



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO FITOTÓXICO DE METABOLITOS
SECUNDARIOS AISLADOS A PARTIR DE HONGOS ENDÓFITOS
SELECTOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

KAREN YAMELI LÓPEZ CARDEÑA



CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

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

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

SUSTENTANTE:

Karen Yameli López Cardeña

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

AGRADECIMIENTOS

- Al financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación a través de los proyectos DGAPA-PAPIIT IA205017, CONACyT CB-2014 236564 y PAIP 5000-9145, a cargo del Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar.
- A la Unidad de Servicios Analíticos e Instrumentales (USAI), FQ, UNAM, por su apoyo para la realización de los análisis de RMN.
- De manera muy especial agradezco a los miembros del jurado, por toda su valiosa ayuda en la revisión del trabajo.

ÍNDICE

LISTA DE CUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Búsqueda de agentes herbicidas de origen natural	1
1.2 Antecedentes del género <i>Tillandsia</i>	6
1.3 Antecedentes del género <i>Biscogniauxia</i>	8
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	10
4. PARTE EXPERIMENTAL	11
4.1 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala	11
4.2 Preparación de extractos orgánicos	11
4.3 Ensayos biológicos	12
4.3.1 Evaluación de la actividad fitotóxica mediante el método de bioautografía	12
4.3.2 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico	13
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
6. CONCLUSIONES	22
7. BIBLIOGRAFIA	23

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Ejemplos selectos de malezas ampliamente reconocidas en México y resistentes al efecto de herbicidas.	2
2	Metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos.	4
3	Rendimiento de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala a partir de los organismos fúngicos seleccionados.	15
4	Efecto de los extractos orgánicos sobre la inhibición de la germinación de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	16
5	Efecto de los extractos orgánicos sobre la inhibición del crecimiento radicular de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i>	17
6	Estructuras de los compuestos aislados del hongo endófito <i>Biscogniauxia</i> sp. (P11-7)	18
7	Actividad fitotóxica preliminar de los compuestos puros sobre las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	19
8	Efecto de los compuestos puros sobre el crecimiento radicular e inhibición de la germinación de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i> .	20

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Compuestos de origen microbiano utilizados como herbicidas.	3
2	Especies de <i>Tillandsia</i> (epífitas) de zonas tropicales y desierto.	7
3	Especies de <i>Tillandsia</i> utilizadas en la medicina tradicional: <i>T. recurvata</i> y <i>T. usneoides</i> .	8
4	Ejemplos de hongos del género <i>Biscogniauxia</i> : <i>B. nummularia</i> y <i>B. marginata</i> .	9

Lista de abreviaturas

ACAC	Acetil coenzima A carboxilasa
ALS	Acetolactato sintetasa
µg	Microgramo
Cm	Centímetro
µL	Microlitro
H₂O	Agua
CHCl₃	Cloroformo
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol
G	Gramo
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
ppm	Partes por millón
Rpm	Revoluciones por minuto
Rf	Factor de retención
YESD	Medio de cultivo de extracto de levadura, peptona y dextrosa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Búsqueda de agentes herbicidas de origen natural

La biodiversidad de nuestro país, la cual representa uno de los recursos naturales más importantes a nivel mundial, merece ser estudiada con mayor detalle para su aprovechamiento racional y conservación (Guzmán, 1998). En este sentido, y a pesar de que el porcentaje de especies estudiadas con fines de bioprospección es relativamente bajo, en los últimos años, la investigación científica sobre los recursos naturales de México ha mostrado un avance notable y constante. Así, uno de los grupos de organismos más estudiados química y biológicamente son los hongos microscópicos, y ha permitido el aislamiento e identificación de numerosos metabolitos novedosos con propiedades biológicas interesantes (Mata *et al.*, 2018).

Durante décadas, la agricultura ha enfrentado numerosos problemas de plagas y pestes, los cuales ha provocado pérdidas significativas en los cultivos de importancia económica, disminución del abastecimiento de alimentos, y causando problemas de salud (Singh *et al.*, 2003). Uno de los problemas más comunes en los cultivos es el crecimiento de plantas (malezas) ajenas, las cuales interfieren con el crecimiento y la calidad de los productos finales, además de servir como hábitat de algunos insectos y otros organismos que pudieran resultar patógenos. Aproximadamente el 12% de las 23,000 especies de plantas superiores registradas en México se consideran malezas, y se estima que existen más de 300 biotipos resistentes a los herbicidas de mayor uso comercial (**Cuadro 1**) (Strobel *et al.*, 1991; Heap, 1997; Cramer, 2000; Warrior, 2000).

Los herbicidas son definidos como productos fitosanitarios compuestos por una o varias sustancias, empleados con la finalidad de eliminar o inhibir el crecimiento de malezas y/o plagas, y se clasifican en diversas categorías químicas destacando los derivados de los ácidos fenoxiacético y fenoxibutírico, las nitroanilinas, los

derivados de urea, los carbamatos, los tiocarbamatos, las triazinas, el fenol, entre otros.

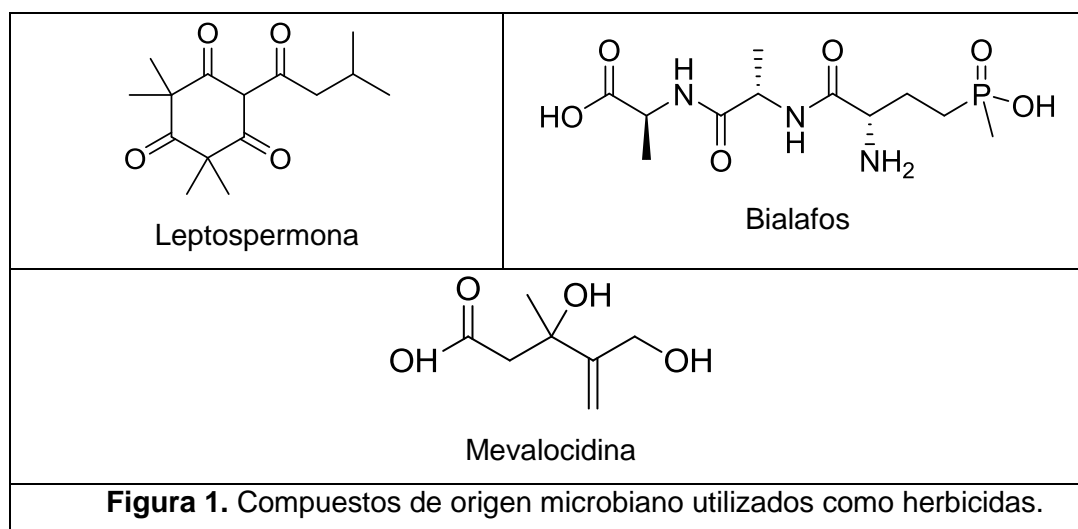
A pesar del éxito de los herbicidas para el control de las malezas, estos productos, que generalmente son de carácter sintético, producen daños irreversibles a los ecosistemas y medio ambiente debido a la gran contaminación que ocasionan en el suelo, aire y agua (Justum *et al.*, 1997). Cabe mencionar que algunos de estos efectos nocivos pueden llegar hasta las partes más altas de la cadena alimenticia, además de generar muerte y problemas en la reproducción, desarrollo y crecimiento de otros organismos y seres humanos. En este contexto, la búsqueda de herbicidas naturales que sean inocuos con el medio ambiente y organismos, se encuentra plenamente justificada.

Cuadro 1. Ejemplos selectos de malezas ampliamente reconocidas en México y resistentes al efecto de herbicidas.

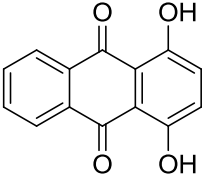
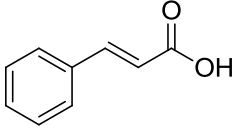
Biotipo	Año	Localidad	Modo de acción	Fuente
<i>Phalaris minor</i>	1996	México	Inhibición de la enzima ACAC ¹	HRAC/Sayre, 1996
<i>Echinochloa</i> sp.	2001	Veracruz y Campeche	Inhibición del fotosistema II	Bolaños <i>et al.</i> , 2001
<i>P. paradoxa</i>	1996	México	Inhibición de la enzima ACAC	HRAC/Sayre, 1996
<i>Avena fatua</i>	1998	Guanajuato, Jalisco y Baja California	Inhibición de la enzima ACAC	HRAC/Tafoya, 1998
<i>Phalaris</i> spp.	2000	León, Guanajuato	ND ²	Medina, 200
<i>Euphorbia heterophylla</i>	2007	Guerrero	Inhibición del fotosistema II	Aguilar <i>et al.</i> , 2007
<i>Sorghum halepense</i>	2009	Veracruz	Inhibición de la ALS	HRAC/Tafoya <i>et al.</i> , 2009

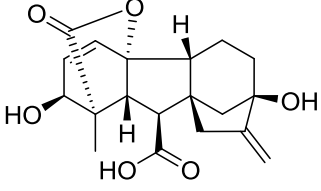
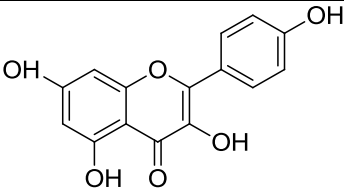
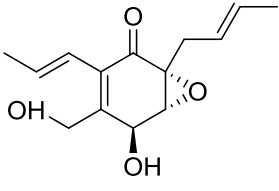
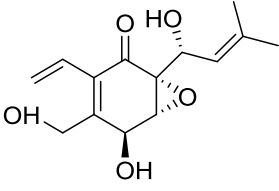
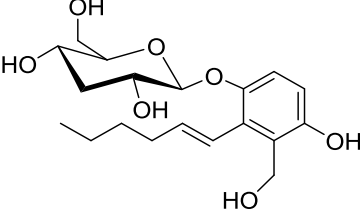
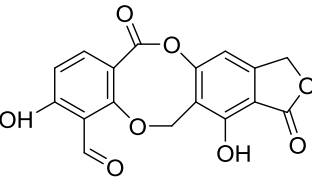
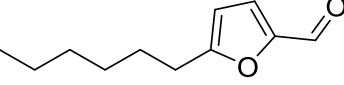
¹ACAC: acetil coenzima A carboxilasa; ²ND: no definido; ³ALS: acetolactato sintetasa.

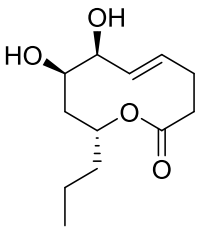
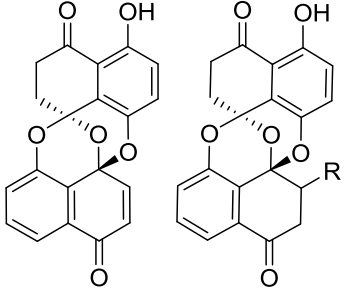
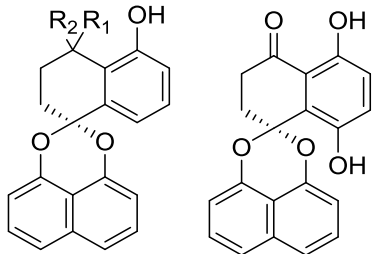
Así, algunas de las ventajas de los herbicidas de origen natural sobre aquellos de origen sintético es que son altamente biodegradables, presentan índices de acumulación bajos, y pueden tener sitios de acción específicos (Duke *et al.*, 2002). Algunos compuestos obtenidos a partir de microorganismos han mostrado tener una gran eficacia como agentes herbicidas (**Figura 1**). Por ejemplo, en 1997 se aisló el primer herbicida natural, la leptospermona de *Callistemon citrinus*, que marcó el inicio de la comercialización de una serie de derivados inhibidores de la enzima 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa. Otro ejemplo relevante es el bialafos, herbicida natural producido por las bacterias *Streptomyces hygroscopicus* y *S. viridochromogenes*, que cuando se metaboliza en la planta se produce el glufosinato, un inhibidor irreversible de la sintetasa de la glutamina (Charles *et al.*, 2012). Recientemente, se ha desarrollado de dos micoherbicidas “orgánicos” elaborados con esporas inactivadas de las especies de hongos *Colletotrichum gloeosporoides* y *Phoma macrostoma*. Finalmente, el aislamiento de la fitotoxina mevalocidina de la especie fúngica *Coniolarrella* sp., ha llamado la atención de numerosos grupos industriales debido a su importante actividad pos-emergente y de larga duración contra numerosas malezas que presentan resistencia a los herbicidas convencionales (Sica *et al.*, 2016).



Dentro de los organismos fúngicos productores de metabolitos secundarios con actividad herbicida se encuentran a los hongos endófitos. Estos organismos han demostrado a través de los años ser muy talentosos en la biosíntesis de productos con diversidad química estructural de interés para su uso tanto en la medicina como agentes antivirales, antibióticos, antifúngicos, insecticidas, nematocidas, entre otros, y en la agricultura (**Cuadro 2**) (Kusari *et al.*, 2012; Kumar, 2012). Específicamente, algunos productos fúngicos que han mostrado tener potencial para el desarrollo de herbicidas son las nonenólidas aisladas de *Phomopsis* sp. HCCB03520, hospedero de las ramas de *Achyranthes bidentata*, que mostraron gran actividad sobre la germinación y el crecimiento de las raíces de *Medicago sativa*, *Trifolium hybridum* y *Buchloe dactyloides* (Ge *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012); las palmarumicinas CP₂, CP₁₇ y CP₁₉ y las preusomerinas EG₁, EG₂, EG₃ y EG₄, aisladas de *Callicarpa acuminata*, especie endófito de *Edenia gomezpompae*, con actividad fitotóxica sobre la germinación, el crecimiento radicular y la respiración durante el proceso de germinación de las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, *Solanum lycopersicum* y *Echinochloa crus-galli*, además de importante actividad contra los fitopatógenos *Phytophthora capsici*, *P. parasítica*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria solani* (Macías *et al.*, 2008; 2014).

Cuadro 2. Metabolitos secundarios bioactivos aislados de hongos endófitos.		
Especie y planta hospedera	Metabolito secundario	Actividad biológica
<i>Gibberella fujikuroi</i> , endófito de <i>Curcuma wenyujin</i>	 1,4-Dihidroxi antraquinona	antibacteriana, anticancerígena
	 Ácido cinámico	antioxidante, antibacteriana

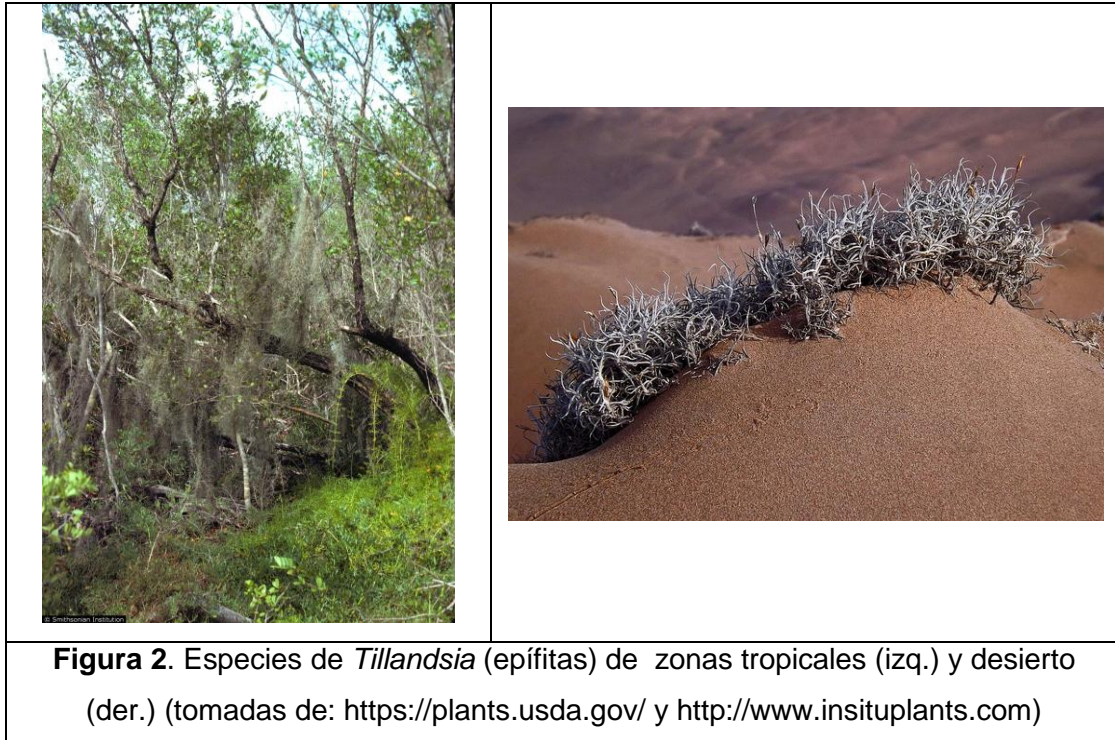
	 <p>Ácido giberélico</p>	auxiliar en la regulación de los procesos fisiológicos de las plantas
	 <p>Kaempferol</p>	antifúngica, anticancerígena
<i>Pestalotiopsis jesteri</i> , endófito de <i>Fragariae bodenii</i>	 <p>Jesterona</p>	antioomiceto
	 <p>Hidroxijesterona</p>	
<i>Pestalotiopsis microspora</i> , endófito de <i>Torreya taxifolia</i>	 <p>Pestalocida</p>	antifúngica, fitotóxica
<i>Cordyceps dipterigen</i> F0307, endófito de <i>Desmotes incomparabilis</i>	 <p>Cordicepsidona A</p>	antifúngica
<i>Oxyporuslate marginatus</i> EF069, endófito de		antifúngica

<i>Capsicum annum L.</i>	5-Pentil-2-furaldehído	
<i>Phomopsis sp.</i> HCCB03520, endófito de <i>Achyranthes bidentata</i>	 <p>6S,7R,9R-6,7-Dihidroxi-9-propilnon-4-eno-9-na</p>	herbicida
<i>Edenia gomezpompae</i> , endófito de <i>Callicarpa acuminata</i>	 <p>EG₁ EG₂ R= OH EG₃ R= OCH₃ EG₄ R= H</p>	antifúngica
	 <p>CP₂ R₁, R₂= O CP₁₇</p>	herbicida

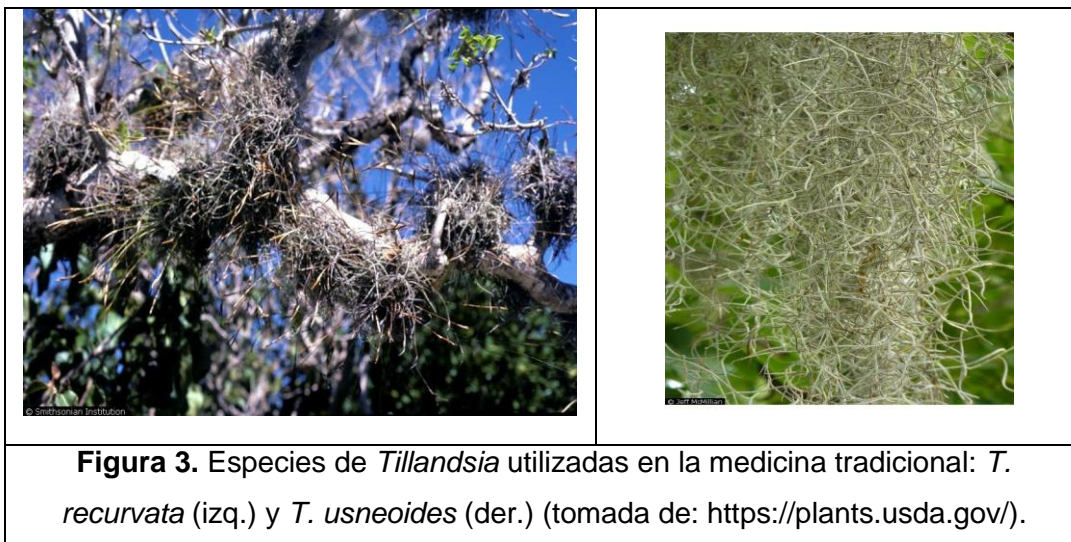
1.2 Antecedentes del género *Tillandsia*

La familia Bromeliaceae comprende alrededor de 1500 especies agrupadas en 50 géneros localizadas en las zonas tropicales y subtropicales de América. Esta familia tiene entre sus miembros más representativos a la piña (*Ananas comosus*), la puya (*Puya raimondii*) y al musgo español (*Tillandsia usneoides*), conocido como “heno” o “pasle” en nuestro país. El género *Tillandsia* es el que

tiene la distribución geográfica más amplia y agrupa al mayor número de especies terrestres y epífitas que pueden desarrollarse tanto en zonas desérticas como tropicales (**Figura 2**) (Sánchez, 2005).



Entre las especies más importantes del género se encuentran *Tillandsia fasciculata*, *T. capillaris*, *T. usneoides* y *T. recurvata*, utilizadas en la medicina tradicional como agentes antitumorales (*T. recurvata*), hipoglucemiantes (*T. usneoides*), antirreumáticos (*T. usneoides*), para tratar enfermedades coronarias (*T. usneoides*), y para edemas, tos y tuberculosis (*T. capillaris*) (Sánchez, 2005). En México, el género *Tillandsia* se distribuye por todo el país, además de ser *T. grossispicata* y *T. inopicata* especies endémicas (Espejo, 2008).



1.3 Antecedentes del género *Biscogniauxia*

Biscogniauxia es un género de hongos perteneciente a la familia *Xylaraceae* que agrupa especies representativas de bosques tropicales, bosques de niebla y ambientes estacionalmente secos. Dentro de este género se encuentran especies con una gran capacidad para metabolizar diversos sustratos, en especial la madera (poliporáceos), además de ser fitopatógenos y/o endófitos, como la especie *B. nummularia* obtenida a partir del ciruelo (*Cephalotaxus harringtonia*) (Amand *et al.*, 2012).

Algunos metabolitos secundarios obtenidos a partir de especies de este género han sido estudiados para establecer las posibles relaciones quimiotaxonómicas entre el organismo y su entorno. Así, las especies *B. nummularia*, *B. marginata* y *B. mediterranea* (**Figura 4**) producen al metabolito 5-metilmeleina, el cual, junto con algunos derivados como la 5-formilmeleina, son agentes causales de algunas enfermedades en las plantas (Whalley, 1996; Stadler *et al.*, 2007; Evidente *et al.*, 2005). Por otra parte, el biscopirano y el ácido fenilacético, aislados de *B. mediterranea*, son agentes fitotóxicos que pueden estar relacionados con el decaimiento de los árboles del género *Quercus*, el roble y el encino (Evidente *et al.*, 2005).



Figura 4. Ejemplos de hongos del género *Biscogniauxia*: *B. nummularia* (izq.) y *B. marginata* (der.) (tomada de: <https://www.mycportal.org>).

2. HIPÓTESIS

La selección de hongos endófitos con base en los resultados de actividad biológica preliminar de inhibición de la germinación y crecimiento radicular de semillas de malezas, permitirá la obtención de compuestos bioactivos con potencial herbicida.

3. OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal realizar la evaluación del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos de al menos dos especies fúngicas selectas, así como de los productos mayoritarios aislados a partir de las especies seleccionadas con la finalidad de detectar nuevas fuentes naturales o compuestos de utilidad para el desarrollo de agentes herbicidas potenciales. Para lograr este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Recopilar la información biológica y química de las especies fúngicas seleccionadas para el desarrollo de la presente investigación.
- 2.- Preparar los cultivos en pequeña escala de las especies seleccionadas y obtener sus correspondientes extractos orgánicos mediante las técnicas de maceración y partición.
- 3.- Determinar la actividad fitotóxica de los extractos fúngicos con la finalidad de seleccionar a los candidatos idóneos para su posterior estudio químico.
- 4.- Evaluar la actividad fitotóxica de algunos de los constituyentes mayoritarios obtenidos a partir de las especies seleccionadas en estudios químicos previos.
- 5.- Correlacionar en lo posible los resultados obtenidos con la información descrita en la literatura.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala.

A partir de los cultivos axénicos seleccionados, se realizó la preparación de los cultivos en pequeña escala en medio sólido. Para ello, cada organismo fue transferido de la caja de Petri a un medio líquido YESD (15 mL) compuesto por extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%) y dextrosa (2%), y se mantuvo en agitación constante (100 rpm) por 5 días, para favorecer el aumento 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.

4.2 Preparación de extractos orgánicos.

Los extractos orgánicos en pequeña escala se obtuvieron a partir de cada cultivo en medio de arroz húmedo (inciso 4.1), mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente con agitación constante (100 rpm) durante 24 horas, empleando 90 mL de una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1). Transcurrido el tiempo de extracción, la mezcla se filtró y al filtrado se adicionaron 60 mL de H_2O y 40 mL de CHCl_3 . El extracto se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos y enseguida, se separó la fase orgánica de la fase acuosa con la ayuda de un embudo de separación. La fase acuosa se sometió a un proceso de extracción con CHCl_3 (20 mL), y las fases orgánicas obtenidas se reunieron y se llevaron a sequedad a presión reducida. Finalmente, el extracto de CHCl_3 -MeOH seco se resuspendió en 60 mL de la mezcla de MeCN-MeOH (1:1) y se sometió a un proceso de reparto utilizando 60 mL de hexano; la fracción de hexano se desechó y la fracción orgánica resultante se evaporó a sequedad a presión reducida.

4.3 Ensayos Biológicos.

4.3.1 Evaluación de la actividad fitotóxica mediante el método de bioautografía.

La evaluación de la actividad fitotóxica preliminar de los extractos orgánicos secos se realizó mediante la técnica de bioautografía (Anaya *et al.*, 1990; 1995). Los ensayos correspondientes se efectuaron empleando placas de vidrio de 3 × 20 cm recubiertas de gel de sílice. Pevio a la evaluación, las semillas de *Amaranthus hypochondriacus*, obtenidas de un vivero en Xochimilco, Ciudad de México, se inspeccionaron para eliminar cualquier materia extraña y lavaron con una solución de hipoclorito al 5%; enseguida se realizó un segundo lavado con agua destilada para eliminar el remanente de hipoclorito y se dejaron secar a temperatura ambiente.

El ensayo correspondiente inició con la aplicación de 30 μ L de las muestras a analizar disueltas en una mezcla de dioxano-metanol (1:1) a una concentración de 1 mg/mL sobre las placas de gel de sílice; posteriormente, se realizó el proceso de elución utilizando como fase móvil una mezcla binaria de CHCl_3 -MeOH (9:1). Concluido este proceso, se permitió la evaporación del disolvente de la placa y ésta se cubrió con 10 mL de una suspensión de agar bacteriológico marca Difco al 1%. Una vez solidificado el agar sobre la superficie de la placa, se colocaron las semillas de *A. hypochondriacus* hasta cubrirla completa y homogéneamente. Las placas se incubaron en una cámara húmeda a 30°C durante 48 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se observaron las zonas de inhibición y se determinó el factor de retención (Rf) correspondiente, mediante el análisis comparativo con una placa cromatográfica que contenía a la muestra de interés analizada bajo las mismas condiciones, y revelada con un agente cromógeno apropiado.

4.3.2 Evaluación cuantitativa del potencial fitotóxico.

La actividad fitotóxica cuantitativa de los extractos y compuestos puros se determinó mediante la evaluación del efecto de los mismos sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*, de acuerdo con los procedimientos ampliamente descritos en la literatura (Anaya *et al.*, 1990; Castañeda *et al.*, 1996).

Brevemente, los ensayos se realizaron en cajas de Petri de 6 cm de diámetro que contenían un disco de papel filtro. Cada una de las muestras a evaluar se disolvió en MeOH y se prepararon las diluciones correspondientes a las concentraciones finales de 10, 100 y 1000 ppm. Posteriormente, 1 mL de cada solución se vertió por triplicado en las cajas de Petri y se permitió la evaporación completa del disolvente. A continuación, se inició el proceso de germinación de 10 semillas de la especie de prueba, humedeciendo previamente el papel filtro con 1 mL de agua destilada. El proceso de germinación se realizó incubando todas las cajas a 30°C durante 48 horas. La actividad fitotóxica se registró determinando el número de semillas germinadas (inhibición de la germinación) y midiendo la longitud de las radículas (inhibición del crecimiento radicular) a las 48 horas posteriores a cada tratamiento. Como controles positivos se utilizaron a la batatasina y al gigantol bajo las mismas concentraciones de análisis.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación se determinó la actividad fitotóxica de 18 extractos orgánicos y cinco compuestos puros derivados de especies fúngicas aisladas a partir plantas, muestras de suelo y líquenes. Así, en primer lugar, se realizó el acondicionamiento de los organismos fúngicos previamente aislados en el laboratorio. Una vez confirmada su viabilidad y pureza, se realizaron los cultivos en pequeña escala utilizando las condiciones de fermentación descritas en la parte experimental de este manuscrito. Al cabo del periodo de incubación, los cultivos fueron sujetos a una extracción por maceración para la posterior obtención de los extractos orgánicos mediante procesos de partición. Los extractos secos fueron evaluados en el ensayo de fitotoxicidad de bioautografía, sin embargo, los resultados obtenidos no fueron concluyentes, por lo que se decidió realizar el ensayo cuantitativo para establecer su potencial fitotóxico. Cabe mencionar que este último proceso permitió la selección de los organismos idóneos para la obtención de compuestos bioactivos. A partir de las especies que mostraron actividad, se realizaron una serie de separaciones y purificaciones que permitieron la obtención de los productos mayoritarios, mismos que se probaron el ensayo de inhibición de la germinación y crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*, con la finalidad de detectar nuevas entidades químicas con posible uso como agentes herbicidas.

Siguiendo la estrategia descrita en el párrafo anterior, en el **Cuadro 3** se muestran los resultados de los rendimientos de los extractos orgánicos derivados de la fermentación de los diferentes organismos en medio sólido

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala a partir de los organismos fúngicos seleccionados.

Clave del hongo	Fuente de obtención	Lugar de colecta	Extracto (mg)
P8-9	<i>Ricinus communis</i>	Ciudad Universitaria	129 ^a
P8-13	<i>R. communis</i>	Ciudad Universitaria	87 ^a
P11-7	<i>Tillandsia</i> sp.	Ciudad Universitaria	632 ^a ; 329 ^b
P12-16	<i>Asclepia</i> sp.	Ciudad Universitaria	226 ^a
P24-11	<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Ciudad Universitaria	39 ^a
P29-3	<i>Bursera simaruba</i>	Sayulita, Nayarit	61 ^a
P29-8	<i>B. simaruba</i>	Sayulita, Nayarit	58 ^a
P30-4	<i>Attalea</i> sp.	Sayulita, Nayarit	73 ^a ; 1585 ^b
P30-10	<i>Attalea</i> sp.	Sayulita, Nayarit	280 ^a ; 615 ^b
P30-15	<i>Attalea</i> sp.	Sayulita, Nayarit	139 ^a
T21	Suelo	San Martín Tuxtla, Veracruz	36 ^a ; 352 ^b
T41	Suelo	San Martín Tuxtla, Veracruz	206 ^a ; 980 ^b
T86	Suelo	San Martín Tuxtla, Veracruz	58 ^a ; 668 ^b
L1-4	Liquen	Ciudad Universitaria	172 ^a ; 270 ^b

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

Posteriormente, para determinar la actividad fitotóxica potencial de los extractos fúngicos se estableció el efecto de estos sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus*. Los resultados de las evaluaciones biológicas se resumen en el **Cuadro 4**:

Cuadro 4. Efecto de los extractos orgánicos sobre la inhibición de la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*.

Clave del hongo	% de Inhibición		
	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL
P8-9	27	23	64
P8-13	2	29	23
P11-7^a	7	35	100
P12-16	16	40	98
P24-11	0	32	35
P29-3	^c	^c	48
P29-8	0	8	40
P30-4^a	59	76	19
P30-10^a	19	57	98
P30-15	41	17	28
T21^a	^c	^c	62
P11-7^b	17	83	100
P30-4^b	44	79	96
P30-10^b	24	44	100
T21^b	^c	^c	58
T41^a	17	18	83
T86^b	7	34	86
L1-4^b	13	21	92
Gigantol	25	39	80
Batatasina	0	0	91

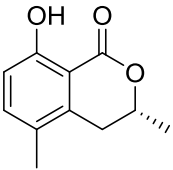
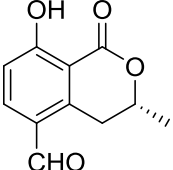
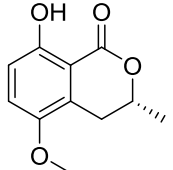
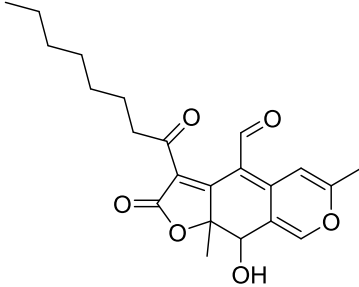
^a Pequeña escala; ^b Mediana escala (10×); ^c El crecimiento radicular fue mayor que el observado en el blanco del disolvente.

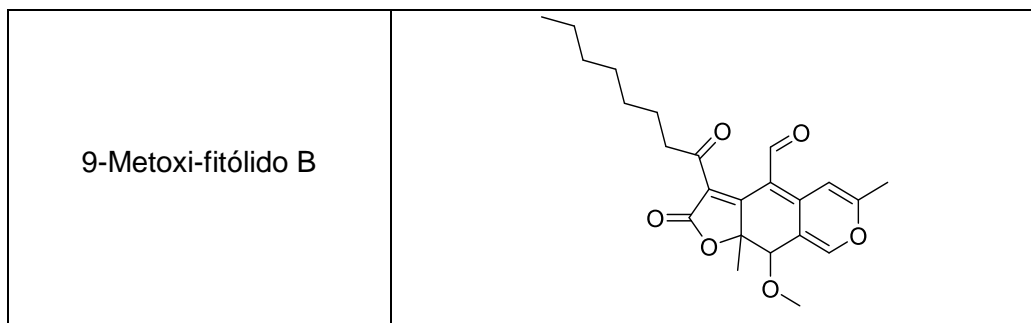
Cuadro 5. Efecto de los extractos orgánicos sobre la inhibición del crecimiento radicular de las semillas de <i>A. hypochondriacus</i>.			
Clave del hongo	% de Inhibición		
	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL
P8-9	33	17	47
P8-13	40	40	40
P11-7^a	17	33	100
P12-16	13	33	93
P24-11	13	7	33
P29-3	17	7	17
P29-8	13	13	20
P30-4^a	33	13	77
P30-10^a	13	30	97
P30-15	33	20	17
T21^a	20	3	50
P11-7^b	20	63	100
P30-4^b	13	33	73
P30-10^b	23	30	100
T21^b	3	10	57
T41^b	17	20	87
T86^b	17	13	70
L1-4^b	13	30	97
Gigantol	20	30	77
Batatasina	20	10	90

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

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede observar que de las 18 muestras evaluadas, siete presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre la germinación y el crecimiento radicular: P11-7^{a y b}, P12-16, P30-10^{a y b}, T41^b y L1-4^b. Por otra parte, los extractos P11-7, P11-7^b y P30-10^b fueron los más activos presentando el 100% de inhibición sobre la germinación y el crecimiento radicular a la mayor concentración evaluada.

Enseguida, y con base en los resultados obtenidos en las evaluaciones biológicas preliminares, se seleccionaron los compuestos descritos en el **Cuadro 6**, aislados previamente a partir de la especie activa P11-7, para establecer su potencial fitotóxico. La determinación del efecto fitotóxico pre-emergente se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la parte experimental, y utilizando como semilla de prueba *A. hypochondriacus*. Como controles positivos se utilizaron a los productos naturales gigantol y batatasina, y las evaluaciones preliminares se realizaron a las concentraciones de 20 y 200 ppm.

Cuadro 6. Estructuras de los compuestos aislados del hongo endófito <i>Biscogniauxia</i> sp. (P11-7)	
Compuesto	Estructura
5-Metil-meleína	
5-Formil-meleína	
8-Hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina	
Fitólido B	



Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de los productos cabeza de serie se resumen en el **Cuadro 7**, y se observa que solo la 5-metil-meleina inhibe por arriba del 50% la germinación y el crecimiento radicular de *A. hypochondriacus* a la concentración de 200 ppm. Se puede observar también que el fitólido B y su derivado metilado presentan menos de un 10% de inhibición sobre la germinación de la semilla de prueba.

Cuadro 7. Actividad fitotóxica preliminar de los compuestos puros sobre las semillas de *A. hypochondriacus*.

Compuesto	% inhibición de la germinación		% Inhibición del crecimiento radicular	
	20 µg/mL	200 µg/mL	20 µg/mL	200 µg/mL
5-Metil-meleína	7	77	17	67
Fitólido B	10	7	27	40
9-Metoxi-fitólido B	7	7	9	3

Cabe mencionar que el fitólido B fue descrito por primera vez como un metabolito secundario fúngico aislado a partir del tunicado de mar *Oxycorynia fascicularis* (Wang *et al.*, 1997), y junto con su derivado metilado, poseen una similitud estructural con la monascorubrina y otros metabolitos relacionados aislados a partir de especies del género *Monascus*. Las especies mejor conocidas del género *Monascus* son empleadas en algunos procesos de fermentación de “arroz de levadura roja”, y la monascorubrina es empleada como aditivo en alimentos y en la medicina tradicional china por sus efectos benéficos para la salud (Hsu *et al.*, 2010; 2011; Patakova, 2013). De manera general, las azafilonas han demostrado

actividad contra diversos microorganismos y nematodos, así como actividades como agentes antivirales, inmunomoduladoras, antioxidantes, citotóxicos y antiinflamatorios (Osmanova *et al.*, 2010; Stadler *et al.*, 2007; Hajjaj *et al.*, 2000; Akihisa *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2010; Patakova 2013).

Para continuar con la exploración del potencial fitotóxico de las isocumarinas activas, se decidió evaluar a la 5-metilmelina y a sus derivados 5-formil-melina y a la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina utilizando un rango mayor de concentraciones (**Cuadro 8**). Los resultados obtenidos a partir de esta evaluación permitieron identificar a la 5-metil-melina como el metabolito que presenta la mejor actividad biológica como agente fitotóxico. Esta actividad fue incluso mejor que la de los controles positivos utilizados gigantol y batatasina.

Cuadro 8. Efecto de los compuestos puros sobre el crecimiento radicular e inhibición de la germinación de las semillas de *A. hypochondriacus*.

Compuesto	% inhibición de germinación				% inhibición del crecimiento radicular			
	Concentración (µg/mL)							
	50	100	200	250	50	100	200	250
5-Metil-melina	7	17	83	80	24	40	67	71
5-Formil-melina	7	20	17	17	24	35	32	35
8-Hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina	13	10	13	3	12	6	20	27
Gigantol	13	30	-	27	44	39	-	38
Batatasina	20	10	-	20	6	20	-	40

De estos compuestos, la 5-metil-melina fue descrita por primera vez por Ballio y colaboradores (1966) como un producto aislado a partir del hongo fitopatógeno *Fusicoccum amygdali* y de las especies endófitas *Phomopsis* sp. y *Picea glauca* (Krohn *et al.*, 1997; Sumarah *et al.*, 2008; Bunyapaiboonsri *et al.*, 2010). Este

producto tiene además propiedades antibacterianas, antimicóticas y citotóxicas (Krohn *et al.*, 1997; Bunyapaiboonsri *et al.*, 2010; Ballio, 1966). También existe un reporte en la literatura en donde se describe su actividad como fitotoxina sobre el crecimiento en semillas de lechuga (Okuno *et al.*, 1985). De tal manera, que este trabajo representa la primera investigación sobre las propiedades fitotóxicas de la 5-metil-meleina aislada de una especie endófito de *Tillandsia* sp. sobre *A. hypochondriacus*, y es de gran importancia debido a la simplicidad de la molécula para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas. Los estudios biológicos para establecer el posible modo de acción del producto como agente herbicida se encuentran en curso, y no forman parte del objetivo principal de esta investigación.

Por otra parte, la 5-formil-meleina presentó una actividad fitotóxica marginal y no dependiente de la concentración. Esta investigación representa el primer reporte sobre la fitotoxicidad del producto. Finalmente, es importante mencionar que la 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina, aislada previamente de la planta *Maclobium bifolium* (De Alvarenga *et al.*, 1978; Bautista-López, 2014), no presenta una actividad biológica importante con la semilla de prueba, y otras investigaciones están en curso para establecer la posible actividad del producto utilizando otras semillas de prueba. A la fecha, no existen reportes en la literatura de su aislamiento a partir de alguna especie fúngica, ni sobre las propiedades como agente fitotóxico que fueron establecidas en este trabajo de investigación.

6. CONCLUSIONES

- En la presente investigación se realizó el análisis preliminar del potencial fitotóxico de 18 extractos orgánicos obtenidos a partir de especies fúngicas selectas aisladas de diferentes sustratos de la biodiversidad de México. Con base en los resultados obtenidos, se realizó la selección de la especie fúngica perteneciente al género *Biscogniauxia* sp., como el candidato idóneo para la obtención de productos naturales con potencial como agentes herbicidas.

- Se estableció el potencial fitotóxico de los metabolitos 5-metil-melína, 5-formil-meleína, 8-hidroxi-5-metoxi-3-metil-3,4-dihidroisocumarina, fitólido B y 9-metoxi-fitólido B, sobre la germinación y crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*, siendo la 5-metil-melína el compuesto más activo. Las azafilonas evaluadas, el fitólido B y su derivado metilado, no mostraron actividad fitotóxica, lo que permitió establecer que la actividad observada en el extracto orgánico era debido a la presencia de las isocumarinas.

- Finalmente, este trabajo representa la primera investigación y una contribución original sobre las propiedades fitotóxicas de las meleinas y azafilonas aisladas a partir de una especie endófito (*Tillandsia* sp.). Este hallazgo podría ser de gran importancia debido a la simplicidad de las moléculas y que puedan servir como moléculas líderes para el desarrollo de nuevos agentes herbicidas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Akihisa, T. Tokuda, H. Yasukawa, K. Ukiya, H. Kiyota, A. Sakamoto, N. Suzuki, T. Tanabe, N. Nishino, H., **2005**. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 565.
- Anaya, A.L., Calera, M. R., Mata, R., Pereda-Miranda, R. **1990**. Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea Tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal Chemistry Ecology*, 7, 2145-2152.
- Anaya, A.L., Calera, M. R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista, B., Lotina-Hennsen, B., Mata. R. **1995**. Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry* 40, 419-425.
- Amand, S. Langenfeld, A. Blond, A. Dupont, J. Nay, B. Prado, S., **2012**. Guaiane sesquiterpenes from *Biscogniauxia nummularia* featuring potent antigerminative activity. *Journal of Natural Products*, 75(4), 798-801.
- Ballio, A., Barcellona, S., Santurbano, **1966**. B. 5-methylmellein, a new natural dihydroisocoumarin. *Tetrahedron Letters*, 31, 3723-3726.
- Bautista-López, A.,**2014**. *Aislamiento e identificación de metabolitos biodinámicos a partir de especies fúngicas de México. Tesis de Licenciatura, Químico Farmacéutico Biólogo*. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

- Bunyapaiboonsri, T., Yoiprommarat, S., Srikitikulchai, P., Srichomthong, K., Lumyong, S. **2010**. Oblongolides from the Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. BCC 9789. *Journal of Natural Products*, 73, 55-59.
- Castañeda, P., Gómez, L., Mata, R. **1996**. Phytogrowth-Inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *Journal of Natural Products*, 59, 323-326.
- Charles L. Cantrell, Franck E. Dayan, and Stephen O. Duke. **2012**. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75, 1231-1242.
- Cramer, H, **2000**. Crop Protection. F Muller (ed), *Agrochemicals. Composition, Production, Toxicology and Applications*. Wiley-VCH, Federal Republic of Germany, 288-317.
- De Alvarenga, M.A., Braz, F.R., Gottlieb, O.R., Días, J.P.P., Magallanes, E.G., Magallanes, G.C., Magallanes, 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., Santana, A.E.G., Santos, C.C. **1978**. Dihydroisocoumarins and phthalide from Wood samples infested by fungi. *Phytochemistry*, 17, 511-516.
- Duke S.O., Romagni J.G., Dayan, F.E. **2002**. Natural products as source of new mechanism of herbicidal action. *Crop Protection*, 19, 583-589.
- Espejo-Serna, A., Till, W. **2008**. Dos nuevas especies de *Tillandsia* (*Bromeliaceae*) en México. *Acta Botánica de México*. 85, 45-62.
- Evidente, A. Andolfi, A. Maddau, L. Franceschini, A. Marras, F., **2005**. Biscoyran, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by

Biscogniauxia mediterranea, a fungus pathogen of cork oak. *Journal of Natural Products*, 68 (4), 568-571.

- Ge, M., Yin, Y., Chen, Y., Luo, M. & Chen, D., **2012**. A novel phytotoxic nonelide from *Phomopsis* sp. HCCB03520. *Chemistry and Biodiversity*, 9, 403-408.
- Guzman, G. **1998**. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 7, 369-384.
- Hajjaj, H. Klaébé, A. Goma, G. Blanc, P. Barbier, E. Francois, J., **2000**. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), 1120-1125
- Heap, I. **1997**. The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science*, 51, 235-243.
- Hsu, Y.W. Hsu, Li. Liang, Yu. Kuo, Yao. Pan, Tzu, **2010**. New Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Constituents from Fermented Red Mold Rice *Monascus purpureus* NTU 568. *Molecules*, 15(11), 7815-7824.
- Hsu, Y.W. Hsu, Li. Liang, Yu. Kuo, Yao. Pan, Tzu. **2011**. New Bioactive Orange Pigments with Yellow Fluorescence from *Monascus*-fermented Dioscorea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (9), 4512-4518
- Justum, A., Heaney. S., Perrin, B., Wege, P **1997**. Pesticide resistance: assessment of risk and the development and implementation of effective management strategies. *Pesticide Science*, 54, 435-446.

- Krohn, K., Bahramsari, R., Flörke, U., Ludewig, K., Kliche-Spory, C., Michel, A., Aust, H.J., Draeger, S., Schulz, B., Antus, S. **1997**. Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry*, 45, 313-320.
- Kumar, S., N., **2012**. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: A review. *Phytochemistry*, 11(4), 507-522.
- Kusari, S., Hetweck, C. Spiteller, M., **2012**. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of Secondary metabolites. *Chemistry and Biology*, 19 (7), 792-798.
- Macías-Rubalcava, M.L. Hernández, B. Jiménez, M. González, C. Gleen, A., Hanlin R. Hernández, S., Saucedo, A., Muria, J., Anaya, A. **2008**. Napthoquinone Spiroketals whit allelochemical activity from the newly discovered endophytic fungus *Edenia gomezpompae*. *Phytochemistry Reviews*, 69 (5), 1185-96.
- Macías-Rubalcava, M.L., Ruiz, M.L.E., Meléndez, C., Hernández, S. **2014**. Napthoquinone Spiroketals and organic extracts from the endophytic fungus *Edenia gomezpompae* as potencial herbicides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (16), 3553-3562.
- Mata, R., Figueroa, M., Rivero, I., Macias-Rubalcava, M.L. **2018**. Insights in Fungal Bioprospecting in México. *Planta Médica*. Doi: 10.105s/s-0044-101551.
- Okuno T., Oikawa S., Goto T., Sawai K., Shirahama H., Matsumoto T., **1985**. Structures and Phytotoxicity of Metabolites from *Valsa ceratosperma*. *Agricultural Biology Chemistry* 50 (4), 997-1001.

- Osmanova, N., Schultze, W. Ayoub, N., **2010**. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews*, 1-28.
- Patakova, P., **2013**. Monascus secondary metabolites: Production and biological activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40 (2),169-181.
- Sánchez de Van der Oordt Zoila. **2005**. *Estudio bibliográfico de Tillandsias. Lima, Perú.*
- Sica, V. Figueroa, M. Raja, H. Elimat, T. Darveaux, B. Pearce, C. Oberlies, N. **2016**.Optimizing production and evaluating biosynthesis in situ of an herbicidal compound, mevalocidin, from *Coniolarrella* sp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(8);1157.
- Singh, H.P., Batish, D.R., Kohli, R.K. **2003**. Allelopathic interactions and allelochemicals: New possibilities for sustainable weed management. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 22,239-311.
- Stadler, M. et al., **2007**. Metabolomic studies on the chemical ecology of the *Xylariaceae* (Ascomycota). *Natural Product Communications*, 2(3), 287-304.
- Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., Sugawara, F., Clardy, J. **1991**.Phytotoxins from fungi attacking weedy plants. R. Keeler y A.T. Tu (eds), *Handbook of Natural Toxins*, Vol. 6, *Toxicology of Plant and Fungal Compounds*, Marcel Dekker, New York.

- Strobel G., B. Daisy, U. Castillo, J. Harper. **2004**. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67 (2), 257-268.
- 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, 1393-1398.
- Wang, G.Y.S., Borgeson, B.M., Crews, P., **1997**. Pitholides A-D, polyketides from a marine turnicate-derived culture of *Pithomyces* sp. *Tetrahedron Letters*, 38(49), 8449-8452.
- Warrior, P. **2000**. Living systems as natural crop-protection agents. *Pesticide Management Science*, 56, 681-687.
- Whalley, A. J.S., **1996**. The *Xylariaceous* way of life. *Mycological Research*, 100(8), 897-922.
- Yang, Z., Yu, Z., Lei, L., Xia, Z., Shao, L., Zhang, K. Li, G., **2012**. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia Pacific Entomology*, 15(4), 647-650.