d ( $J=6.0$ )	20.7
5- $\text{CO}_2\text{CH}_3$				166.1
$\text{OCH}_3$	3.95 s	56.1	3.89 s	52.0

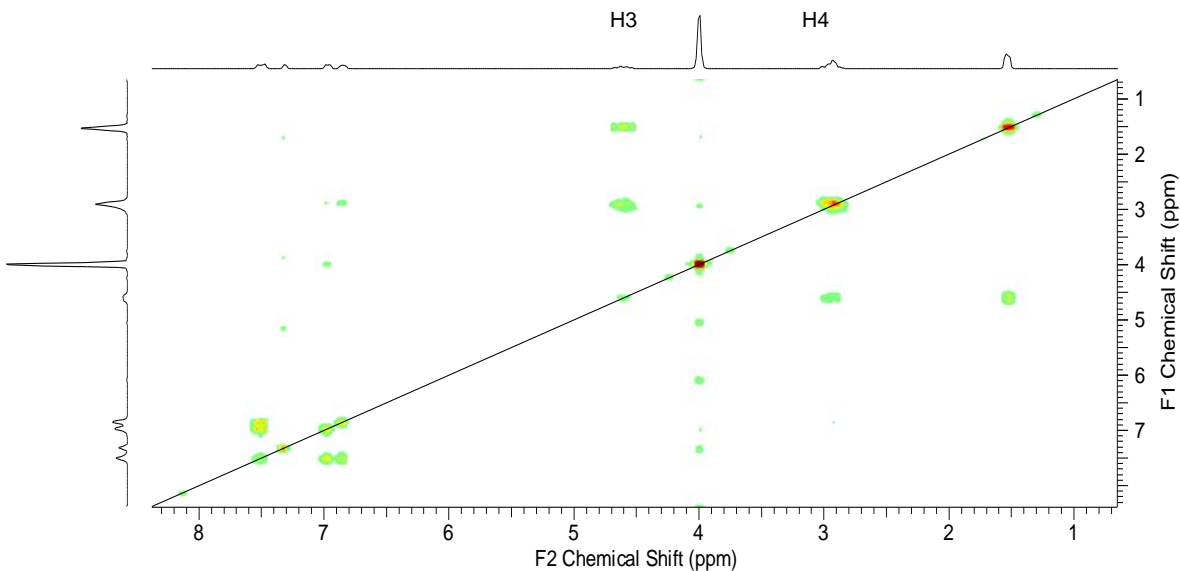


**A****B**

**Figura 16.** Espectros de (A)  $^1\text{H}$  RMN y (B)  $^{13}\text{C}$  RMN de la *o*-metilmeleína (1).

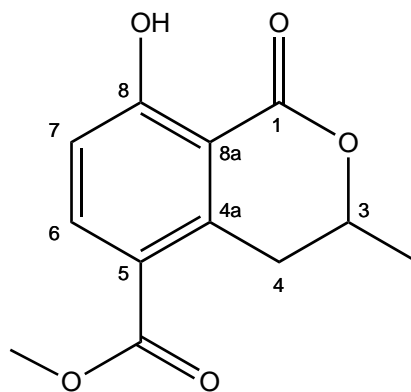
**A****B**

**Figura 17. (A)** Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la *o*-metilmeleína (**1**).



**Figura 18.** Espectro COSY de la *o*-metilmeleína (1)

#### 5.2.1.2 Caracterización de la 5-carbometoximeleína (2)



**Figura 19.** 5-carbometoximeleína (2).

El ion molecular observado en el espectro de ESIMS para el producto natural **2** corresponde con la fórmula  $C_{12}H_{12}O_5$  (236.7327 uma) la cual permite 7 grados de insaturación, y fue aislado como un sólido cristalino blanco (**Figura 19**). El análisis comparativo de los espectros de RMN de los productos **1** y **2** (**Tabla 3**, **Figura 20** y **21**) permitió establecer que el producto **2** es también una dihidroisocumarina. Las

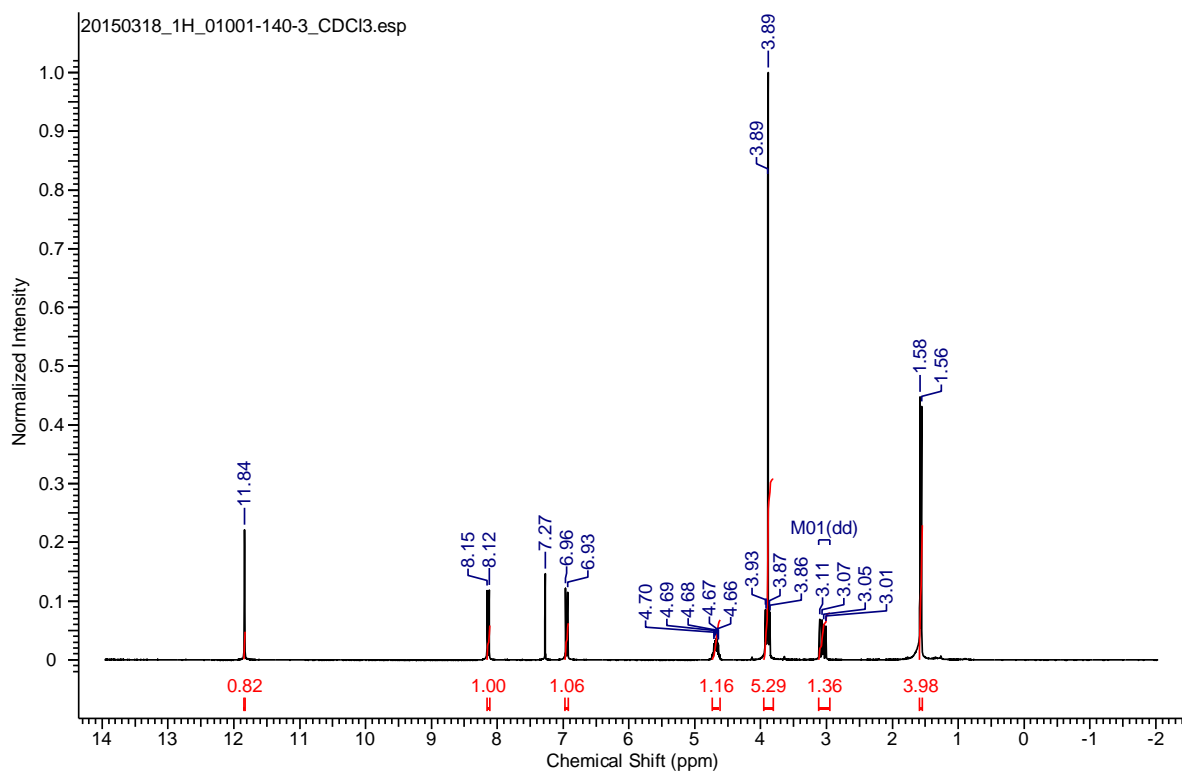
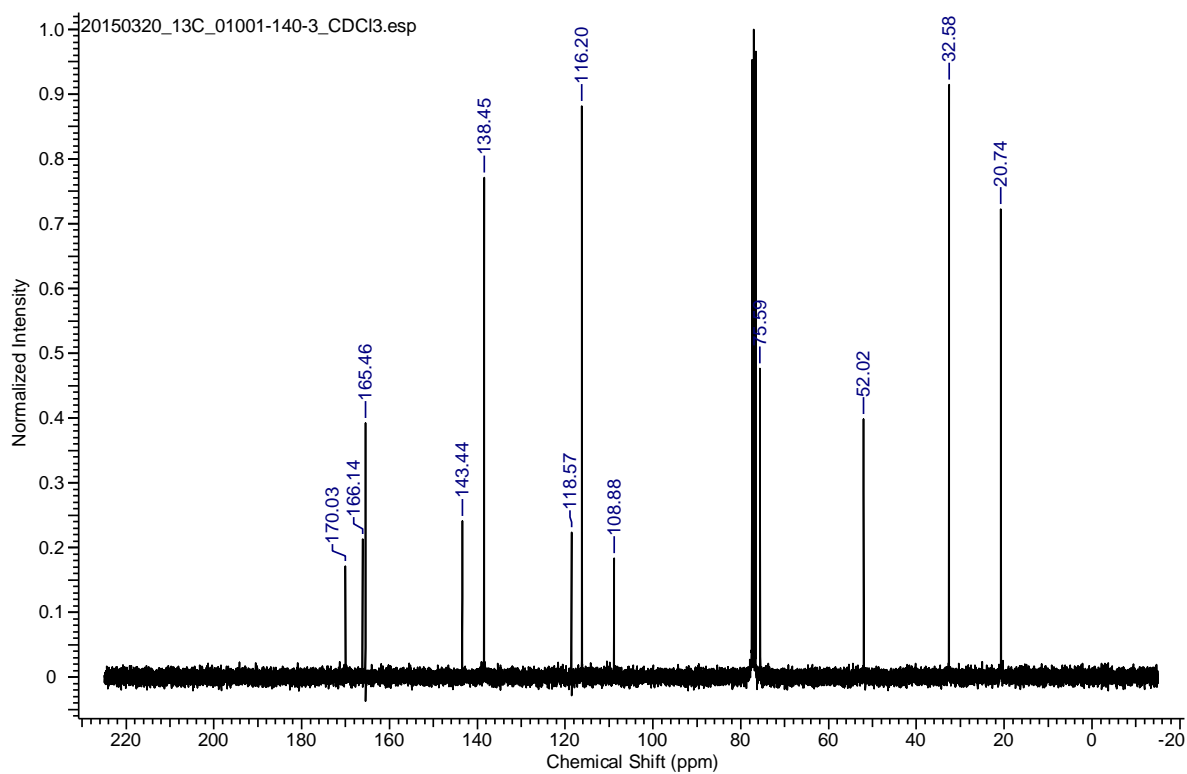
características generales que permitieron la elucidación del producto **2** se describen a continuación:

a) En  $\delta_H$  8.13 (d,  $J = 9.0$  Hz, H-7) y 6.94 (d,  $J = 9.0$  Hz, H-6), se observan dos conjuntos de señales asignables a los protones aromáticos del núcleo de dihidroisocumarina. En el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN las señales para este núcleo aparecen en  $\delta_C$  170.0 (C-1), 75.6 (C-3), 32.6 (C-4), 143.4 (C-4a), 118.6 (C-5), 138.5 (C-6), 116.2 (C-7), 165.5 (C-8) y 108.9 (C-8a) (**Figura 20**).

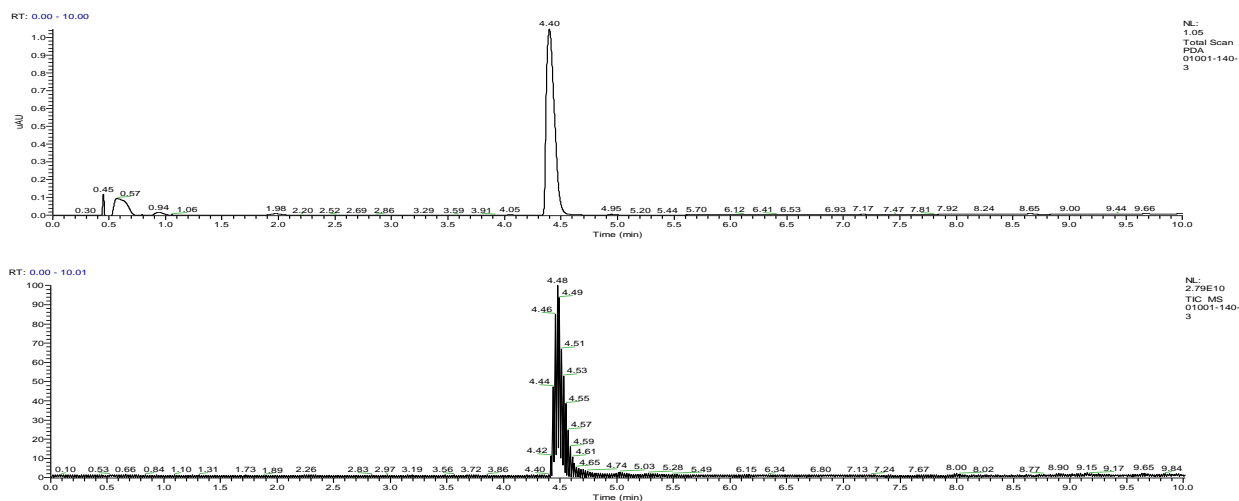
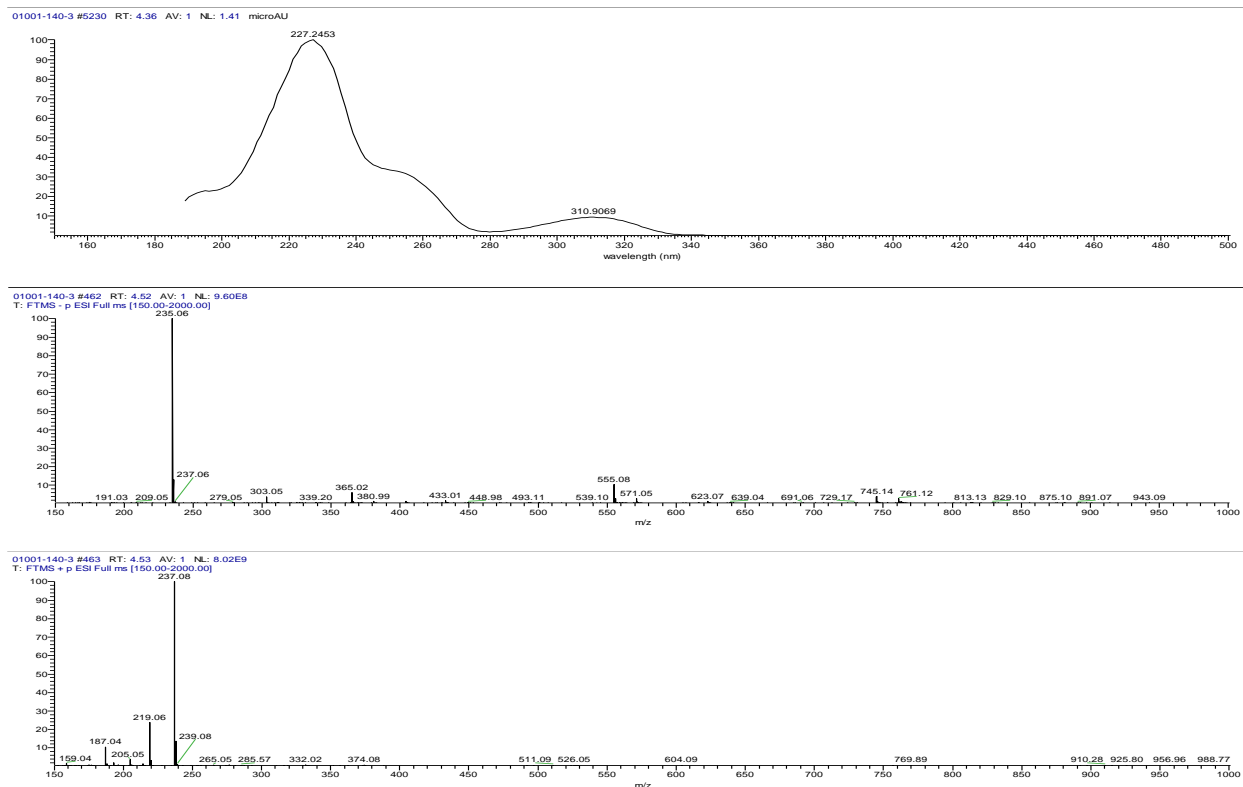
b) En  $\delta_H$  4.67 (m) y en  $\delta_H$  3.87 (dd,  $J = 16.7, 11.4$  Hz) y 3.04 (dd,  $J = 16.7, 3.5$  Hz) se observan señales para un grupo metino y otro metileno, respectivamente. Estas señales se asignaron a los protones H-3 y H-4, respectivamente con base en las correlaciones observadas en el espectro COSY (**Figura 22**).

c) Finalmente, en  $\delta_H$  3.89 (s) y 1.57 (d,  $J = 6.0$  Hz) se aprecian dos señales asignables a dos grupos metilo, el primero base de oxígeno de un grupo éter metílico. Adicionalmente, en  $\delta_H$  11.84 (s) se observa un singulete diagnóstico para un protón de un grupo hidroxilo quelatado en la posición C-8 (**Tabla 3**).

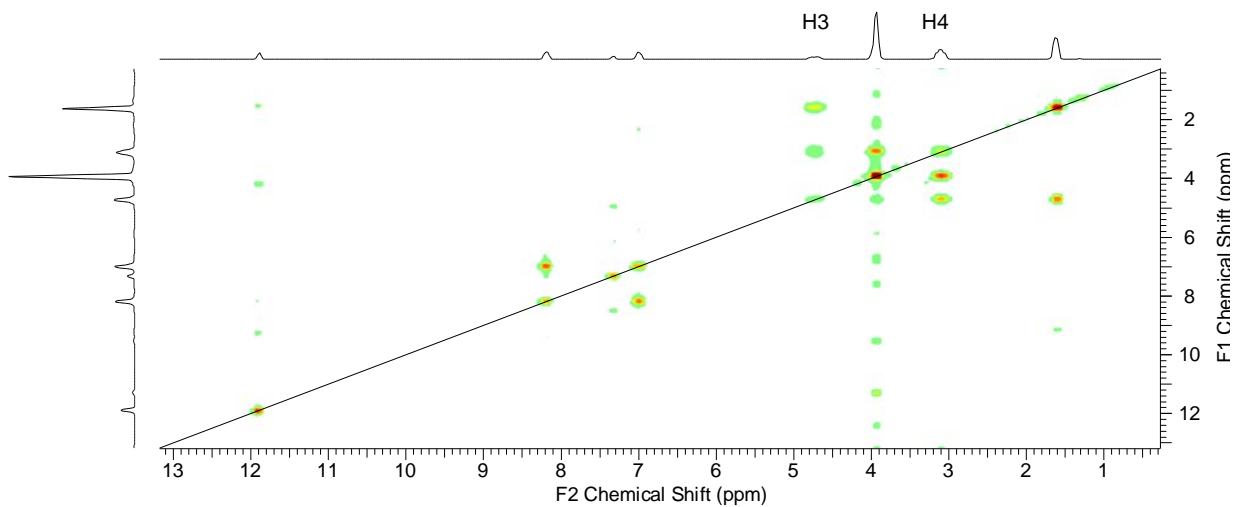
Con base en las evidencias espectroscópicas descritas, el producto **2** se caracterizó con el nombre trivial de la 5-carboximetoximeleína (**2**). Este compuesto fue aislado previamente como el principal metabolito de la especie *Hypoxylon mammatum*; su enantiómero 3(S) también fue aislado de *Tubercularia* sp., un hongo endófito de la especie *Taxus mairei* (Sumarah, *et al.*, 2008). Algunas especies como *Biscogniauxia nummularia*, *B. marginata* y *B. mediterranea* se caracterizan por sintetizar a la 5-metilmeleína, como el componente característico y mayoritario del género. También se ha obtenido de especies de *Hypoxylon*. Así mismo, existe evidencia de que este compuesto y sus derivados (por ejemplo, la 5-formilmeleína y la 5-carbometoximeleína) están implicados en algunas enfermedades en plantas. Esta familia de compuestos ha sido reconocida por sus propiedades antimicrobianas (Whalley, 1996; Stadler *et al.*, 2007; Evidente *et al.*, 2005).

**A****B**

**Figura 20.** Espectros de (A)  $^1\text{H}$  RMN y (B)  $^{13}\text{C}$  RMN de la 5-carboximetoimeleína (2)

**A****B**

**Figura 21. (A)** Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) de la 5-carboximetoximeleína (2).



**Figura 22.** Espectro COSY de la 5-carboximetoximeleína (**2**).

## 6.- CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento axénico de cuatro taxones fúngicos endolicogénicos a partir de una fuente natural liquénica proveniente de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel en la UNAM.
- La evaluación biológica de los extractos orgánicos de las cuatro especies fúngicas aisladas, utilizando como ensayo de monitoreo la actividad citotóxica contra dos líneas celulares cancerígenas humanas, hizo posible la selección de la especie fúngica L1-4 para el descubrimiento de moléculas biodinámicas con posible actividad anticancerígena.
- Los estudios de derreplicación permitieron identificar a algunos de los metabolitos producidos por los organismos mediante el análisis comparativo con una base de datos de micotoxinas fúngicas. Así, los organismos con resultados negativos posiblemente produzcan moléculas novedosas.
- El fraccionamiento del extracto orgánico obtenido a partir del aislamiento fungico de L1-4 permitió el aislamiento y caracterización de dos moléculas de tipo dihidroisocumarinas, cuyo aislamiento a partir de una fuente endolicogénica no ha sido reportado en la literatura.



## **7.- PERSPECTIVAS.**

- Continuar con el estudio químico de la especie endoligocénica L1-4 con la finalidad de obtener a los productos mayoritarios presentes.
- Realizar la evaluación del potencial citotóxico de los metabolitos aislados con el objetivo de identificar a los principales responsables de la actividad biológica mostrada por el extracto orgánico.
- Determinar la configuración absoluta de los centros quirales de los compuestos mediante técnicas espectroscópicas (dicroísmo circular, rotación óptica) y métodos computacionales.
- Realizar la identificación taxonómica de las especies fúngicas aisladas mediante el análisis de la subunidad 16s molecular y del espaciador de transcripción interno (ITS) del ADN ribosomal.

## 8.- BIBLIOGRAFÍA.

- Abhijeet Singh, Y. M. (2014). Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, s8(01). <http://doi.org/10.4172/1948-5948.S8-004>
- Aguirre-Acosta, E., Ulloa, M., Aguilar, S., Cifuentes, J., & Valenzuela, R. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), 76–81. <http://doi.org/10.7550/rmb.33649>
- Basmadjian, C., Zhao, Q., Bentouhami, E., Djehal, A., Nebigil, C. G., Johnson, R. a, ... Désaubry, L. G. (2014). Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in Chemistry*, 2(May), 20. <http://doi.org/10.3389/fchem.2014.00020>
- Braca, A., Bader, A., & De Tommasi, N. (2012). *Plant and Fungi 3,4-Dihydroisocoumarins*. BS:SNPC (Vol. 37). Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-444-59514-0.00007-9>
- Cragg, G. M., & Newman, D. J. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), 3670–3695. <http://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>
- Data, P., & References, B. (1993). CHCD dictionary of natural products on CD-ROM. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 18(1), 114. [http://doi.org/10.1016/0169-7439\(93\)80050-R](http://doi.org/10.1016/0169-7439(93)80050-R)
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Ehrmann, B. M., Cech, N. B., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2013). High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of Natural Products*, 76(9), 1709–1716. <http://doi.org/10.1021/np4004307>
- El-Elimat, T., Figueroa, M., Raja, H. a, Adcock, A. F., Kroll, D. J., Swanson, S. M., ... Oberlies, N. H. (2013). Waol A, trans-dihydrowaol A, and cis-dihydrowaol A: polyketide-derived  $\gamma$ -lactones from a *Volutella* species. *Tetrahedron Letters*, 54(32), 4300–4302. <http://doi.org/10.1016/j.tetlet.2013.06.008>
- Evidente, A., Andolfi, A., Maddau, L., Franceschini, A., & Marras, F. (2005). Biscopopyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. *Journal of Natural Products*, 68(4), 568–571. <http://doi.org/10.1021/np049621m>
- Herrera-Campos, M. D. L. Á., Lücking, R., Pérez-Pérez, R. E., Miranda-González, R., Sánchez, N., Barcenás-Peña, A., ... Nash, T. H. (2014). Biodiversidad de líquenes en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(544), 82–99.

<http://doi.org/10.7550/rmb.37003>

- Huryn, D. M., & Wipf, P. (2014). *Chapter 3 - Natural Product Chemistry and Cancer Drug Discovery. Cancer Drug Design and Discovery* (Second Edi). Elsevier. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-396521-9.00003-6>
- Kannangara, B. T. S. D. P., Rajapaksha, R. S. C. G., & Paranagama, P. a. (2009). Nature and bioactivities of endolichenic fungi in *Pseudocyphellaria* sp. , *Parmotrema* sp. and *Usnea* sp. at Hakgala montane forest in Sri Lanka. *Letters in Applied Microbiology*, *48*(2), 203–209. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02512.x>
- Logesh, a R., Thillaimaharani, K. a, Sharmila, K., Kalaiselvam, M., & Raffi, S. M. (2012). Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *2*(2), 140–3. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60208-6](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60208-6)
- Lot, A., & Cano-Santana, Z. (2009). Biodiversidad del ecosistema del Pedregal de San Ángel. *Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF*. <http://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.006>
- Mishra, Y., & Singh, A. (2014). Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, *s8*(01). <http://doi.org/10.4172/1948-5948.S8-004>
- Parkin, D. M. (2001). Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncology*, *2*(9), 533–543. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(01\)00486-7](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(01)00486-7)
- Stadler, M. (2011). Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, *1*(2), 75–133. <http://doi.org/10.5943/cream/1/2/1>
- Stadler, M., Fournier, J., Quang, D. N., & Akulov, A. Y. (2007). Metabolomic studies on the chemical ecology of the Xylariaceae (Ascomycota). *Natural Product Communications*, *2*(3), 287–304.
- Sumarah, M. W., Puniani, E., Blackwell, B. a, & Miller, J. D. (2008). Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. *Journal of Natural Products*, *71*(8), 1393–8. <http://doi.org/10.1021/np800192f>
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protocols*, *1*(3), 1112–1116. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.179>
- Whalley, a. J. S. (1996). The xylariaceous way of life. *Mycological Research*, *100*(8),

897–922. [http://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80042-6](http://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80042-6)