



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**POTENCIAL HERBICIDA DE HONGOS SAPRÓFITOS Y
MARINOS FACULTATIVOS DE MÉXICO**

TESIS

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

PRESENTA

VALERIA VILCHIS ROMERO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: DRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS
VOCAL: DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA
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.**

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

SUSTENTANTE:

Valeria Vilchis Romero

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP-FQ) por los apoyos económicos al grupo de investigación a través de los proyectos CB 236564, PAPIT IA205017 y PAIP-FQ 5000-9145.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| LISTA DE CUADROS | II |
| LISTA DE FIGURAS | III |
| LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS | IV |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Herbicidas de origen natural | 1 |
| 1.2. Micoherbicidas | 2 |
| 1.3. Bioprospección de microorganismos de hábitats inexplorados..... | 3 |
| 1.4. Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila..... | 4 |
| 1.5. Hongos marinos facultativos | 5 |
| 2. HIPÓTESIS | 7 |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS | 7 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL | 8 |
| 4.1. Acondicionamiento de organismos fúngicos. | 8 |
| 4.2. Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala..... | 8 |
| 4.3. Obtención de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala..... | 9 |
| 4.4. Potencial fitotóxico de los extractos, fracciones y compuestos puros. | 9 |
| 4.5. Fraccionamiento primario y secundario del extracto orgánico en mediana escala del hongo CC8-13..... | 10 |
| 4.6. Aislamiento y purificación de metabolitos mayoritarios. | 14 |
| 4.7. Caracterización de los productos naturales. | 16 |
| 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 17 |
| 5.1. Estudio químico biodirigido de especies fúngicas provenientes de la RCCC. | 17 |
| 5.1.1. Caracterización del alternariol (1). | 21 |
| 5.1.2. Caracterización del 9-metoxi alternariol (2). | 24 |
| 5.1.2. Propiedades fitotóxicas del alternariol (1) y el 9-metoxi alternariol (2).. | 27 |
| 5.2. Evaluación de la actividad fitotóxica de metabolitos obtenidos a partir de especies fúngicas provenientes de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero. | 28 |
| 6. CONCLUSIONES | 31 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 32 |

LISTA DE CUADROS

| | Página |
|---|---------------|
| Cuadro 1. Herbicidas de origen natural más empleados para el control de malezas. | 1 |
| Cuadro 2. Condiciones cromatográficas empleadas en el fraccionamiento primario del extracto orgánico CC8-13. | 11 |
| Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento primario del extracto orgánico CC8-13. | 12 |
| Cuadro 4. Condiciones cromatográficas empleadas en el fraccionamiento de la fracción 01002-41-4. | 13 |
| Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción 01002-41-4. | 14 |
| Cuadro 6. Rendimientos de los extractos orgánicos en pequeña escala obtenidos a partir de los taxones fúngicos aislados. | 19 |
| Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos en pequeña escala sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de <i>A. hypochondriacus</i> . | 19 |
| Cuadro 8. Efecto fitotóxico del extracto orgánico en mediana escala y fracciones primarias del hongo CC8-13 sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de <i>A. hypochondriacus</i> . | 21 |
| Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN (MeOH- d_4) del alternariol (1). | 23 |
| Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 400 MHz; ^{13}C , 100 MHz; DMSO- d_6) del 9-metoxi alternariol (2). | 26 |
| Cuadro 11. Actividad fitotóxica reportada para el alternariol (1) y 9-metoxi alternariol (2). | 28 |
| Cuadro 12. Estructuras de los productos evaluados en el ensayo de fitotoxicidad. | 29 |
| Cuadro 13. Fuente de obtención y peso molecular de los metabolitos estudiados. | 29 |
| Cuadro 14. Efecto fitotóxico de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de <i>A. hypochondriacus</i> . | 30 |

LISTA DE FIGURAS

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Registros de ingredientes activos pesticidas desde 1997 hasta 2010 organizados por fuente de obtención. | 2 |
| Figura 2. Ubicación geográfica de la RCCC. | 4 |
| Figura 3. Ubicación geográfica de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero. | 6 |
| Figura 4. Vista panorámica del sitio de recolección de muestra (Cueva del Junco, RCCC). | 8 |
| Figura 5. Flores y semillas de <i>A. hypochondriacus</i> . | 10 |
| Figura 6. Perfil cromatográfico obtenido del fraccionamiento primario del extracto orgánico CC8-13. | 11 |
| Figura 7. Perfil cromatográfico obtenido del fraccionamiento de 01002-41-4. | 14 |
| Figura 8. Perfil cromatográfico por HPLC analítico de la fracción 01002-41-5. | 15 |
| Figura 9. Perfil cromatográfico por HPLC a nivel preparativo de la fracción 01002-41-5. | 16 |
| Figura 10. Estrategia metodológica general empleada para el estudio químico de las especies fúngicas provenientes de la RCCC. | 18 |
| Figura 11. Vista aérea de la RCCC y ubicación geográfica del sitio de recolección de muestra (Cueva del Junco). | 18 |
| Figura 12. Registro digital de los cultivos de taxón CC8-13 en medio agar papa dextrosa y de arroz húmedo. | 20 |
| Figura 13. Cromatogramas de corriente total de iones (TIC) y UV-PDA y (B) espectros de masas ESI+ y ESI- del alternariol (1). | 22 |
| Figura 14. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN del alternariol (1). | 24 |
| Figura 15. Cromatogramas de TIC y UV-PDA y espectros de masas ESI+ y ESI- del 9-metoxi alternariol (2). | 25 |
| Figura 16. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN del 9-metoxi alternariol (2). | 27 |

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

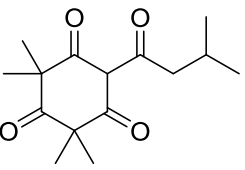
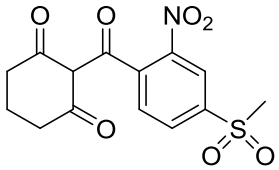
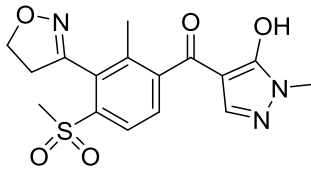
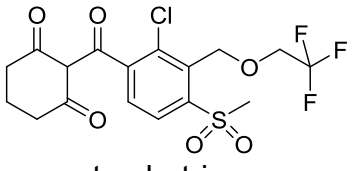
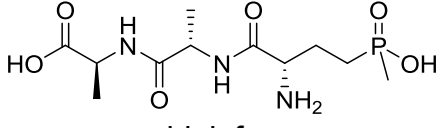
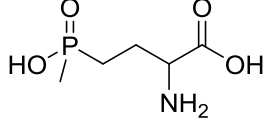
| | | | |
|---------------------------|---|---------------------------|--|
| AcOEt | Acetato de etilo | m² | Metro cuadrado |
| MeCN | Acetonitrilo | μL | Microlitro |
| CHCl₃ | Cloroformo | μm | Micrómetro |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta eficiencia | mg | Miligramo |
| UPLC-HRESIMS | Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electrospray-masas/masas | mL | Mililitro |
| TIC | Cromatogramas de corriente total de iones | mmol | Milimol |
| δ | Desplazamiento químico | min | Minuto |
| PDA | Detector de arreglo de fotodiodos | nm | Nanómetro |
| ELSD | Detector de dispersión de luz evaporativo | N₂ | Nitrógeno |
| DMSO-d₆ | Dimetilsulfóxido deuterado | ppm | Partes por millón |
| d | Doblete | m/z | relación masa-carga |
| °C | Grado Celsius | RCCC | Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila |
| g | Gramo | ¹³C RMN | Resonancia magnética nuclear de carbono 13 |
| Hz | Hertz | ¹H RMN | Resonancia magnética nuclear protónica |
| h | Hora | rpm | Revoluciones por minuto |
| L | Litro | s | Singulete |
| λ | Longitud de onda | sa | Singulete ancho |
| MHz | Megahertz | TMS | Tetrametilsilano |
| MeOH | Metanol | UV | Ultravioleta |
| MeOH-d₄ | Metanol deuterado | uma | Unidad de masa atómica |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Herbicidas de origen natural

A lo largo de la historia, los productos naturales han tenido un impacto muy importante en el desarrollo de numerosos pesticidas. Específicamente, para el control de malezas, en 1977 se descubrió el primer herbicida natural, la leptospermona, un inhibidor de la 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenasa obtenido a partir del árbol *Callistermon citrinus*, mismo que permitió el diseño y comercialización de una serie de derivados sintéticos, tales como la mesotriona, la topramezona y la tembotriona (Cantrell *et al.*, 2012); otro ejemplo relevante es el bialafos, un tripéptido con acción herbicida producido por las bacterias *Streptomyces hygroscopicus* y *S. viridochromogenes*, y que sirvió como base para la elaboración del derivado sintético glufosinato, con acción inhibidora irreversible de la glutamina sintetasa (Gerwick y Sparks, 2014) (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Herbicidas de origen natural más empleados para el control de malezas.

| | | |
|--|---|--|
|  leptospermona |  mesotriona |  topramezona |
|  tembotriona |  bialafos |  glufosinato |

Una revisión reciente de los pesticidas comerciales utilizados a nivel mundial reveló que cerca del 70% de todos los ingredientes registrados entre los años 1997 y 2010, tienen su origen en algún producto proveniente de fuentes naturales, ya sean derivados sintéticos, biológicos y/o productos naturales directos (**Figura 1**). Sin embargo, para el caso de los herbicidas convencionales, se encontró que solamente el 8% provienen de compuestos naturales, y el 7% de los compuestos naturales con efecto pesticida aprobados por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos son herbicidas orgánicos (Cantrell *et al.*, 2012).

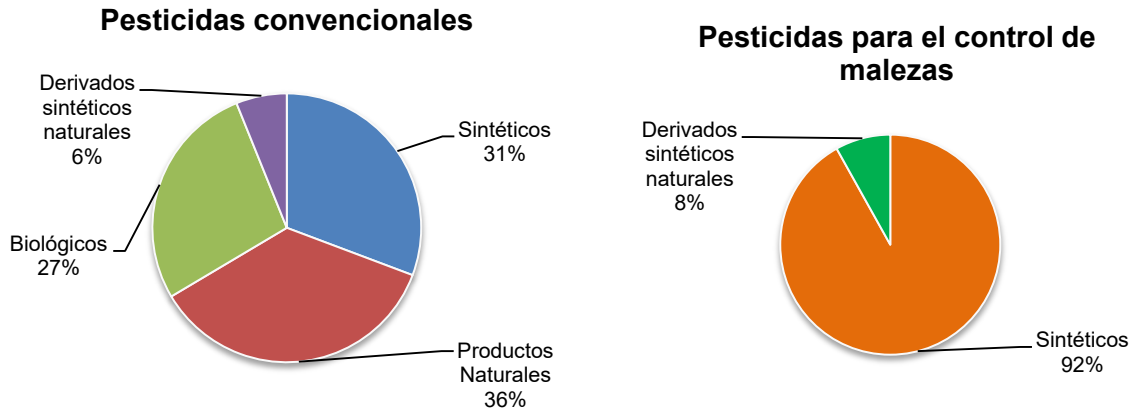


Figura 1. Registros de ingredientes activos pesticidas desde 1997 hasta 2010, organizados por fuente de obtención (Cantrell *et al.*, 2012).

1.2. Micoherbicidas

Los micoherbicidas consisten en preparados de esporas desactivadas o no de hongos fitopatógenos desarrollados y utilizados para el control de malezas. Estos productos elaborados a partir de un inóculo muy concentrado del microorganismo, se aplican sobre la superficie del suelo o de la planta, generando protección y/o erradicación de las plagas. Algunas de las principales ventajas que han presentado estos herbicidas, en comparación con los sintéticos, es que son más seguros con el medio ambiente y el hombre, suelen ser muy específicos, y son más baratos, además de que son ideales para su uso en los cultivos destinado para la obtención de “productos orgánicos”.

A pesar de que este campo de investigación es relativamente reciente, se ha logrado el desarrollo de diversos productos comerciales que han sido probados con efectividad contra una gran variedad de malezas. Tal es el caso de algunos preparados obtenidos a partir del hongo *Colletotrichum gloeosporoides*, los cuales han estado disponibles para su uso desde los años sesenta en países como Estados Unidos y China. Su acción posterior a la germinación de las esporas implica la formación de estructuras especializadas de adhesión y una expansión de micelio, mismos que fomentan la aparición de lesiones oscuras o manchas, para después inducir la muerte mediante necrosis del tejido infectado (Gaddeya *et al.*, 2017). Del mismo modo, se encontró una acción fitotóxica en los preparados del hongo *Phoma macrostoma* debida principalmente a la producción de dos metabolitos secundarios identificados como macrocidinas A y Z, que actúan mediante la inhibición de la biosíntesis de carotenoides en la planta (Hubbard *et al.*, 2014). Finalmente, a partir de la especie fúngica *Coniolarrella sp.*,

se aisló la fitotoxina mevalocidina, la cual se encuentra en fase de desarrollo tecnológico debido a su importante actividad posemergente contra numerosas malezas y mecanismo de acción único (Sica *et al.*, 2016).

1.3. Bioprospección de microorganismos de hábitats inexplorados

Las metodologías clásicas descritas para el descubrimiento de productos naturales provenientes de microorganismos se basan principalmente en el aislamiento de dichas especies a partir de sus hábitats naturales, el cultivo de las cepas axénicas aisladas y el estudio químico convencional o biodirigido para la separación de los compuestos de interés (Fierro y Vaca, 2015).

Dentro de las fuentes naturales más estudiadas para el aislamiento de microorganismos se encuentra el suelo, cuyo entorno biológico es notablemente complejo y dinámico, incluye factores de estrés tanto bióticos como abióticos, y cuya composición puede ser variable espacial y temporalmente. Desde un punto de vista más estricto, el suelo no puede ser considerado como un hábitat; implica más bien la existencia de una serie de microambientes heterogéneos cuyo tamaño puede variar considerablemente. Gran parte de la biomasa que compone al suelo es de tipo microbiana, y la actividad de este tipo de organismos representa un punto clave en diversos procesos geoquímicos, como son el ciclo del carbono y del nitrógeno. En este aspecto, los hongos constituyen entre un 78 y 90% de la biomasa encargada de descomponer la materia orgánica presente en el suelo (Bills *et al.*, 1985; Traxler y Kolter, 2015).

En general, los hongos saprófitos representan una gran proporción de la población total de las especies fúngicas del suelo. Son de gran importancia en la descomposición de polímeros estructurales de las plantas, como la celulosa, hemicelulosa o lignina, realizando su aportación al ciclo global del carbono. Además, estas actividades permiten a estos hongos su crecimiento en sustratos con ciertas limitaciones nutrimentales; esta capacidad de adaptación, en conjunto con la maquinaria biosintética de estas especies para producir metabolitos secundarios o enzimas, explica el constante interés en los estudios de bioprospección de estos microorganismos (Magnuson y Lasure, 2002). A la fecha se han logrado aislar especies pertenecientes a diversos grupos taxonómicos tales como *Saprolegniales*, *Pythiales*, *Mucorales*, *Eurotiales*, *Microascales*, *Hypocreales*, *Sordariales*, *Onygenales*, *Leotiales*, *Pezizales*, y una variedad de hongos mitospóricos (en su mayoría anamorfos de especies de ascomicetos o basidiomicetos) (Bills *et al.*, 1985).

1.4. Reserva de Cuatro Ciénegas, Coahuila.

La Reserva de Cuatro Ciénegas (RCCC) es un único y pequeño oasis (<840 m²) que se encuentra en el desierto Chihuahuense del estado de Coahuila, México (**Figura 2**). Esta región posee ecosistemas que presentan concentraciones muy bajas de nutrientes (nitrógeno o fósforo) y un endemismo biológico similar al de las Islas Galápagos. En estos ecosistemas alimentados por manantiales y diversos cuerpos de agua subterráneos, la relación N:P difiere dependiendo de la zona, teniéndose en proporciones desde muy bajo P (157:1), hasta muy bajo N (1.8:1), tomando en cuenta que una proporción de N:P (16:1) se considera estequiométricamente apropiada para la vida en los océanos (Redfield, 1934). Además, estas relaciones inusuales y extremas en la RCCC generan un estrés nutricional determinante para el desarrollo de comunidades microbianas con características quizá similares a las de la era precámbrica terrestre.



Figura 2. Ubicación geográfica de la RCCC.

Por otra parte, este entorno se considera también como único en el planeta, y es de gran interés debido a que las aguas que lo componen presentan elevadas concentraciones de minerales, que a su vez forman estructuras laminadas que pueden ser consideradas como estromatolitos modernos (microbialitos), mismos que, a diferencia de otros lugares, se forman en ausencia de metazoos debido a la alta salinidad (Elser *et al.*, 2005). Estas características se consideran consecuencias de la regresión marina final ocurrida durante el periodo Paleoceno

tardío, así como del aislamiento completo de la RCCC producido con el levantamiento de la Sierra Madre Oriental en el periodo Eoceno medio (Ferrusquía Villafranca y Zárate, 1998). Por las características geológicas antes mencionadas, esta zona del noreste mexicano mantiene una gran biodiversidad y endemismos con un valor incalculable, y su preservación merece ser tomada en cuenta (Souza *et al.*, 2012).

1.5. Hongos marinos facultativos

El ambiente marino es una de las fuentes más importantes de diversidad biológica y química. Se ha establecido que los océanos contienen alrededor de 300,000 especies descritas, representando sólo un pequeño porcentaje del número total de organismos existentes. Los océanos comprenden más del 70% de la superficie de la Tierra, y cada gota de agua tomada del océano podría contener especies microbianas aún desconocidas en una proporción aproximada de 9:1 (Bhadury *et al.*, 2006).

Los hongos marinos facultativos son aquellos organismos, comúnmente cosmopolitas, cuyo crecimiento óptimo se presenta en entornos terrestres y de agua dulce, y que tienen la capacidad de crecer, y posiblemente esporular, también bajo las condiciones del ambiente marino, es decir, en presencia de sales. En consecuencia, el perfil de metabolitos producido por una misma especie puede ser distinto dependiendo del ambiente del que ha sido aislado (Imhoff, 2016).

Diferentes estudios han demostrado que algunos hongos presentan afinidad por ciertas zonas de transición entre la tierra y el mar, donde el suelo se seca superficialmente cuando el agua se desplaza para formar una ola, pero usualmente permanece inundado la mayor parte del tiempo. La distribución y desarrollo de los hongos afines a estas zonas se encuentran influenciados principalmente por el patrón de oleaje correspondiente a cada sitio de estudio, aunque las diferentes frecuencias de aparición de determinados hongos en una u otra región también pueden estar relacionadas con factores como el tipo de suelo, el pH, la salinidad o incluso la contaminación procedente de puertos cercanos (Sosa-Rodríguez *et al.*, 2009).

La mayoría de las especies que se incluyen en el grupo de los hongos marinos facultativos pertenecen a géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Wardomyces*, *Chrysosporium* y *Chaetomium*, así como *Cephalosporium*, *Cladosporium* y *Alternaria* (Mouton *et al.*, 2012).

Dentro del grupo de trabajo del laboratorio, recientemente se estudió química y biológicamente una especie fúngica marina facultativa identificada como *Aspergillus* sp. MEXU 27854, proveniente de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero (**Figura 3**). Cabe mencionar que diversas especies de este género han demostrado ser una excelente fuente de moléculas biológicamente activas con relevancia farmacéutica. A partir de este hongo, se logró el aislamiento de algunos metabolitos de tipo dioxomorfolinas, mismos que fueron evaluados sobre líneas celulares cancerígenas con diferentes niveles de expresión de la proteína p53, además de una línea celular resistente a múltiples fármacos, incluyendo a la doxorrubicina, y que sobreexpresa glicoproteína-P. A pesar de que los productos evaluados no mostraron una importante acción citotóxica contra las líneas celulares, sí mejoraron el efecto citotóxico de la doxorrubicina en las células resistentes por reversión de la expresión de la glicoproteína-P (Aparicio-Cuevas *et al.*, 2017).

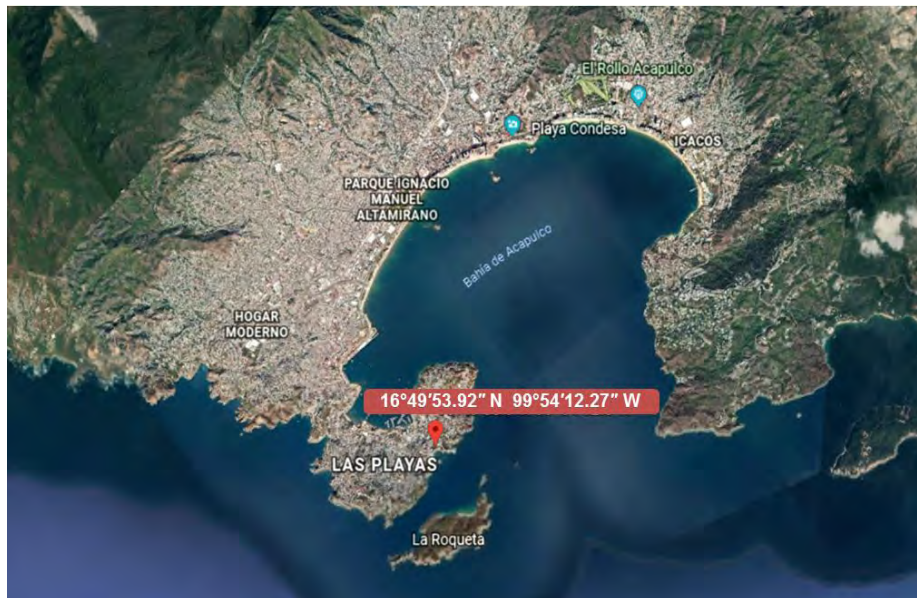


Figura 3. Ubicación geográfica de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero.

2. HIPÓTESIS

Los hongos saprófitos y marinos facultativos aislados de hábitats inexplorados o inusuales son capaces de producir metabolitos secundarios novedosos con potencial herbicida, como consecuencia de sus procesos adaptativos a las condiciones climáticas y al entorno natural.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los herbicidas sintéticos se utilizan en la actualidad como una primera elección para el control de las malezas, sin embargo, estos generan daños muy importantes al medio ambiente, los animales, el suelo y al hombre. Con base en lo anterior, surge la necesidad de encontrar herbicidas “orgánicos” o “verdes” que combatan a las malezas resistentes a los herbicidas convencionales, y que sean inocuos para el medio ambiente y el hombre. Así, la búsqueda de nuevas moléculas a partir de fuentes naturales que cumplan con este propósito representa la alternativa más viable para satisfacer dicha necesidad.

El objetivo general del presente trabajo es realizar un estudio químico biodirigido de los extractos orgánicos de algunos taxones fúngicos saprófitos y marinos facultativos aislados de la RCCC y de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero, con la finalidad de identificar los principios activos.

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

1. Acondicionar y obtener los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala de algunos taxones fúngicos activos aislados de la RCCC.
2. Evaluar el potencial fitotóxico *in vitro* sobre semillas de amaranto de los extractos y fracciones obtenidos.
3. Realizar la separación y purificación de los compuestos mayoritarios presentes en las fracciones activas.
4. Caracterizar los principios activos obtenidos mediante técnicas espectrométricas y espectroscópicas.
5. Evaluar el potencial fitotóxico *in vitro* sobre semillas de amaranto de diferentes compuestos novedosos, a partir de taxones fúngicos activos aislados de la Bahía de Caleta.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Acondicionamiento de organismos fúngicos.

Los organismos empleados como objeto de estudio fueron acondicionados a partir de las cepas tipo obtenidas a partir de una muestra de placa microbiana proveniente de rocas recolectadas en la Cueva del Junco, de la RCCC (**Figura 4**). Cada organismo se sembró en medio agar papa dextrosa en condiciones de asepsia, permitiendo su crecimiento durante 5 días a temperatura ambiente. Los cultivos axénicos fueron etiquetados para su identificación con las claves CC8-1 a CC8-9 y CC8-11 a CC8-21.



Figura 4. Vista panorámica del sitio de recolección de muestra (Cueva del Junco, RCCC).

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

Una vez confirmada la viabilidad y la pureza de los taxones indicados en el inciso anterior, se realizó la preparación de sus correspondientes cultivos en pequeña escala. Para ello, cada cepa se inoculó en 15 mL de medio líquido YESD compuesto por extracto de levadura (2%), peptona de soya (1%) y dextrosa (2%), y se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm durante 5 días. Posteriormente, los cultivos obtenidos fueron vertidos sobre un medio de arroz húmedo estéril (15 g de arroz + 30 mL agua), en matraces Erlenmeyer de 125 mL, y se dejaron crecer por 21 días a temperatura ambiente y periodos de exposición luz-oscuridad 12/12 h.

En el caso del cultivo en mediana escala de la cepa fúngica seleccionada para su estudio químico, se preparó utilizando el mismo procedimiento que para los cultivos en pequeña escala pero en una proporción 6×.

4.3. Obtención de los extractos orgánicos en pequeña y mediana escala.

Los extractos orgánicos se obtuvieron a partir de los cultivos en medio sólido en pequeña o mediana escala descritos en el inciso **4.2**. Una vez finalizado el periodo de crecimiento, en primer lugar, se realizó el registro digital de los cultivos (fotografías de la superficie y base del matraz) y se adicionaron entre 5 y 10 mL de MeOH al matraz para inactivar a los microorganismos. Posteriormente se llevó a cabo el proceso de extracción mediante maceración con CHCl₃-MeOH (1:1) (60 y 150 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente), se fragmentó el cultivo fúngico con ayuda de una espátula, y la mezcla se mantuvo en agitación constante (100 rpm) por 8 h a temperatura ambiente. Al cabo del periodo de agitación, el contenido de cada matraz se filtró en un embudo Büchner a través de papel filtro cualitativo Whatman no. 01, y se realizaron lavados sucesivos de la mezcla arroz-micelio utilizando entre 5 y 10 mL de mezcla CHCl₃-MeOH (1:1). Luego, al filtrado obtenido se agregaron 60 mL de CHCl₃ y se ajustó el volumen total a 200 mL con agua destilada; dicha solución se mantuvo en agitación constante durante 30 min sobre una parrilla de agitación para después transferirse a un embudo de separación. La fase orgánica se concentró a sequedad a presión reducida, se resuspendió con 60 mL de MeCN-MeOH (1:1) y, a continuación, se realizó un desgrase mediante un proceso de extracción líquido-líquido con hexano (60 mL). La fase hexánica se descartó y la fase de MeCN-MeOH se concentró a presión reducida hasta sequedad. Finalmente, el extracto seco fue transferido a un vial pesado y se dejó evaporar el exceso de disolvente a temperatura ambiente para determinar el rendimiento de la extracción.

4.4. Potencial fitotóxico de los extractos, fracciones y compuestos puros.

La evaluación del potencial fitotóxico de los extractos, fracciones y compuestos puros se realizó sobre semillas de *Amaranthus hypochondriacus* adquiridas en el mercado de Xochimilco, Ciudad de México (**Figura 5**), y mediante la observación del efecto de cada muestra sobre la germinación y el crecimiento radicular de las semillas de la maleza de prueba.



Figura 5. Flores y semillas de *A. hypochondriacus* (tomado de <http://b-and-t-world-seeds.com> y <http://www.inkanat.com>).

Para la realización del ensayo, los extractos y las fracciones de prueba se disolvieron en $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1) a las concentraciones finales de 10, 100 y 1000 ppm, y 1 mL de cada solución se acondicionó a un disco de papel filtro dentro de cajas de Petri de vidrio por triplicado. Los discos se dejaron secar al aire por 3 h, luego se agregó 1 mL de agua desionizada sobre el papel y, finalmente, se inocularon 10 semillas previamente lavadas y desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio 1%. Las cajas se sellaron con Parafilm y se incubaron durante 48 h a 28 °C. Al término del tiempo de incubación, se estableció el número de semillas germinadas y su longitud radicular. Como control negativo se utilizó una mezcla de $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:1), y como control positivo a la fitotoxina natural gigantol, a las concentraciones de 10, 100, 250 y 750 ppm.

Para la evaluación de los compuestos puros, se utilizó el mismo procedimiento descrito en el párrafo anterior con las siguientes modificaciones: las muestras fueron disueltas en MeOH a las concentraciones de prueba de 10, 100, 250, 500 y 1000 ppm, y se adicionaron 100 μL de cada solución sobre un disco de papel filtro. Los discos se dejaron secar al aire, se agregaron 800 μL de agua desionizada sobre el papel y se inocularon 10 semillas. Como control negativo se utilizó MeOH, y como controles positivos a los productos naturales gigantol y batatacina a las mismas concentraciones.

4.5. Fraccionamiento primario y secundario del extracto orgánico en mediana escala del hongo CC8-13.

El fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala del hongo CC8-13 se realizó en un equipo automatizado CombiFlash Rf+ (Teledyne Isco), el cual cuenta con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA; longitud de onda en el Ultravioleta (UV), 200-400 nm) acoplado a uno de dispersión de luz evaporativo (ELSD). Como fase estacionaria se empleó gel de sílice (columna RediSep Rf Gold Si-gel de 40 g) y como fase móvil un gradiente de polaridad entre hexano, CHCl_3 y MeOH (**Cuadro 2**). Las fracciones resultantes (15 mL cada una) fueron reunidas de acuerdo con su similitud cromatográfica y se concentraron a presión reducida hasta sequedad (**Figura 6** y **Cuadro 3**).

Cuadro 2. Condiciones cromatográficas empleadas en el fraccionamiento primario del extracto orgánico CC8-13.

| Disolvente A | Disolvente B | Volumen (mL) | %B |
|-----------------|--------------|--------------|-------|
| CHCl_3 | Hexano | 0.0 | 100.0 |
| | | 58.9 | 100.0 |
| | | 412.3 | 0.0 |
| | | 235.6 | 0.0 |
| | MeOH | 235.6 | 0.0 |
| | | 553.7 | 2.0 |
| | | 294.5 | 5.0 |
| | | 294.5 | 10.0 |
| | | 212.0 | 20.0 |
| | | 123.7 | 100.0 |
| 518.3 | 100.0 | | |

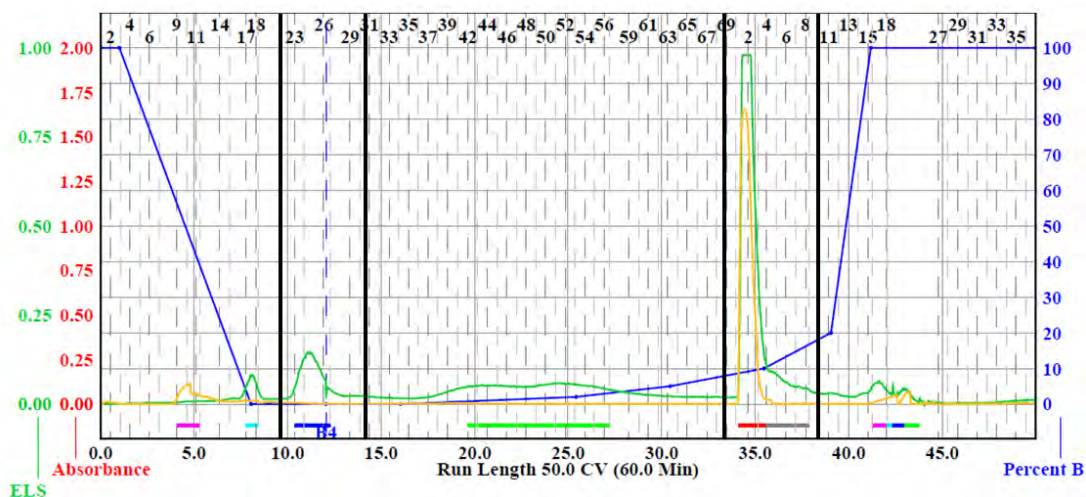


Figura 6. Perfil cromatográfico obtenido del fraccionamiento primario del extracto orgánico CC8-13. Respuesta en el UV (amarillo) y de ELSD (verde).

Cuadro 3. Resumen del fraccionamiento primario del extracto orgánico CC8-13.

| Fracciones | Clave interna | Cantidad de muestra (mg) |
|------------------|---------------|--------------------------|
| 1-20 | 01002-41-1 | 13.2 |
| 21-30 | 01002-41-2 | 14.6 |
| 31-69 | 01002-41-3 | 140.1 |
| 70-79 | 01002-41-4 | 120.5 |
| 80-Final | 01002-41-5 | 262.1 |
| Total Recuperado | | 331.2 |
| %Recuperado | | 98.9 |

Los perfiles cromatográficos preliminares de las fracciones obtenidas se establecieron mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa, empleando un cromatógrafo marca Waters. La inyección de las muestras (3 mg/mL en dioxano-MeOH 1:1) se realizó a través de un automuestreador, y la elución se realizó sobre una columna Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 4.6 mm; Phenomenex), con una mezcla binaria y gradiente como a continuación: ácido fórmico acuoso 0.1% (A) y MeCN (B); isocrático 15% (B) por 5 min, gradiente 30 a 100% de (B) en 15 min, isocrático 100% (B) por 5 min, y periodo de estabilización en las condiciones iniciales de 7 min; tiempo de corrida 32 min; temperatura de la columna 40°C; y flujo 1 mL/min. Los sistemas de detección fueron PDA (190-400 nm) y ELSD, y para este último se utilizaron las siguientes condiciones de análisis: ganancia 100; presión de gas (N₂) 40 psi; y temperatura del tubo 75°C. El control del equipo y procesamiento de los datos se realizó con el programa Empower 3.0 (Waters).

Con base en la complejidad cromatográfica y actividad biológica, las fracciones 01002-41-4 y 01002-41-5 se seleccionaron para su estudio químico. La fracción 01002-41-4 se sometió a un fraccionamiento secundario por cromatografía tipo Flash (columna RediSep Rf Gold Si-gel de 4 g), bajo las condiciones indicadas en el **Cuadro 4**. Para este fraccionamiento, se incluyó AcOEt en el sistema de elución. Las fracciones resultantes fueron reunidas de acuerdo con su similitud cromatográfica y se concentraron a presión reducida hasta sequedad (**Figura 7** y **Cuadro 5**). Finalmente, los conjuntos de fracciones se sometieron a un análisis cromatográfico mediante HPLC en fase reversa, con la finalidad de determinar su complejidad y condiciones analíticas para la purificación de los compuestos mayoritarios.

Cuadro 4. Condiciones cromatográficas empleadas en el fraccionamiento de la fracción 01002-41-4.

| Disolvente A | Disolvente B | Volumen (mL) | %B |
|-------------------|--------------|--------------|-------|
| CHCl ₃ | Hexano | 0.0 | 100.0 |
| | | 23.0 | 0.0 |
| | | 23.0 | 0.0 |
| | AcOEt | 23.0 | 0.0 |
| | | 13.9 | 2.0 |
| | | 13.9 | 5.0 |
| | | 9.1 | 10.0 |
| | | 13.9 | 13.0 |
| | | 9.1 | 16.0 |
| | | 13.9 | 20.0 |
| | | 9.1 | 25.0 |
| | | 18.7 | 35.0 |
| | | 9.1 | 40.0 |
| | | 9.1 | 45.0 |
| | | 18.7 | 55.0 |
| | | 13.9 | 64.0 |
| | | 13.9 | 75.0 |
| | | 18.7 | 90.0 |
| | | 13.9 | 100.0 |
| | | 13.9 | 100.0 |
| MeOH | 13.9 | 100.0 | |
| | 9.1 | 98.0 | |
| | 13.9 | 96.0 | |
| | 13.9 | 92.0 | |
| | 13.9 | 92.0 | |
| | 9.1 | 90.0 | |
| | 13.9 | 85.0 | |
| | 13.9 | 70.0 | |
| | 27.8 | 0.0 | |
| 18.7 | 0.0 | | |

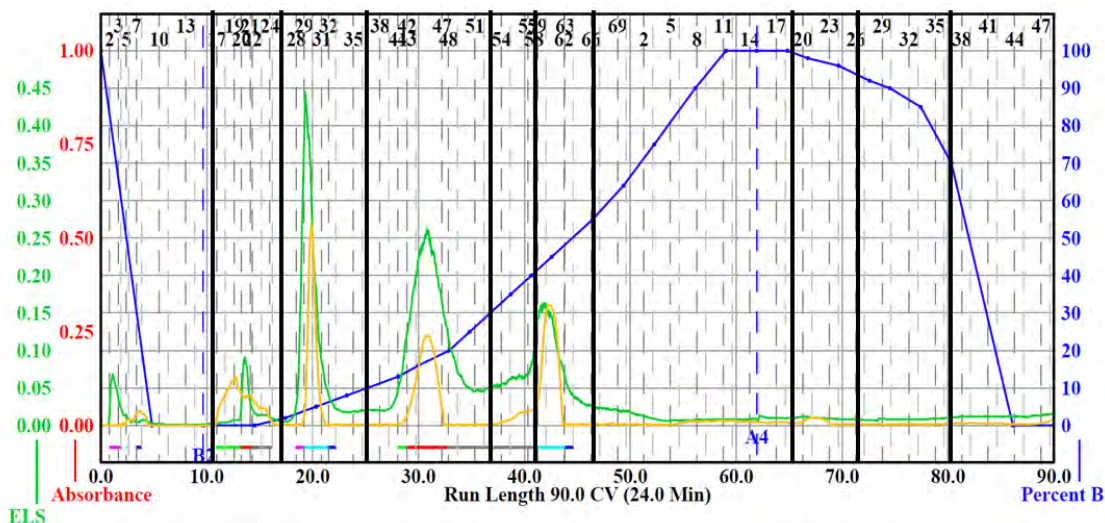


Figura 7. Perfil cromatográfico obtenido del fraccionamiento de 01002-41-4. Respuesta en el UV (amarillo) y de ELS (verde).

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento secundario de la fracción 01002-41-4.

| Fracción | Clave interna | Cantidad de muestra (mg) |
|------------------|---------------|--------------------------|
| 1-15 | 01002-100-1 | 0.6 |
| 16-25 | 01002-100-2 | 2.6 |
| 26-35 | 01002-100-3 | 20.4 |
| 36-51 | 01002-100-4 | 36.4 |
| 52-58 | 01002-100-5 | 14.2 |
| 59-65 | 01002-100-6 | 29.7 |
| 66-98 | 01002-100-7 | 29.4 |
| 99-105 | 01002-100-8 | 1.7 |
| 106-117 | 01002-100-9 | 8.6 |
| 118-Final | 01002-100-10 | 13.9 |
| Total Recuperado | | 157.5 |
| %Recuperado | | 44.9 |

4.6. Aislamiento y purificación de metabolitos mayoritarios.

Con base en los perfiles cromatográficos obtenidos a partir de las fracciones primarias activas y/o fracciones secundarias, se seleccionaron algunas para el aislamiento y purificación de los metabolitos mayoritarios. Los métodos de análisis por HPLC en fase reversa fueron optimizados hasta la resolución adecuada de los compuestos mayoritarios.

Así, la optimización de las condiciones analíticas de la fracción primaria 01002-41-5 por HPLC permitió la obtención del cromatograma indicado en la **Figura 8**, en donde se observa la presencia de tres compuestos mayoritarios: Las condiciones analíticas utilizadas fueron las siguientes: ácido fórmico acuoso 0.1% (A) y MeCN (B); gradiente 30 a 100% (B) en 15 min; isocrático 100% (B) por 5 min; y periodo de estabilización en las condiciones iniciales de 7 min; tiempo de corrida 27 min; temperatura de la columna 40°C; y flujo 1 mL/min. Los sistemas de detección fueron PDA (190-400 nm) y ELSD La purificación de los metabolitos mayoritarios se llevó a cabo mediante HPLC a nivel preparativo y utilizando el mismo sistema de elución obtenido del escalamiento de las condiciones a partir de los resultados a nivel analítico: columna Gemini C₁₈ (5 µm, 250 × 21.2 mm); flujo 21.24 mL/min. La inyección de cada una de las muestras se realizó de forma manual (**Figura 9**). Finalmente, los compuestos separados fueron posteriormente reinyectados en el mismo sistema cromatográfico a nivel analítico para comprobar su pureza. Así, este procedimiento permitió la obtención de los compuestos puros identificados con las claves internas 01002-90-5 (1.9 mg) y 01002-90-6 (4.0 mg).

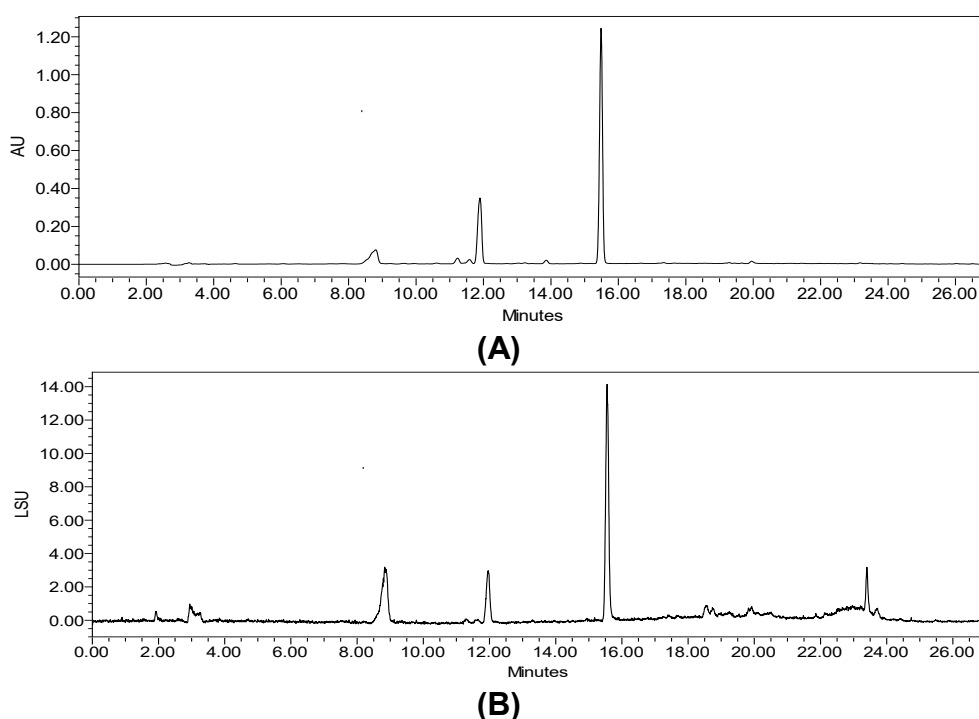


Figura 8. Perfil cromatográfico por HPLC analítico de la fracción 01002-41-5: **(A)** Detección en el UV $\lambda=254$ nm y **(B)** ELSD.

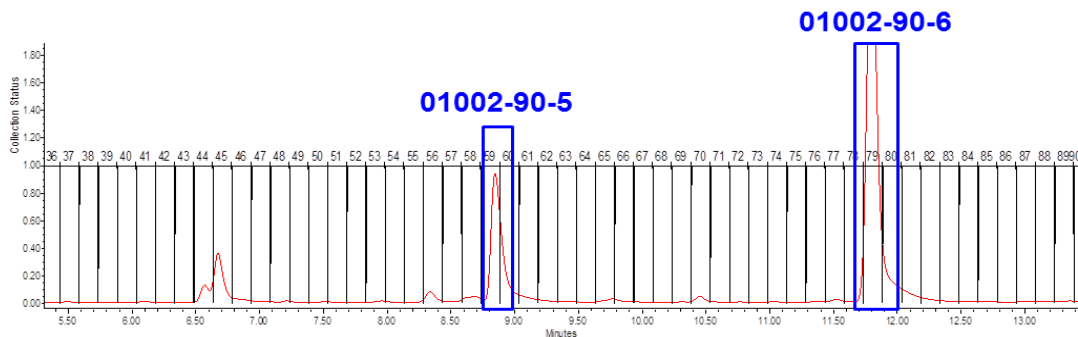


Figura 9. Perfil cromatográfico por HPLC a nivel preparativo de la fracción 01002-41-5 (UV $\lambda=254$ nm).

4.7. Caracterización de los productos naturales.

Los espectros de ^1H RMN de 400 MHz y ^{13}C RMN de 100 MHz se registraron en un equipo JEOL ECS 400. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS). Los disolventes empleados para los registros fueron $\text{MEOH-}d_4$ y $\text{DMSO-}d_6$. Los espectros de masas se obtuvieron por introducción a través de un UPLC, y éste se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución Thermo LTQ Orbitrap XL con ionización por electrospray-masas/masas (HRESIMS-MS/MS). Los resultados se adquirieron en los modos positivo y negativo (ESI+ y ESI-). El registro de los espectros de RMN se llevó a cabo en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química, y los de masas en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, NC, EE.UU.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo forma parte de una línea de investigación enfocada en la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad herbicida a través de estudios químicos biodirigidos de algunos taxones fúngicos aislados de ambientes inexplorados de nuestro país. En esta sección se discutirán, en primera instancia, los resultados de la evaluación del potencial fitotóxico y el estudio químico detallado del organismo fúngico *Alternaria* sp. (CC8-13) proveniente de una muestra de placa microbiana sobre rocas de la RCCC. En la segunda parte, se discutirán los resultados obtenidos de la evaluación del potencial fitotóxico de una serie de metabolitos secundarios aislados a partir de diversos hongos marinos facultativos de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero.

5.1. Estudio químico biodirigido de especies fúngicas provenientes de la RCCC.

La estrategia metodológica empleada para el desarrollo de esta investigación se resume en la **Figura 10**. A partir de una muestra de placa microbiana proveniente de la Cueva del Junco, RCCC (26°49'41.0" N; 102°16'17.0" O) (**Figura 11**), se aislaron de 20 taxones fúngicos los cuales fueron acondicionados y cultivados en pequeña escala en medio de arroz húmedo. Al cabo del periodo de crecimiento, se obtuvieron sus correspondientes extractos orgánicos y cuyos rendimientos se indican en el **Cuadro 6**. Posteriormente, se realizó la evaluación del potencial fitotóxico de los extractos orgánicos a las concentraciones 10, 100 y 1000 ppm (**Cuadro 7**). Con base en los resultados obtenidos a partir de la evaluación biológica, se seleccionó al organismo con código CC8-13 (**Figura 12**) para realizar su estudio químico, ya que este extracto presentó los mejores porcentajes de inhibición de la germinación y del crecimiento radicular de la semilla de prueba. Cabe mencionar que con el apoyo del Dr. Huzefa Raja de la UNCG, se identificó a la especie fúngica como *Alternaria* sp. (CC8-13), mediante la secuenciación molecular del espaciador interno transcrito (código de barras) y análisis BLAST contenidas en el GenBank.

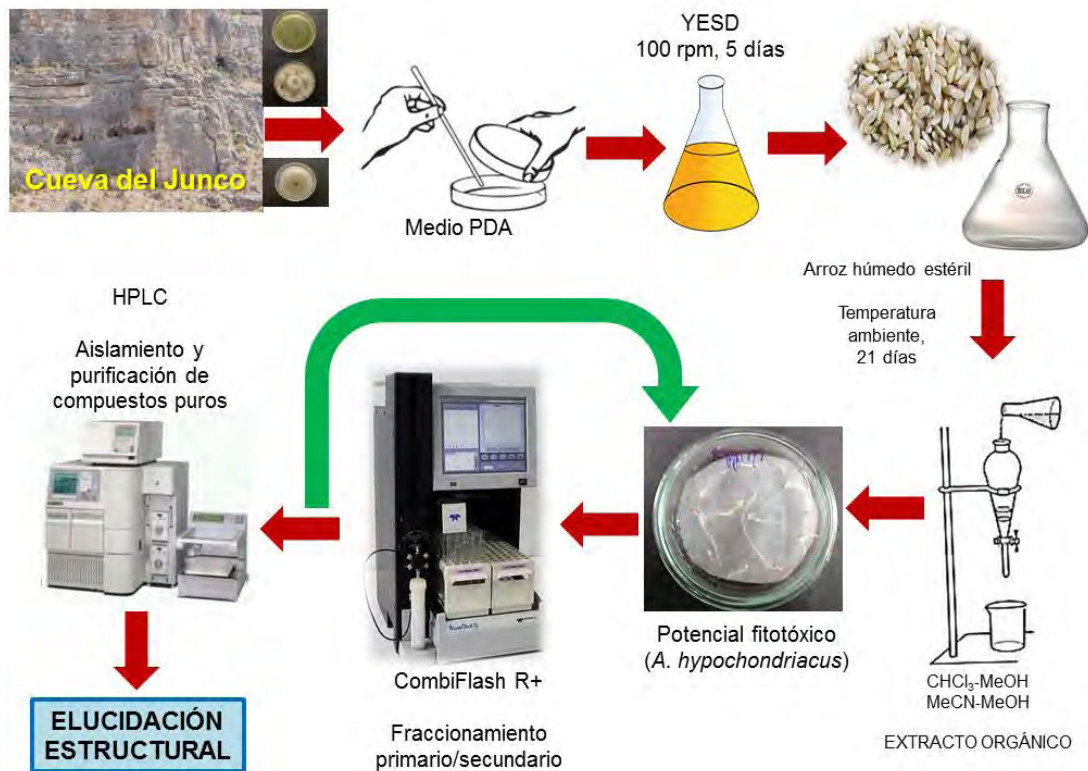


Figura 10. Estrategia metodológica general empleada para el estudio químico de las especies fúngicas provenientes de la RCCC.



Figura 11. Vista aérea de la RCCC y ubicación geográfica del sitio de recolección de muestra (Cueva del Junco).

Cuadro 6. Rendimientos de los extractos orgánicos en pequeña escala obtenidos a partir de los taxones fúngicos aislados.

| Código interno | Cantidad de muestra (mg) | Código interno | Cantidad de muestra (mg) |
|----------------|--------------------------|----------------|--------------------------|
| CC8-1 | 327.8 | CC8-12 | 192.7 |
| CC8-2 | 25.5 | CC8-13 | 126.6 |
| CC8-3 | 56.1 | CC8-14 | 29.4 |
| CC8-4 | 128.9 | CC8-15 | 44.6 |
| CC8-5 | 40.6 | CC8-16 | 43.2 |
| CC8-6 | 102.0 | CC8-17 | 123.7 |
| CC8-7 | 116.6 | CC8-18 | 20.6 |
| CC8-8 | 70.2 | CC8-19 | 73.6 |
| CC8-9 | 37.5 | CC8-20 | 25.4 |
| CC8-11 | 52.8 | CC8-21 | 53.3 |

Cuadro 7. Efecto fitotóxico de los extractos orgánicos en pequeña escala sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*.

| Código interno | % de inhibición de la germinación | | | % de inhibición del crecimiento radicular* | | |
|----------------|-----------------------------------|-----------|-----------|--|-----------|-----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm |
| CC8-1 | 10 | 7 | 0 | -144 | -142 | -26 |
| CC8-2 | 0 | 0 | 10 | 27 | 13 | 36 |
| CC8-3 | 37 | 40 | 100 | -34 | 15 | 100 |
| CC8-5 | 10 | 7 | 0 | -144 | -141 | -26 |
| CC8-6 | 27 | 20 | 37 | 3 | 18 | 47 |
| CC8-8 | 0 | 0 | 0 | 17 | 45 | 49 |
| CC8-9 | 0 | 0 | 0 | 32 | 36 | 28 |
| CC8-11 | 4 | 7 | 0 | 23 | 28 | 32 |
| CC8-12 | 0 | 0 | 0 | 17 | 36 | 35 |
| CC8-13 | 17 | 37 | 67 | 11 | 33 | 75 |
| CC8-15 | 3 | 23 | 10 | 18 | 31 | 35 |
| CC8-16 | 0 | 0 | 0 | -1 | 22 | 48 |
| CC8-17 | 0 | 0 | 0 | 17 | 45 | 49 |
| CC8-18 | 0 | 0 | 0 | 27 | 13 | 36 |
| CC8-19 | 0 | 0 | 0 | 13 | 12 | 31 |
| CC8-20 | 0 | 0 | 0 | 24 | 17 | 29 |
| CC8-21 | 0 | 0 | 0 | 27 | 13 | 36 |

* Los valores negativos indican una estimulación en el crecimiento radicular.



Figura 12. Registro digital de los cultivos de taxón CC8-13 en medio agar papa dextrosa **(A)** y de arroz húmedo: vista inferior **(B)** y superior **(C)**.

Una vez realizada la fermentación en mediana escala (6×) de la especie *Alternaria* sp, se preparó el extracto orgánico, obteniéndose un rendimiento de 772 mg. Este extracto fue sometido a la misma evaluación biológica que los extractos en pequeña escala, observándose una actividad similar sobre la inhibición del crecimiento radicular de las semillas de prueba y una disminución en la actividad sobre la germinación (**Cuadro 8**). Es importante mencionar que en la literatura se ha establecido que el crecimiento de un microorganismo en un medio limitado en nutrientes, como el caso del medio utilizado en nuestros experimentos, induce o estimula la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, no todas las especies poseen la misma capacidad de adaptación y, en ocasiones, durante el escalamiento, se presenta disminución en la biosíntesis de algunos metabolitos.

Posterior a la evaluación fitotóxica, se llevó a cabo el fraccionamiento primario de aproximadamente la mitad del extracto obtenido (335 mg) mediante cromatografía tipo Flash en fase normal. De esta manera, se obtuvieron cinco conjuntos de fracciones primarias designadas con los códigos internos 01002-41-1 a 01002-41-5, mismas que fueron evaluadas para establecer su potencial fitotóxico. Los resultados de la evaluación se presentan en el **Cuadro 8**.

Cuadro 8. Efecto fitotóxico del extracto orgánico en mediana escala y fracciones primarias del hongo CC8-13 sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*.

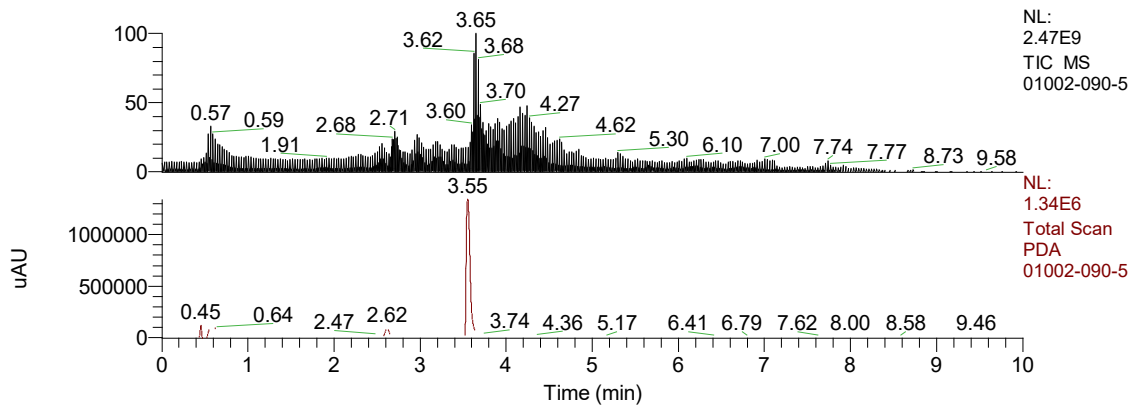
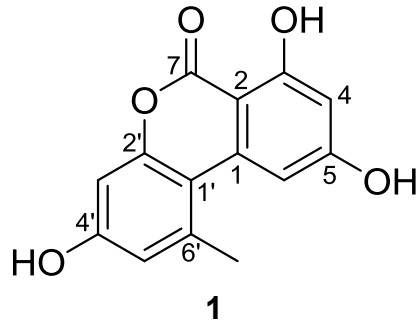
| Código interno | % de inhibición de la germinación | | | | | % de inhibición del crecimiento radicular | | | | | |
|-------------------|-----------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---|----------------|----------------|----------------|----------------|---------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm | 10 ppm | 100 ppm | 1000 ppm | 10 ppm | 100 ppm | 250 ppm | 500 ppm | 750 ppm |
| CC8-13 | 7 | 20 | 20 | 13 | 21 | 63 | | | | | |
| 01002-41-1 | 10 | 13 | 47 | 34 | 51 | 36 | | | | | |
| 01002-41-2 | 10 | 7 | 27 | 13 | 38 | 59 | | | | | |
| 01002-41-3 | 17 | 10 | 27 | 14 | 19 | 40 | | | | | |
| 01002-41-4 | 13 | 10 | 3 | 3 | 22 | 82 | | | | | |
| 01002-41-5 | 10 | 13 | 20 | 22 | 29 | 35 | | | | | |
| | 10 ppm | 100 ppm | 250 ppm | 500 ppm | 750 ppm | 10 ppm | 100 ppm | 250 ppm | 500 ppm | 750 ppm | |
| Gigantol | 0 | 0 | 7 | 50 | 100 | 12 | 32 | 41 | 71 | 100 | |

Estos resultados revelaron que la actividad inhibitoria sobre el crecimiento radicular se concentraba en las fracciones primarias 01002-41-4 y 01002-41-5, por lo que ambas fracciones fueron seleccionadas para realizar el aislamiento de los principios activos.

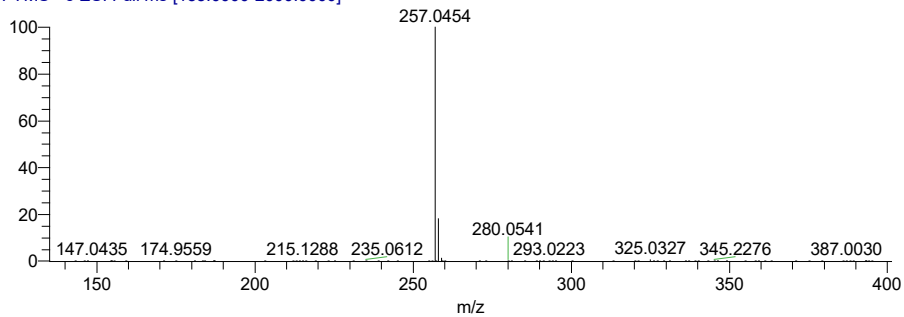
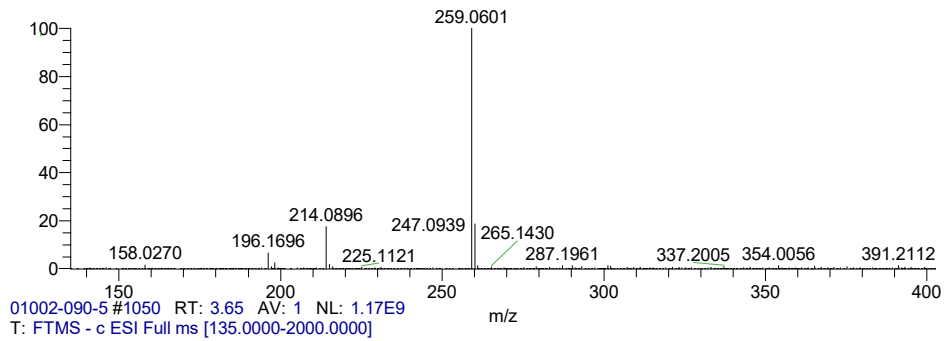
La optimización del perfil cromatográfico de la fracción 01002-41-5 por HPLC a nivel analítico y su purificación por HPLC a nivel preparativo (inciso 4.6), permitió el aislamiento de dos compuestos mayoritarios caracterizados como el alternariol (1) y su derivado 9-metil éter (2). Por otra parte, la fracción 01002-41-4 fue separada mediante cromatografía de tipo Flash como se indicó en el inciso 4.6, y las fracciones obtenidas fueron analizadas por HPLC. A pesar de los numerosos intentos para purificar algunos de los compuestos presentes en dichas fracciones, en todos los casos se observó degradación de las muestras cuando se analizaron por RMN.

5.1.1. Caracterización del alternariol (1).

El producto 1 se obtuvo como un sólido amarillo. Los análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS revelaron la presencia de los iones que corresponden a la molécula protonada y desprotonada en una relación de m/z 259.0601 $[M+H]^+$ y 257.0454 $[M-H]^-$, permitiendo establecer la fórmula molecular del producto como $C_{14}H_{10}O_5$ (10 grados de insaturación) (**Figura 13**).



(A)



(B)

Figura 13. (A) Cromatogramas de corriente iónica total (TIC; arriba) y UV-PDA (abajo) y **(B)** espectros de masas ESI+ (arriba) y ESI- (abajo) del alternariol (**1**).

El análisis detallado realizado de los espectros de RMN (**Cuadro 9** y **Figura 14**), aunado con la búsqueda realizada en la base de datos del Diccionario de Productos Naturales, permitieron establecer la estructura molecular de **1** como el alternariol (De Souza *et al.*, 2013; Aly *et al.*, 2008). Las características más importantes observadas en los espectros de RMN de este producto se resumen a continuación:

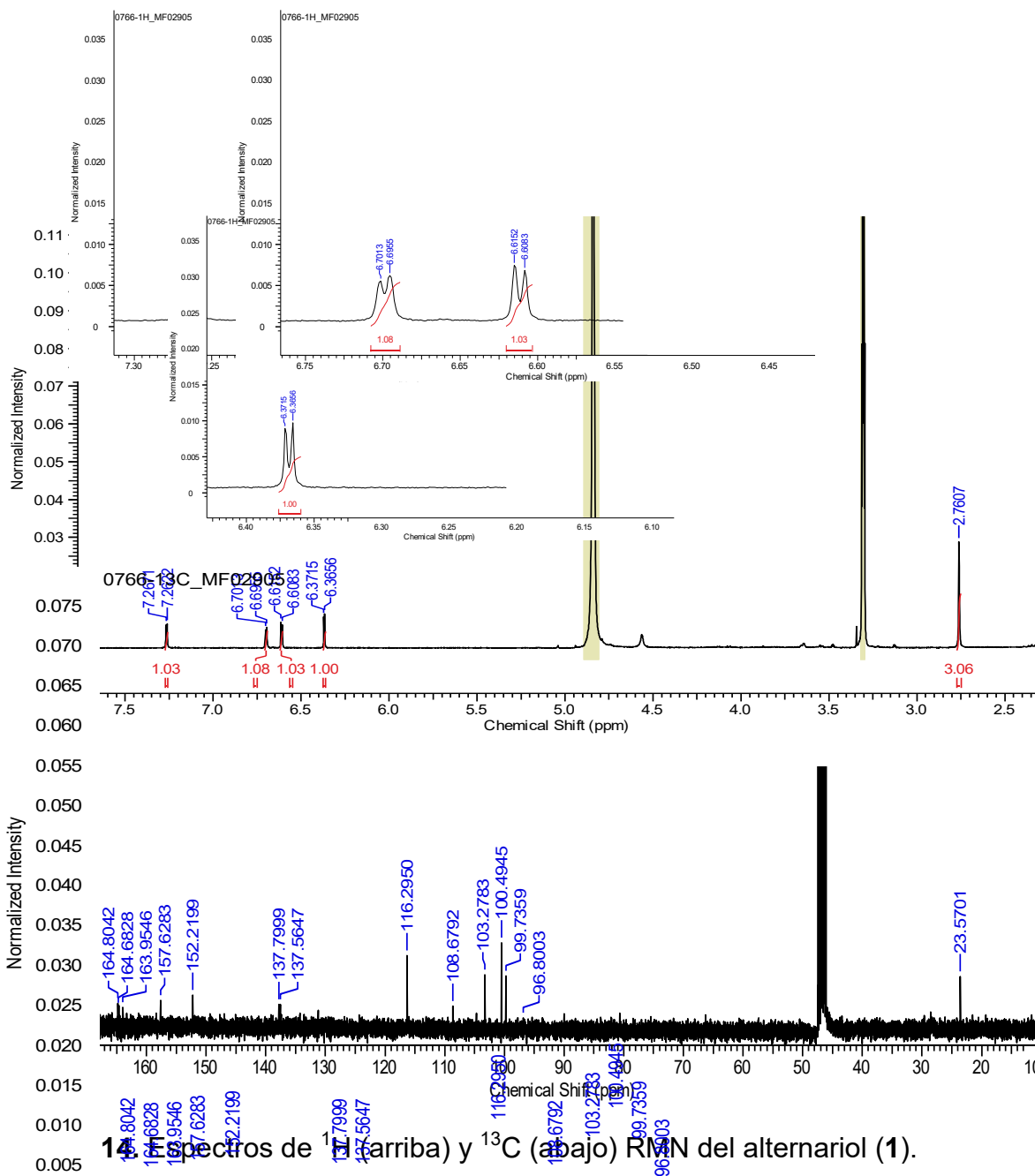
a) En δ_H 2.76 se observa un singlete asignable al grupo metilo 6'-CH₃.

b) En δ_H 6.37 (d, $J= 2.3$ Hz), 6.61 (d, $J= 2.7$ Hz), 6.70 (d, $J= 2.7$ Hz) y 7.26 (d, $J= 2.3$) se observan cuatro conjuntos de señales dobles asignables a los protones aromáticos H-4, H-3', H-5' y H-6, respectivamente. Estas señales corresponden en el espectro de ¹³C RMN con los desplazamientos para las señales centradas en δ_C 99.7 (C-4), 100.5 (C-3'), 116.3 (C-5') y 103.3 (C-6).

c) Finalmente, en el espectro de ¹³C RMN se observan señales correspondientes a carbonos base oxígeno en δ_C 157.6 (C-4'), 164.8 (C-5), 164.0 (C-3) y 152.2 (C-2'), además de una señal atribuible a una función éster en δ_C 164.7 (C-7).

Cuadro 9. Datos espectroscópicos de RMN (MeOH-*d*₄) del alternariol (**1**).

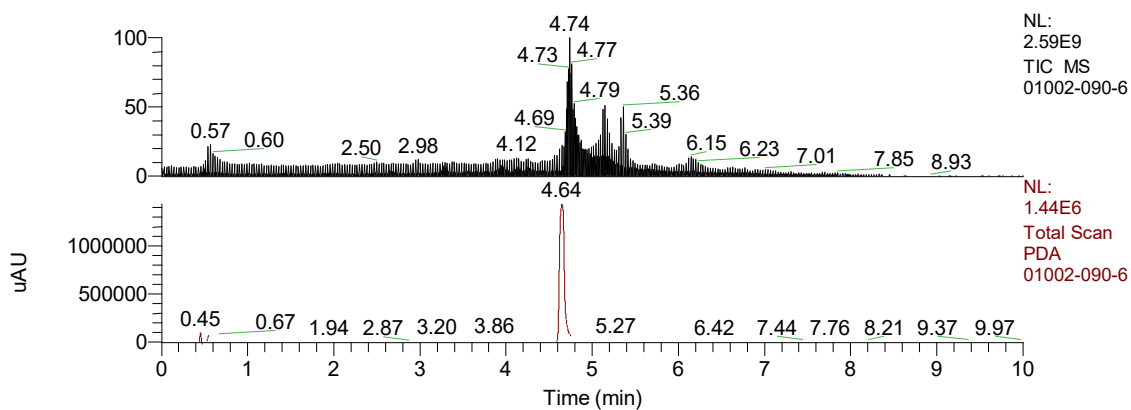
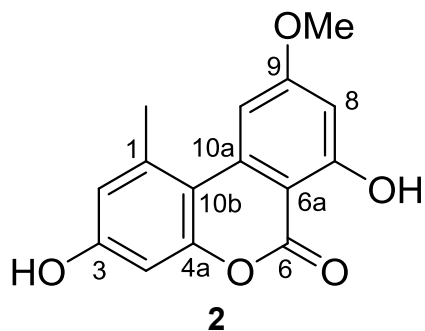
| Posición | Experimentales (¹ H, 400 MHz; ¹³ C, 100 MHz) | | Aly <i>et al.</i> , 2008 (¹ H, 500 MHz; ¹³ C, 125 MHz) | |
|--------------------|--|------------------|--|------------------|
| | δ_H mult (J Hz) | δ_C (ppm) | δ_H mult (J Hz) | δ_C (ppm) |
| 1 | | 137.6 | | 139.8 |
| 2 | | 96.8 | | 99.1 |
| 3 | | 164.0 | | 166.1 |
| 4 | 6.37 d (2.3) | 99.7 | 6.32 d (2.0) | 101.9 |
| 5 | | 164.8 | | 166.8 |
| 6 | 7.26 d (2.3) | 103.3 | 7.20 d (2.0) | 105.4 |
| 7 | | 164.7 | | 166.8 |
| 1' | | 108.7 | | 110.9 |
| 2' | | 152.2 | | 154.4 |
| 3' | 6.61 d (2.7) | 100.5 | 6.55 d (2.5) | 102.7 |
| 4' | | 157.6 | | 159.8 |
| 5' | 6.70 d (2.7) | 116.3 | 6.65 d (2.5) | 118.5 |
| 6' | | 137.8 | | 140.0 |
| 6'-CH ₃ | 2.76 s | 23.6 | 2.71 s | 25.8 |



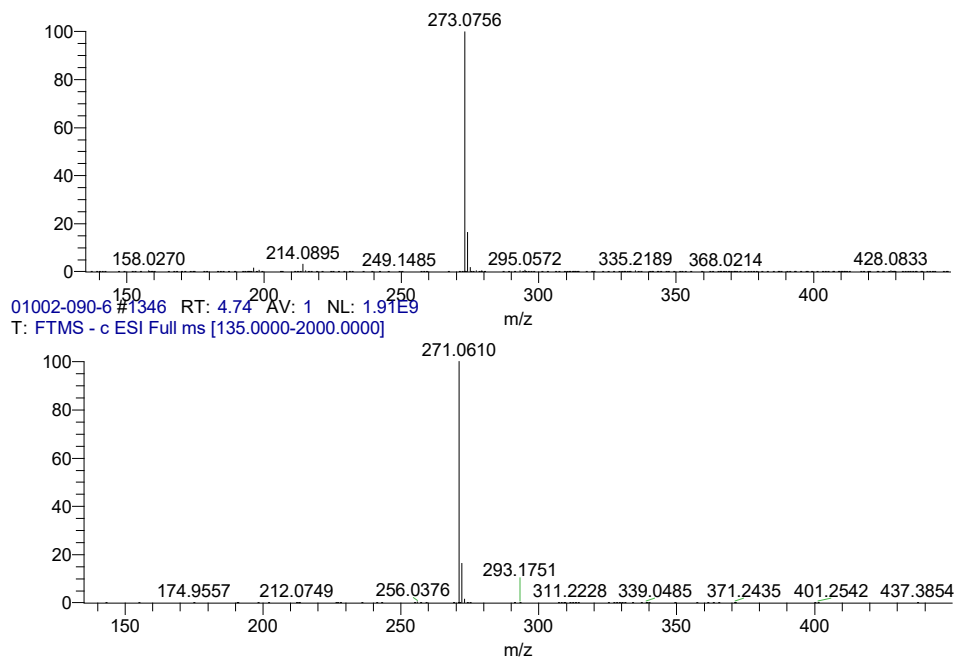
1H y 13C espectros de 1 (arriba) y 13C (abajo) RMN del alternariol (1).

Caracterización del 9-metoxi alternariol (2).

El producto **2** se obtuvo como un sólido blanco amarillento. Los análisis por UPLC-HRESIMS-MS/MS permitieron establecer su fórmula molecular como C₁₅H₁₂O₅ (*m/z* 273.0756 [M+H]⁺; 271.0610 [M-H]⁻), la cual permite 10 grados de insaturación (**Figura 15**).



(A)



(B)

Figura 15. (A) Cromatogramas de TIC (arriba) y UV-PDA (abajo) y **(B)** espectros de masas ESI⁻ (arriba) y ESI⁻ (abajo) del 9-metoxi alternariol (**2**).

El análisis de los espectros de ^1H y ^{13}C RMN (**Cuadro 10** y **Figura 16**), y la comparación de los datos espectroscópicos y espectrométricos con aquellos descritos en la literatura y en las bases de datos especializadas, permitieron identificar al compuesto **2** como el 9-metoxi alternariol (Lou *et al.*, 2016). Las características más importantes observadas en los espectros de RMN son:

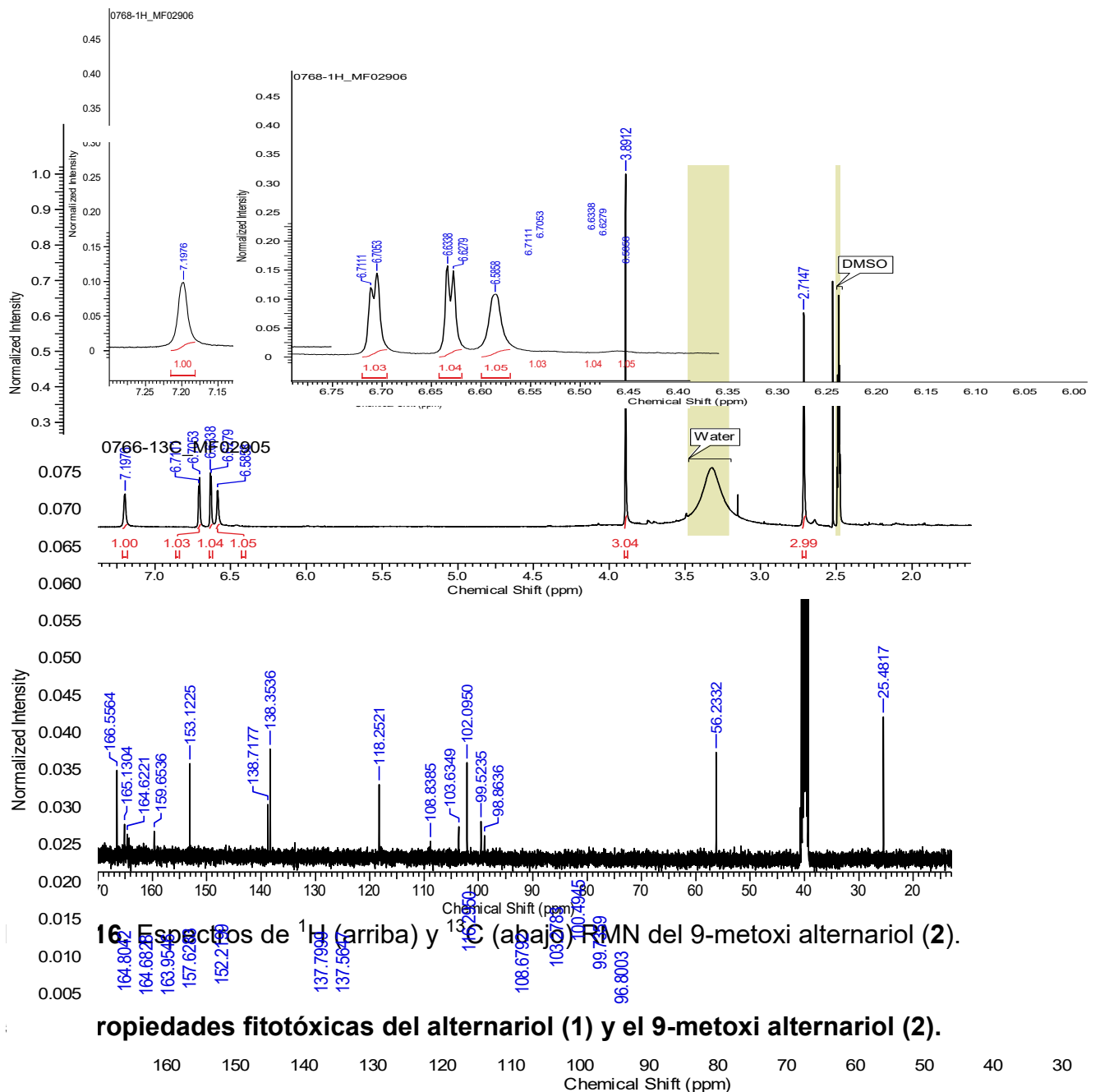
a) En δ_{H} 2.71 y 3.89 se observan dos señales de tipo singulete asignables a un grupo metilo y un metoxilo, respectivamente (1- CH_3 y 9- CH_3O).

b) En δ_{H} 6.63 (d, $J= 2.3$ Hz) y 6.71 (d, $J= 2.3$ Hz) se observan dos conjuntos de señales dobles asignables a los protones aromáticos H-4 y H-2, respectivamente. Estas señales correlacionan en el espectro HSQC con los desplazamientos en δ_{C} 102.09 (C-4) y 118.25 (C-2). Por otra parte, en δ_{H} 6.59 y 7.20 se observan dos singuletes anchos asignables a los protones aromáticos H-8 y H-10, respectivamente.

c) Finalmente, en el espectro de ^{13}C RMN se observan tres carbonos base oxígeno en δ_{C} 159.65 (C-3), 165.13 (C-7), y 166.56 (C-9), y una señal asignable a un grupo éster en δ_{C} 164.62 (C-6).

Cuadro 10. Datos espectroscópicos de RMN (^1H , 400 MHz y ^{13}C , 100 MHz en $\text{DMSO}-d_6$) del 9-metoxi alternariol (**2**).

| Posición | Experimentales | | Lou <i>et al.</i> , 2016 | |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------|---------------------------------|---------------------------|
| | δ_{H} mult (J Hz) | δ_{C} (ppm) | δ_{H} mult (J Hz) | δ_{C} (ppm) |
| 1 | | 138.7 | | 138.5 |
| 1- CH_3 | 2.71 s | 25.5 | 2.74 s | 25.0 |
| 2 | 6.71 d (2.3) | 118.3 | 6.73 d (2.3) | 117.6 |
| 3 | | 159.7 | | 158.9 |
| 4 | 6.63 d (2.3) | 102.1 | 6.65 d (2.4) | 101.6 |
| 4a | | 153.1 | | 152.6 |
| 6 | | 164.6 | | 164.7 |
| 6a | | 98.9 | | 98.5 |
| 7 | | 165.1 | | 164.1 |
| 8 | 6.59 sa | 99.5 | 6.62 d (1.8) | 99.2 |
| 9 | | 166.6 | | 166.2 |
| 9- CH_3O | 3.89 s | 56.2 | 3.91 s | 55.9 |
| 10 | 7.20 sa | 103.6 | 7.23 d (1.6) | 103.6 |
| 10a | | 138.4 | | 137.8 |
| 10b | | 108.8 | | 108.8 |



El alternariol (1) y su derivado 9-metoxi (2) se identificaron por primera vez a partir de un cultivo de *Alternaria alternata* (antes *A. tenuis* Nees) aislado de tomates infectados (Raistrick *et al*, 1953). El alternariol también se produce en diversos hongos endófitos del género *Alternaria*, quienes son responsables de varias enfermedades en plantas de importancia económica como algunos cítricos, zanahorias, etc. (Mikula *et al*, 2013). También, se ha encontrado que algunos organismos del género *Colletotrichum* son capaces de producir alternariol, y se han descrito en la literatura su actividad preemergente en semillas de col, arroz y maní, aunque son más comunes los ensayos posemergentes realizados sobre las partes aéreas de plantas y algunos vegetales (Mao *et al*, 2014) (Cuadro 11). Por otra parte, el 9-metoxi alternariol (2) también ha sido encontrado en especies fúngicas endófitas distintas a *Alternaria*, tales como *Trichoderma* sp. (Zhang *et al*,

2017), *Cephalosporium acremonium*, *Hyalodendriella* sp., *Nigrospora sphaerica* y *Phialophora* sp. (Lou *et al*, 2016) y presenta una actividad fitotóxica importante (De Souza *et al*, 2013; Robbana-Barnat *et al*, 1989) (**Cuadro 11**).

Cuadro 11. Actividad fitotóxica descrita para el alternariol (1) y 9-metoxi alternariol (2).

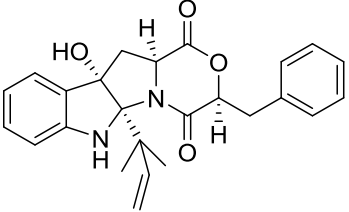
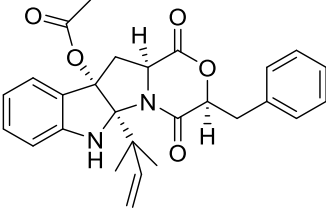
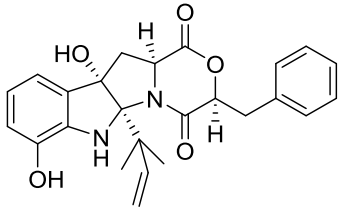
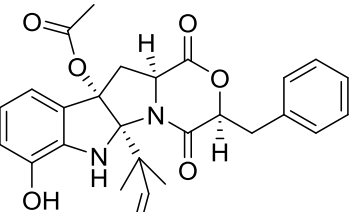
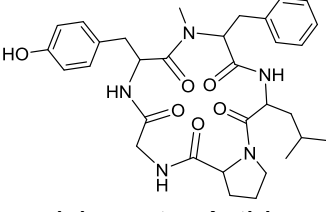
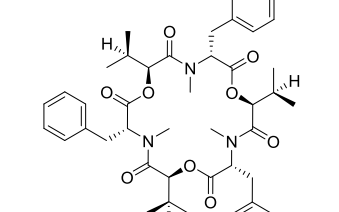
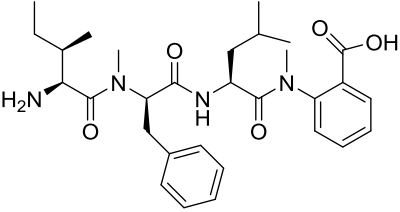
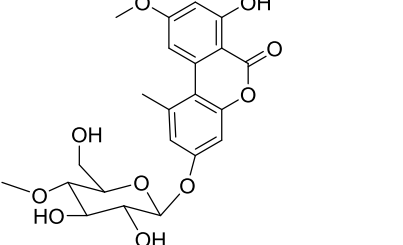
| Compuesto | Planta de prueba / parte estudiada | Actividad fitotóxica | Referencia |
|--|---|--|-------------------------------|
| alternariol (1) | col / semillas | inhibición de la germinación | Zhang <i>et al</i> , 2017. |
| | maní / semillas y partes aéreas ^a | inhibición del crecimiento radicular y germinación; desarrollo de manchas necróticas en hojas ^b | Devi <i>et al</i> , 2010. |
| | arroz / semillas y partes aéreas ^a | | |
| 9-metoxi alternariol (2) | tabaco / partes aéreas ^a | inducción de clorosis en hojas | Harvan y Pero, 1976. |
| | col / semillas | inhibición de la germinación | Zhang <i>et al</i> , 2017. |
| | haba de soya / células vegetales ^c | citotoxicidad | De Souza <i>et al</i> , 2013. |
| | canola / semillas | inhibición del crecimiento radicular y del hipocótilo | Visconti <i>et al</i> , 1992. |
| ^a Ensayo posemergente; ^b Ensayo cualitativo para los extractos orgánicos a partir de los cuales se aisló la toxina de interés; ^c Ensayo realizado sobre cultivos celulares en suspensión. | | | |

5.2. Evaluación de la actividad fitotóxica de metabolitos obtenidos a partir de especies fúngicas provenientes de la Bahía de Caleta en Acapulco, Guerrero.

Con la finalidad de continuar con la búsqueda de nuevos agentes herbicidas a partir de hongos marinos facultativos, en la presente disertación se evaluó el efecto fitotóxico potencial sobre *A. hypochondriacus* de algunos productos previamente aislados en nuestro grupo de trabajo

Los metabolitos estudiados en esta sección se aislaron a partir de diferentes taxones fúngicos designados con el código interno ACA (**Cuadro 12** y **Cuadro 13**). La evaluación del efecto inhibitorio sobre la germinación y el crecimiento radicular de la maleza de prueba se realizó empleando el procedimiento descrito en el inciso 4.4, y los resultados de estos ensayos se resumen en el **Cuadro 14**.

Cuadro 12. Estructuras de los productos evaluados en el ensayo de fitotoxicidad.

| | | |
|---|---|--|
|  <p>9-deoxy-PF1233 B</p> |  <p>9-deoxy-PF1233 A</p> |  <p>shornefina A</p> |
|  <p>PF1233 A</p> |  <p>ciclopentapéptido novedoso</p> |  <p>beauvericina</p> |
|  <p>ácido hirsutélico A</p> | |  <p>derivado glicosilado novedoso del 4- metoxi alternariol</p> |

Cuadro 13. Fuente de obtención y peso molecular de los metabolitos estudiados.

| Clave del hongo | Nombre del metabolito | Peso molecular (uma) |
|-----------------|--|----------------------|
| ACA-9 | 9-deoxy-PF1233 B | 418.1886 |
| | shornefina A | 434.1834 |
| | PF1233 A | 476.1941 |
| | 9-deoxy-PF1233 A | 460.1992 |
| | ciclopentapéptido novedoso | 633.3493 |
| ACA-13 | beauvericina | 783.4066 |
| ACA-16 | derivado glicosilado novedoso del 4-metoxi alternariol | 448.1380 |
| ACA-17 | ácido hirsutélico | 524.2974 |

De manera general, todos los compuestos evaluados mostraron algún grado de actividad inhibitoria, siendo el ácido hirsutólico (inhibición del crecimiento radicular, 59.5% a 3.81 mmol/L) y el 9-deoxi-PF1233 B (inhibición del crecimiento radicular, 53.8% a 4.78 mmol/L) los que presentaron la mejor actividad. Para algunos metabolitos evaluados, por ejemplo el derivado glicosilado novedoso del 4-metoxi alternariol, se observan variaciones en la germinación de las semillas que representan incrementos de la inhibición a concentraciones más bajas. Estas variaciones podrían indicar que, a pesar de que estos metabolitos son activos, pudieran no ser tan eficaces para inhibir la germinación. Finalmente, la beauvericina ha sido reportada como fitotoxina posemergente sobre protoplastos y hojas de tomate, melón, trigo y cebada (Moretti *et al*, 2002). En todas las evaluaciones realizadas se encontró que este compuesto causa marchitez en las partes aéreas de la plántula y una reducción notablemente la viabilidad de los protoplastos. Esta última característica se considera como el efecto más severo de la beauvericina y se encuentra en armonía con los resultados obtenidos en este trabajo. El mecanismo de acción propuesto para esta toxina sugiere alteraciones en el metabolismo celular, que se traducen en fallas en la percepción y la transducción de señales de condiciones ambientales desfavorables para la planta (Paciolla *et al*, 2004, 2008).

Cuadro 14. Efecto fitotóxico de los compuestos sobre la germinación y el crecimiento radicular de semillas de *A. hypochondriacus*.

| Compuesto | % de inhibición de la germinación | | | | | | % de inhibición del crecimiento radicular | | | | | |
|---|-----------------------------------|---------|---------|---------|----------|----------|---|---------|---------|---------|----------|----------|
| | 10 ppm | 100 ppm | 250 ppm | 500 ppm | 1000 ppm | 2000 ppm | 10 ppm | 100 ppm | 250 ppm | 500 ppm | 1000 ppm | 2000 ppm |
| Beauvericina | 5 | 10 | 20 | 5 | 10 | 0 | 27 | 26 | 28 | 26 | 39 | 35 |
| Ácido hirsutólico | 5 | 5 | 0 | 15 | 15 | 25 | 16 | 19 | 39 | 30 | 38 | 60 |
| 9-deoxi-PF1233 B | 5 | 0 | 10 | 15 | 10 | 10 | 23 | 15 | 27 | 36 | 37 | 54 |
| Shornefina A | 5 | 5 | 0 | 15 | 15 | 25 | 5 | 2 | 15 | 26 | 14 | 37 |
| PF1233 A | 10 | 0 | 20 | 20 | 20 | 10 | 14 | 11 | 35 | 21 | 22 | 38 |
| Ciclopentapéptido novedoso | 10 | 25 | 15 | 25 | 20 | 25 | 31 | 18 | 8 | 6 | 19 | 24 |
| Derivado glicosilado novedoso del 4-metoxi alternariol | 25 | 20 | 30 | 20 | 0 | 20 | 2 | 13 | 33 | 16 | 18 | 22 |
| 9-deoxi-PF1233 A | 10 | 15 | 10 | 10 | 5 | 5 | 8 | 22 | 9 | 25 | 22 | 25 |
| Batatacina* | 15 | 10 | 10 | 25 | 40 | 95 | 11 | 15 | 19 | 29 | 63 | 83 |
| Gigantol* | 5 | 15 | 10 | 15 | 40 | 90 | 6 | 8 | 13 | 18 | 31 | 82 |

* Controles positivos

6. CONCLUSIONES

- En la presente investigación se logró el aislamiento, acondicionamiento y cultivo de 20 taxones fúngicos a partir de una muestra de placa microbiana proveniente de la Cueva del Junco, en la RCCC.

- La evaluación de la actividad fitotóxica de los extractos orgánicos obtenidos a partir de los taxones aislados, utilizando como semilla de prueba *A. hypochondriacus*, permitió la selección de la especie CC8-13 como una fuente potencial para el aislamiento de moléculas con actividad sobre la germinación y el crecimiento radicular de la maleza.

- El estudio químico biodirigido de la especie *Alternaria sp* (CC8-13) permitió el aislamiento y caracterización del alternariol (**1**) y su derivado 9-metoxi (**2**), los cuales han sido descritos ampliamente en la literatura como fitotoxinas.

- La evaluación de la actividad fitotóxica sobre semillas de amaranto de los metabolitos novedosos aislados en el grupo de trabajo, a partir de hongos marinos facultativos, permitió evidenciar el potencial fitotóxico del ácido hirsutólico, el 9-deoxi-PF1233 B y la beauvericina.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H.K.; Vesonder, R.F.; Boyette, C.D.; Peterson, S.W. (1993). *Phytotoxicity of AAL-toxin and Other Compounds Produced by Alternaria alternata to Jimsonweed (Datura stramonium)*. Canadian Journal of Botany, 71, 155-160.
- Aly, A.H.; Edrada-Ebel, R.; Indriani, I.D.; Wray, V.; Müller, W.E.G.; Totzke, F.; Zirrgiebel, U.; Schächtele, C.; Kubbutat, M.H.G.; Lin, W.H.; Proksch, P.; Ebel, R. (2008). *Cytotoxic Metabolites from the Fungal Endophyte Alternaria sp. and Their Subsequent Detection in Its Host Plant Polygonum senegalense*. Journal of Natural Products, 71, 972–980.
- Aparicio-Cuevas, M.A.; Rivero-Cruz, I.; Sánchez-Castellanos, M.; Menéndez, D.; Raja, H.A.; Joseph-Nathan, P.; González, M.D.C.; Figueroa, M. (2017). *Dioxomorpholines and Derivatives from a Marine-Facultative Aspergillus Species*. Journal of Natural Products, 80, 2311-2318.
- Bhadury, P.; Mohammad, B.T.; Wright, P.C. (2006). *The Current Status of Natural Products from Marine Fungi and Their Potential as Anti-Infective Agents*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 33, 325–337.
- Bills, G.F.; Foster, M.S.; Mueller, G.M. (2005). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. BioScience, 55, 282–283.
- Blodgett, J.A.V.; Zhang, J.K.; Yu, X.; Metcalf, W.W. (2016). *Conserved Biosynthetic Pathways for Phosalacine, Bialaphos and Newly Discovered Phosphonic Acid Natural Products*. The Journal of Antibiotics, 69, 15-25.
- Cantrell, C. L.; Dayan, F. E.; Duke, S. O. (2012). *Natural Products as Sources for New Pesticides*. Journal of Natural Products, 75, 1231-1242.
- De Souza, G.D.; Mithöfer, A.; Daolio, C.; Schneider, B.; Rodrigues-Filho, E. (2013). *Identification of Alternaria alternata Mycotoxins by LC-SPE-NMR and Their Cytotoxic Effects to Soybean (Glycine max) Cell Suspension Culture*. Molecules, 18, 2528-2538.
- Deshidi, R.; Devari, S.; Kushwaha, M.; Gupta, A.P.; Sharma, R.; Chib, R.; Khan, I.A.; Jaglan, S.; Shah, B.A. (2017). *Isolation and Quantification of Alternariols from Endophytic Fungus, Alternaria alternata: LC-ESI-MS/MS Analysis*. ChemistrySelect, 2, 364–368.
- Devi, P.S.; Reddy, M.N.; Murthy, S.D.S.; Devamma, M.N.; Jayalakshmi, P.; Revathi, G. (2010). *Isolation and Characterization of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether Produced by Alternaria alternata of Groundnut*. The Bioscan, 5, 323-330.
- Elser, J.J.; Schampel, J.H.; Garcia-Pichel, F.E.R.R.A.N.; Wade, B.D.; Souza, V.; Eguiarte, L.; Escalante A.N.A.; Farmer, J.D. (2005). *Effects of Phosphorus Enrichment and Grazing Snails on Modern Stromatolitic Microbial Communities*. Freshwater Biology, 50, 1808-1825.

- Escalante, A.E.; Eguiarte, L.E.; Espinosa-Asuar, L.; Forney, L.J.; Noguez, A.M.; Souza Saldivar, V. (2008). *Diversity of Aquatic Prokaryotic Communities in the Cuatro Ciénegas Basin*. FEMS Microbiology Ecology, 65, 50-60.
- Ferrusquía Villafranca, I.; Zárate, S. (1998). *Geología de México: Una Sinopsis. Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. Universidad Nacional Autónoma de México, México, CDMX: Instituto de Biología, 689-713.
- Fierro, F.; Vaca, I. (2015). *Filamentous Fungi from Extreme Environments as a Promising Source of Novel Bioactive Secondary Metabolites*. Frontiers in Microbiology, 6, 1-7.
- Gaddeya, G.; Easteru Rani, G.; Susmitha, B.; Subhashini, K. (2017). *Microbial Technology in Weed Management: a Special Reference of Biological Control of Horse Purslane Weed*. International Journal of Current Advanced Research, 6, 4978-4991.
- Gerwick, B. C.; Sparks, T. C. (2014). *Natural Products for Pest Control: an Analysis of Their Role, Value and Future*. Pest Management Science, 70, 1169-1185.
- Harvan, D.J.; Pero, R.W. (1976). *The Structure and Toxicity of the Alternaria Metabolites*. Advances in Chemistry. Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems, 149, 344–355.
- Hubbard, M.; Hynes, R.K.; Erlandson, M.; Bailey, K.L. (2014). *The Biochemistry Behind Biopesticide Efficacy*. Sustainable Chemical Processes, 2:18.
- Imhoff, J.F. (2016). *Natural Products from Marine Fungi—Still an Underrepresented Resource*. Marine Drugs, 14, 1-19.
- Lou, J.; Fu, L.; Peng, Y.; Zhou, L. (2013). *Metabolites from Alternaria Fungi and Their Bioactivities*. Molecules, 18, 5891-5935.
- Lou, J.; Yu, R.; Wang, X.; Mao, Z.; Fu, L.; Liu, Y.; Zhou, L. (2016). *Alternariol 9-Methyl Ether from the Endophytic Fungus Alternaria sp. Samif01 and Its Bioactivities*. Brazilian Journal of Microbiology, 47, 96-101.
- Magnuson, J.K.; Lasure, L.L. (2002). *Fungal Diversity in Soils as Assessed by Direct Culture and Molecular Techniques*. 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt Lake City, 19-23.
- Mao, Z.; Sun, W.; Fu, L.; Luo, H.; Lai, D.; Zhou, L. (2014). *Natural Dibenzo- α -Pyrones and Their Bioactivities*. Molecules, 19, 5088-5108.
- Mikula, H.; Skrinjar, P.; Sohr, B.; Ellmer, D.; Hametner, C.; Fröhlich, J. (2013). *Total Synthesis of Masked Alternaria Mycotoxinsdsulfates and Glucosides of Alternariol (AOH) and Alternariol-9-Methyl Ether (AME)*. Tetrahedron, 69, 10322-10330.
- Moretti, A.; Belisario, A.; Tafuri, A.; Ritieni, A.; Corazza, L.; Logrieco, A. (2002). *Production of Beauvericin by Different Races of Fusarium oxysporum f. sp. melonis, the Fusarium Wilt Agent of Muskmelon*. European Journal of Plant Pathology, 108, 661-666.

- Mouton, M.; Postma, F.; Wilsenach, J.; Botha, A. (2012). *Diversity and Characterization of Culturable Fungi from Marine Sediment Collected from St. Helena Bay, South Africa*. *Microbial Ecology*, 64, 311–319.
- Paciolla, C.; Dipierro, N.; Mulè, G.; Logrieco, A.; Dipierro, S. (2004). *The Mycotoxins Beauvericin and T-2 Induce Cell Death and Alteration to the Ascorbate Metabolism in Tomato Protoplasts*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65, 49–56.
- Paciolla, C.; Ippolito, M.P.; Logrieco, A.; Dipierro, N.; Mulè, G. (2008). *A Different Trend of Antioxidant Defense Responses Makes Tomato Plants Less Susceptible to Beauvericin than to T-2 mycotoxin phytotoxicity*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72, 3-9.
- Raistrick, H.; Stickings, C.E.; Thomas, R. (1953). *Studies in the Biochemistry of Micro-organisms. 90. Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether, Metabolic Products of Alternaria tenuis*. *Biochemical Journal*, 55, 421-433.
- Redfield, A.C. (1934). *On the Proportions of Organic Derivatives in Sea Water and Their Relation to the Composition of Plankton*. University Press of Liverpool, 177-192.
- Robbana-Barnat, S.; Lafarge-Frayssinet, C.; Frayssinet, C. (1989). *Use of Cell Cultures for Predicting the Biological Effects of Mycotoxins*. *Cell Biology and Toxicology*, 5, 217-226.
- Sica, V.P.; Figueroa, M.; Raja, H.A.; El-Elimat, T.; Darveaux, B.A.; Pearce, C.J.; Oberlies, N.H. (2016). *Optimizing Production and Evaluating Biosynthesis in situ of an Herbicidal Compound, Mevalocidin, from Coniolaria sp.* *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43, 1149–1157.
- Sosa-Rodríguez, T.; Sánchez-Nieves, J.; Melgarejo, L.M. (2009). *Papel Funcional de los Hongos en Ecosistemas de Manglar*. *Boletín de Investigaciones Marinas y Costeras*, 38, 39-57.
- Souza, V.; Siefert, J.L.; Escalante, A.E.; Elser, J.J.; Eguiarte, L.E. (2012). *The Cuatro Ciénegas Basin in Coahuila, Mexico: An Astrobiological Precambrian Park*. *Astrobiology*, 12, 641-647.
- Tachibana, K.; Kaneko, K. (1986). *Development of a New Herbicide, Bialaphos*. *Journal of Pesticide Science*, 11, 297-304.
- Tan, N.; Tao, Y.; Pan, J.; Wang, S.; Xu, F.; She, Z.; Lin, Y.; Jones, E.B.G. (2008). *Isolation, Structure Elucidation, and Mutagenicity of Four Alternariol Derivatives Produced by the Mangrove Endophytic Fungus no. 2240*. *Chemistry of Natural Compounds*, 44, 296-300.
- Templeton, G.E.; TeBeest, D.O. (1979). *Biological Weed Control With Mycoherbicides*. *Annual Review of Phytopathology*, 17, 301-310.
- Templeton, G.E.; TeBeest, D.O. (1985). *Mycoherbicides: Progress in the Biological Control of Weeds*. *Plant disease*, 69, 6-10.

- Traxler, M.F.; Kolter, R. (2015). *Natural Products in Soil Microbe Interactions and Evolution*. *Natural Products Reports*, 32, 956-970.
- Visconti, A.; Sibilia, A.; Sabia, C. (1992). *Alternaria alternata* from Oilseed Rape: *Mycotoxin Production, and Toxicity to Artemia salina Larvae and Rape Seedlings*. *Mycotoxin Research*, 8, 9-16.
- Zhang, J.-C.; Chen, G.-Y.; Li, X.-Z.; Hu, M.; Wang, B.-Y.; Ruan, B.-H.; Zhou, H.; Zhao, L.-X.; Zhou, J.; Ding, Z.-T.; Yang, Y.-B. (2017). *Phytotoxic, Antibacterial, and Antioxidant Activities of Mycotoxins and Other Metabolites from Trichoderma sp.* *Natural Product Research*, 31, 1-8.