



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE Calophyllum brasiliense EN LOS HONGOS COLONIZADORES DE LAS HOJAS: ESTUDIO in vitro

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

EDUARDO ANTONIO AGUILAR BAÑUELOS



DIRECTOR DE TESIS: DR. RICARDO REYES CHILPA
CO-DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. GUADALUPE VIDAL GAONA



2005 FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

m346561



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Eduardo Antonio Aguilar Bañuelos

FECHA: 3 de Agosto de 2005

FIRMA: [Signature]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Efecto de los metabolitos secundarios de *Calophyllum brasiliense* en los hongos colonizadores de las hojas: estudio *in vitro*

realizado por Aguilar Bañuelos Eduardo Antonio

con número de cuenta 0 9121423-8 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director

Propietario

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

[Signature]

Co-director
Propietario

M. en C. Guadalupe Vidal Gaona

[Signature]

Propietario

M. en C. Simón Sánchez García

[Signature]

Suplente

Dr. Arturo Aguilar Rojas

[Signature]

Suplente

Biól. Mariana del Olmo Ruiz

[Signature]

Consejo Departamental de Biología

[Signature]

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-5 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química y en el Laboratorio de Micología de la Facultad de Ciencias; ambos recintos de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Ricardo Reyes Chilpa y Co-dirección de la M. en C. Guadalupe Vidal Gaona.

La presente investigación fue financiada por el proyecto “Búsqueda de Compuestos de Origen Vegetal con Posible Actividad Inhibitoria de la Transcriptasa Reversa del Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1 (VIH-1)”, DGAPA-UNAM (IN207301).

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por todas las enseñanzas, facilidades, confianza y amistad otorgadas.

A mi co-directora de tesis, M. en C. Guadalupe Vidal Gaona, por responsabilizarse y creer en este trabajo. Gracias por compartir tus conocimientos, confianza y amistad durante todo este tiempo.

A los miembros del jurado; M. en C. Simón Sánchez García, Dr. Arturo Aguilar Rojas y Biól. Mariana del Olmo Ruiz; por sus asertivas correcciones y comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Joaquín Cifuentes Blanco, por las facilidades brindadas para la elaboración del presente trabajo.

A mis compañeros del laboratorio 2-5: Alicia, Álvaro, Claudia, Elizabeth, Estrella, Jaquelina, Maira y Suria; por compartir su amistad y hacer más ameno el tiempo de trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de micología: Edmundo, Margarita, Mariana, y Sigfrido, por brindarme su amistad y atenciones.

A Maira y Arturo Sony, por ser un ejemplo de vida y unos grandes amigos.

A mi Estrella por compartir su vida conmigo a lo largo de estos años. Gracias por ser punta de lanza en cada uno de mis logros.

A mis padres, hermanos, tíos y primos por su apoyo incondicional.

“Adquirimos nuestra visión del mundo natural parándonos en los hombros de los científicos que vinieron antes de nosotros”

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
2.1. Los Hongos	2
2.2. Interacción planta-hongo	4
2.3. <i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	6
3. Planteamiento del problema	12
4. Hipótesis	12
5. Objetivos	13
6. Materiales y Métodos	14
6.1. Preparación de extractos	14
6.2. Aislamiento e identificación de compuestos	16
6.2.1. Compuestos aislados	16
6.2.2. Compuestos estándares	17
6.3. Aislamiento e identificación de hongos	18
6.4. Pruebas biológicas	19
6.4.1. A nivel de extracto	19
6.4.2. A nivel de compuesto	20
6.5. Análisis estadístico	23
7. Resultados	24
7.1. Composición química de los extractos de <i>Calophyllum brasiliense</i>	24
7.2. Hongos colonizadores de las hojas	24
7.3. Actividad biológica	26
8. Discusión	41
9. Conclusiones	44
10. Bibliografía	45
I. Apéndice compuestos	53
II. Apéndice hongos	58

RESUMEN

En las plantas, las hojas vivas proporcionan un hábitat rico en nutrientes para una buena cantidad de organismos entre los que destacan los hongos. Por otro lado, el árbol tropical *Calophyllum brasiliense* Cambess presenta en sus hojas una fuente rica de metabolitos secundarios. En México existen dos poblaciones que difieren en cuanto a los constituyentes químicos de los extractos hexánicos de las hojas: el Quimiotipo 1, el cual presenta como constituyente mayoritario la cumarina mammea A/BA y el Quimiotipo 2, cuyo componente principal es la cromanona ácido apetalico. Estos hechos permitieron plantear la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto de estos metabolitos secundarios mayoritarios, de ambos quimiotipos, en los hongos colonizadores de las hojas?

Con la finalidad de resolver esta cuestión el presente estudio consistió en primera instancia en la preparación de los extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos, de las hojas de los quimiotipos 1 y 2 de *C. brasiliense*, obteniéndose los principales compuestos de los mismos. Posteriormente se aislaron e identificaron los hongos presentes en las hojas de esta especie. Finalmente, con las cepas de hongos aislados, se evaluó la actividad de los extractos (a 10 mg/ml) y sus compuestos mayoritarios (a 1 mg/ml), mediante la técnica de incorporación de estos al medio de cultivo.

Los resultados mostraron que de las cinco especies de hongos aisladas e identificadas de las hojas de *C. brasiliense*, solo dos especies, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn var. *aeria* (Batista, Lima y Vasconcelos) M. B. Ellis y *Rhizoctonia repens* Bernard fueron afectadas en diferentes grados por los extractos de ambos quimiotipos. Mientras que dichos extractos fueron inocuos a los cultivos de *Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*, *Pestalotiopsis neglecta* (Thümen) Steyaert y *Trichoderma viride* Pers. ex Gray.

Experimentos posteriores mostraron que el efecto inhibitorio es causado por la mammea A/BA (Quimiotipo 1) y por el ácido apetalico (Quimiotipo 2), componentes mayoritarios de los extractos hexánicos. Así como también por el ácido protocatechuico, componente de los extractos acetónicos y metanólicos de ambos quimiotipos.

1. INTRODUCCIÓN

En la naturaleza, las diferentes especies de plantas tienen la habilidad de acumular una amplia variedad de constituyentes de bajo peso molecular, conocidos como metabolitos secundarios. La mayoría de estos son terpenoides y compuestos fenólicos, así como también, compuestos que contienen nitrógeno (alcaloides, cianógenos o glucosinolatos). De esta forma los metabolitos secundarios de origen vegetal constituyen cerca del 80% del total encontrado en la naturaleza (Crawley, 1997).

El propósito de la producción de metabolitos secundarios en las plantas ha sido objeto de controversia. En un principio se les consideraba a estos compuestos productos de desecho, pero diferentes estudios han revelado que estos metabolitos llevan a cabo distintas funciones favorables en las plantas: como reguladores del crecimiento y desarrollo, mensajeros, protectores del estrés ambiental, defensa química, entre otros (Crawley, 1997).

La teoría de que ciertos metabolitos secundarios proporcionan un sistema de defensa química se sustenta en el hecho de que muchos de estos son tóxicos, en diferentes niveles, para otras formas de vida como por ejemplo los hongos. Trabajos llevados a cabo por Melin (1946) revelan que los metabolitos secundarios antifúngicos están ampliamente distribuidos en las plantas.

La especie arbórea tropical *Calophyllum brasiliense* Cambess (Clusiaceae) está ampliamente distribuida en Latinoamérica y sus hojas son ricas en metabolitos secundarios. En México, estudios recientes han revelado la existencia de dos quimiotipos en las hojas de esta especie (Huerta *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2004).

El presente estudio está enfocado a evaluar *in vitro* el efecto de los metabolitos secundarios de las hojas de los dos quimiotipos de *C. brasiliense* en hongos que colonizan las hojas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Los hongos.

Los hongos son un grupo grande y diverso de organismos eucariontes que presentan un estilo de vida único, tienen una distribución mundial extensa y explotan un amplio rango de hábitats: mar, agua dulce, suelo, mantillo y organismos vivos o muertos. Son extremadamente versátiles por la manera en que resuelven los problemas impuestos por el ambiente, poblando desde medios fríos (psicrófilos y psicotolerantes) a calientes (termófilos y los termotolerantes), otros crecen en hábitats con bajo contenido de agua (xerófilos) o con alto contenido osmótico (osmófilos). Algunos incluso llegan a crecer e incrementar su biomasa en sustratos pobres en nutrientes (oligótrofos), utilizando trazas de carbón orgánico y dióxido de carbono (Wainwright, 1988; Jones *et al.*, 1991). Por estas razones, los hongos son ubicuos y cosmopolitas.

Se han descrito alrededor de 74 000 especies de hongos (Hawksworth *et al.*, 2001), sin embargo se ha estimado que podrían existir tantas como 1.5 millones de especies en el mundo (Hawksworth, 2001).

Los hongos son diversos en estructura y organización vegetativa en un gama que va desde unicelulares, como las levaduras, hasta típicamente filamentosos (mohos); constituidos por hifas formadoras de micelio que pueden estar agregadas en paquetes, cordones, o en estructuras altamente diferenciadas.

En la mayoría de los hongos, el crecimiento vegetativo se lleva a cabo a partir de las hifas tubulares filamentosas, las cuales crecen por extensión apical tanto de hifas principales como de ramas, dando como resultado la formación de colonias; dispersándose sobre y a través del sustrato. Muchas estructuras diferenciadas son formadas durante la reproducción.

Los ciclos reproductivos de los hongos son muy variados (Raper, 1966). Para algunas especies se conocen por completo sus fases sexuales y asexuales (holomorfos), para otras se conoce solo la sexual o perfecta (teleomorfos), o solo la asexual o imperfecta (anamorfos);

estos dos últimos estados presentan diferentes morfologías y en la práctica es común encontrar la asignación de nombres científicos de especie a cada una de estas fases. Por esta razón los hongos son descritos como pleomórficos.

Los hongos se reproducen generalmente por medio de esporas, las cuales tienen dos funciones principales: dispersión (Xen esporas) y supervivencia (Memn esporas). Estas son producidas sexual o asexualmente.

Otra característica distintiva de los hongos es el modo en que obtienen sus nutrientes. Estos organismos sintetizan enzimas que son liberadas al sustrato para digerir los nutrientes que subsecuentemente serán absorbidos a través de las membranas y finalmente utilizarlos en el crecimiento y desarrollo (osmótrofos).

Los hongos tienen distintos roles en los ecosistemas, los hay saprobios y simbioses. En general, se acepta la categorización de los hongos hecha por Lewis (1973), con base en su comportamiento nutricional y ecológico:

- **Saprobios obligados:** Son hongos saprótrofos, carentes de capacidad biótrofa y necrótrofa.
- **Parásitos facultativos:** Son hongos normalmente saprótrofos con la habilidad de ser necrótrofos si las condiciones se los permiten.
- **Parásitos obligados:** Son hongos necrótrofos con capacidad saprótrofa restringida, parásitos especializados.
- **Biótrofos facultativos:** Son hongos con capacidad saprótrofa limitada, generalmente en simbiosis con un hospedero, en este grupo están incluidas algunas micorrizas y líquenes.
- **Biótrofos obligados:** Son hongos siempre asociados a un hospedero.

2.2 Interacción planta-hongo.

Estudios fósiles y moleculares sugieren que las plantas terrestres siempre han estado en asociación con hongos (micorrizas) y el producto de esta relación fue un punto clave para que estas colonizaran la tierra (Pirozynski y Malloch, 1975; Pirozynski y Hawksworth, 1988; Pirozynski y Dalpé, 1989). En la actualidad se estima que existen aproximadamente 250,000 especies de plantas vasculares en todo el mundo, en un enorme rango de hábitats: desde las regiones árticas hasta las regiones tropicales, algunas adaptadas a condiciones específicas mientras que otras presentan una amplia distribución. La variedad de formas exhibidas es también inmensa, desde plantas anuales pequeñas hasta enormes árboles de larga vida (Isaac, 1992).

Las plantas vivas y muertas proveen un buen sustrato para el soporte de organismos, como los hongos. La superficie de las hojas constituye un hábitat de naturaleza especial conocido como filoplano (Neville y Webster, 1995). Este es un ambiente altamente influenciado por cambios climáticos tanto generales como locales: exposición luminosa, humedad, sequía, calor y frío. Las fluctuaciones de estos parámetros pueden ser rápidas o lentas, lo cual es importante para la sobrevivencia de los organismos. Este microhábitat varía de especie a especie.

Algunos hongos están relativamente bien adaptados para colonizar las hojas, se adhieren a la superficie con la ayuda de una cubierta mucilaginosa y pegajosa; que les permite formar micelios. Los hongos patógenos, sin embargo, no son capaces de sobrevivir mucho tiempo en la superficie de las plantas, pero están capacitados para penetrar rápidamente los tejidos después de la inoculación. Una vez que la hoja se ha separado de la planta, la microflore del filoplano actúa como un inóculo para la descomposición. Por ello, no es de extrañar que muchos de los habitantes del filoplano también sean considerados como habitantes del suelo.

Los diferentes tipos de hongos asociados a las hojas pueden agruparse de la siguiente manera (Heredia, 2003):

- ***Colonizadores primarios.*** Hongos que invaden las hojas verdes desde los primeros estados de desarrollo foliar; pueden ser especies saprobias. En este grupo se incluyen hongos del filoplano y hongos endófitos. Generalmente desaparecen cuando las hojas caen al suelo.
- ***Saprobios secundarios.*** Especies que están latentes desde los primeros estados de desarrollo foliar, proliferan a medida que las hojas envejecen y pueden persistir después de la abscisión. En este grupo además de hongos saprobios se encuentran parásitos débiles.
- ***Saprobios secundarios de la hojarasca.*** Especies que colonizan los restos vegetales en el suelo. Se desarrollan en las hojas en diferentes etapas de descomposición, desaparecen cuando la estructura foliar es amorfa.
- ***Saprobios secundarios del suelo.*** Especies que se desarrollan en los últimos estados de descomposición foliar. Son hongos muy prolíferos, asociados a partículas del humus. Están presentes en este grupo especies típicas del suelo.

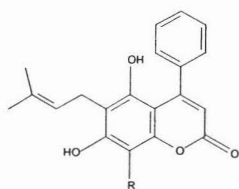
2.3 *Calophyllum brasiliense* Cambess.

La especie *C. brasiliense* es un árbol tropical perteneciente a la familia Clusiaceae, única especie del género *Calophyllum* con distribución en México. Tiene distintos nombres comunes según sea la región de donde provenga: Barí, Leche María, Leche amarilla, Ocu (sur de Ver., Tab., Chis., Costa de Oaxaca); Sakbalamté (tzeltal, Zona Lacandonia, Chis.); Barillo (Oaxaca) Guayana (Norte de Chis., Tab.). Mide hasta 50 metros de alto y más de un metro de diámetro a la altura del pecho (d.a.p.), con el tronco derecho, ramas ascendentes, copa redondeada y densa. La corteza es longitudinalmente fisurada o agrietada, pardo morena cobriza; con un exudado lechoso intensamente amarillo. Las hojas son opuestas o decusadas, simples, coriáceas, elípticas u oblongas muy vistosas por su color verde brillante en el haz, verde pálidas en el envés, con nervios secundarios perpendiculares al central, muy juntos, numerosos y paralelos dando la apariencia de una pluma de ave. Las flores son dioicas y los frutos son del tipo de las drupas.

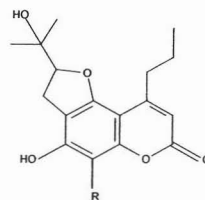
Esta especie de árboles tropicales se distribuye en la vertiente del Golfo de México, desde el sur de Veracruz hasta Quintana Roo, y en la vertiente del Pacífico desde Nayarit hasta Chiapas. Se encuentra como componente principal de selvas altas perennifolias o medianas subperennifolias y subcaducifolias, en suelos con buen drenaje, derivados con material calizo, ígneo y metamórfico. En el sur de Veracruz, oeste de Tabasco y norte de Chiapas es una especie muy abundante y codominante de la selva alta perennifolia junto con *Terminalia amazonia* (J. F. Gmel.) Exell, *Dialium guianense* (Aubl.) Sandwith y *Guatteria anomala* R. E. Fries. Su amplitud altitudinal va desde 600 hasta 650 msnm.

La especie es apreciada por su madera de excelente calidad que se utiliza para construir quillas, mástiles, costillas y armaduras de embarcaciones, así como también para fabricar muebles finos, artículos torneados, triplay, parquet, puentes, decoración de interiores, mangos de herramientas y carrocerías. Además, el aceite que contienen sus semillas se utiliza en ciertas localidades con fines de iluminación y para curar algunas enfermedades cutáneas, el látex que maná del tronco se conoce como bálsamo de María y se le atribuyen propiedades medicinales. En algunos lugares se utiliza como planta de sombra y ornato (Miranda, 1952; Pennington y Sarukhan, 1968; Niembro, 1990).

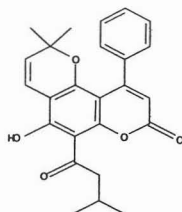
En la búsqueda de compuestos con posible actividad antiviral VIH-1 y antitumoral se detectaron en México dos poblaciones de *Calophyllum brasiliense* que difieren en sus constituyentes químicos de las hojas. El primer estudio se realizó con hojas de ejemplares colectados en la sierra de Santa Martha (Volcán de San Martín Pajapan) Veracruz, en donde se obtuvieron del extracto hexánico, una buena cantidad de diversas cumarinas preniladas (Reyes *et al.*, 2004) del tipo reportado en el genero *Mammea* sp (Crombie *et al.*, 1967) y *Mesua* sp (Morel *et al.*, 1999); y en la especie *C. dispar* P. F. Stevens (Guilet *et al.*, 2001) (Figura 1). Ninguna de las cumarinas aisladas presentó actividad antiviral VIH-1, no obstante, estos compuestos mostraron citotoxicidad contra tres líneas celulares tumorales humanas (Reyes *et al.*, 2004).



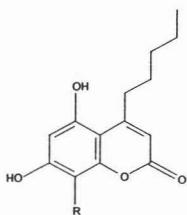
Mammea A/BA, R1
Mammea A/BB, R2



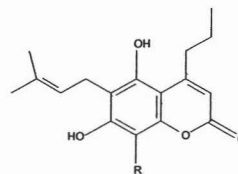
Mammea B/BA, R1, ciclo F
Mammea B/BB, R2, ciclo F



Isomammeigina



Mammea C/OA, R1
Mammea C/OB, R2



Mammea B/BA, R1
Mammea B/BB, R2

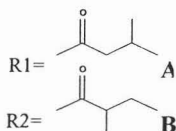
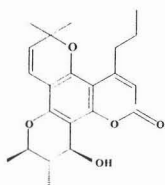
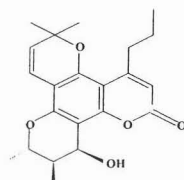


Figura 1. Cumarinas tipo mammea aisladas de las hojas de *Calophyllum brasiliense* (“Sta. Martha”).

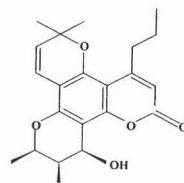
También se han estudiado las hojas de ejemplares de *Calophyllum brasiliense* colectados en la Reserva de Biología Tropical de la UNAM “Los Tuxtlas”, Veracruz. En el extracto hexánico no se encontraron cumarinas tipo mammea, pero sí, dipiranocumarinas tetracíclicas, como son el calanólido A, B, C y soulatrrólido, además de cromanonas de ácidos carboxílicos tales como el ácido apetélico e isoapetélico (Figura 2). Todas estas cumarinas presentaron actividad anti-Transcriptasa Reversa del VIH-1 (Huerta *et al.*, 2004).



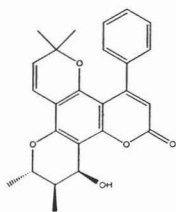
(+)- Calanolido A
(1)



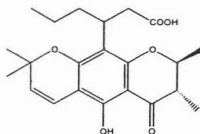
(-)- Calanolido B
(2)



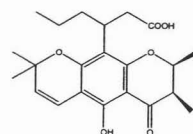
(+)- Calanolido C
(3)



Soulatrrólido
(4)



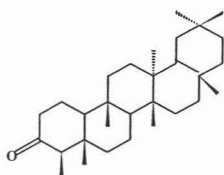
Ácido isoapetélico
(5)



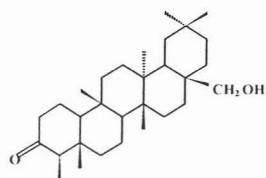
Ácido apetélico
(6)

Figura 2. Dipiranocumarinas (1 – 4) y cromanonas (5 y 6) aisladas de las hojas de *Calophyllum brasiliense* (“Los Tuxtlas”).

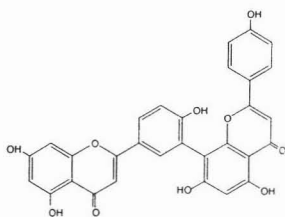
Sin embargo, en los ejemplares de ambas razas químicas o quimiotipos se encontraron compuestos comunes en las hojas, tales como, los triterpenos friedelina y canofilol, y el biflavonoide amentoflavona (Huerta *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2004) (Figura 3).



Friedelina



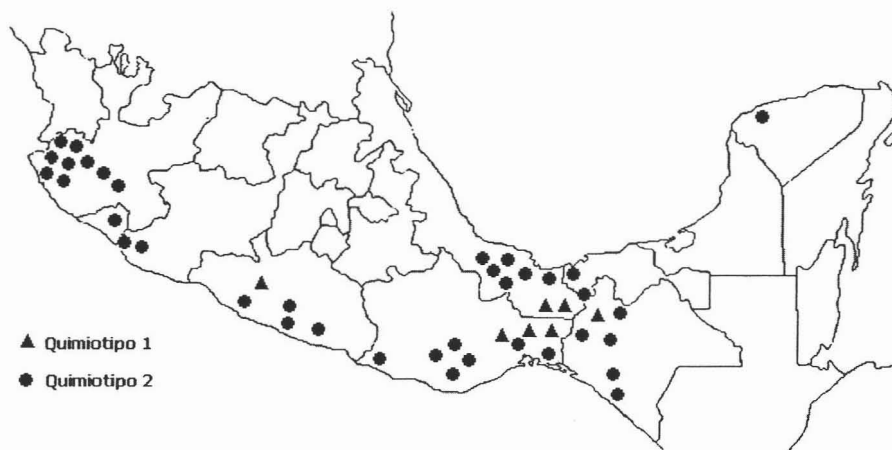
Canofilol



Amentoflavona

Figura 3. Compuestos aislados de las hojas de ambos quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*.

Hasta el momento se han realizado una buena cantidad de análisis cromatográficos con los extractos hexánicos de hojas de ejemplares de *C. brasiliense* proporcionadas del MEXU (Herbario del Instituto de Biología de la UNAM), provenientes de distintas regiones selváticas del país, confirmando que existen dos quimiotipos distintos. Para evitar confusiones se denominó como Quimiotipo 1 a los ejemplares de *C. brasiliense* con cumarinas tipo mammea presentes en las hojas; mientras que aquellos con presencia de cromononas se nombraron Quimiotipo 2. Esta clasificación es temporal en tanto se validen estudios para determinar si se trata de variedades distintas o especies distintas. Resultados preliminares de este estudio han revelado que en México el Quimiotipo 2 es el que tiene mayor distribución (Mapa 1).



Mapa 1. Distribución de los Quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense* en México.

Poco se conoce acerca de la relación que establece la especie *C. brasiliense* con otros organismos, como son los hongos. Sin embargo, se tiene registro que este árbol tropical es hospedero de las siguientes especies de hongos: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Saccardo, *Coniothyrium hyperici* Hennen, *C. hyperici* var. *macrospora* Batista & Peres, *Pestalotiopsis versicolor* (Spegazzini) Steyaert, *Phyllosticta mammaicola* Cif. & Gonz. Frag., *Physalospora mararyensis* Hennen (Mendes *et al.*, 1998), *C. hyperici* var. *macrosporum* Batista & Peres (Batista *et al.*, 1965); en Brasil y *Haplographium calophylli* Wiehe (Spaulding, 1961) en El Salvador. De estas especies destaca *H. calophylli* porque es un patógeno causante de la epidemia conocida como marchitamiento vascular. Esta enfermedad produce en *C. brasiliense* un daño vascular severo, desencadenando el marchitamiento rápido de todas las hojas y finalmente la muerte del árbol (Crandall, 1949).

En México, García-Guzmán y Dirzo (2004), examinaron la severidad e incidencia del daño causado por los hongos a las hojas de 30 especies de plantas (árboles y lianas) y su posible asociación con la herbivoría, en una zona al este de la Estación de Biología Tropical de la UNAM “Los Tuxtlas” en Veracruz. El estudio reveló que las enfermedades causadas a las hojas por los hongos son un componente prevalente en el follaje, aunque la magnitud del

área foliar afectada es considerablemente baja (5 %). Dichos autores no identificaron las especies de hongos colonizadores de las hojas, no obstante, intentaron ratificar su patogenicidad basándose en los postulados de Koch. De esta manera, confirmaron la identidad de los agentes causales de los síntomas de enfermedad observados.

Entre las especies de plantas estudiadas se encuentra el árbol tropical *Calophyllum brasiliense* en el cual se reportaron tres principales síntomas de enfermedad en las hojas: i) manchas blanquecinas ii) manchas acloróticas y iii) manchas necróticas pequeñas, sin embargo, ninguna de estas patologías ocasionó necrosis extensiva en los tejidos de las hojas, de manera que, tanto para esta especie como para las 29 restantes no se encontró ningún hongo capaz de producir enfermedades características de hongos especializados como son los mildiús, tizones y royas componentes comunes de bosques templados.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La existencia de dos poblaciones con diferentes tipos de metabolitos secundarios en las hojas de *Calophyllum brasiliense* plantea la siguiente interrogante:

¿Cuál es el efecto de los metabolitos secundarios, de cada quimiotipo, en los hongos que colonizan las hojas?

4. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios encontrados en las hojas de la especie *Calophyllum brasiliense*, de alguna de las razas químicas o quimiotipos, presentan efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos colonizadores de las mismas.

5. OBJETIVOS

- ✓ Preparar extractos hexánicos, acetónicos y metanólicos de hojas, de cada uno de los quimiotipos de *Calophyllum brasiliense*.
- ✓ Aislar e identificar los principales metabolitos secundarios presentes en las hojas de ambos quimiotipos de *C. brasiliense*.
- ✓ Aislar e identificar hongos colonizadores de las hojas de *C. brasiliense*.
- ✓ Evaluar mediante experimentos *in vitro* si los extractos de las hojas de ambos quimiotipos de *C. brasiliense* tienen actividad inhibidora contra los hongos aislados.
- ✓ Evaluar mediante experimentos *in vitro* si los principales compuestos aislados de las hojas de ambos quimiotipos de *C. brasiliense* tienen efecto inhibidor contra los hongos que fuesen sensibles a los extractos.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Preparación de extractos.

El material vegetal utilizado fueron hojas de *Calophyllum brasiliense*. Para el Quimiotipo 1 se recolectaron especímenes en el Ejido Benigno Mendoza, Parcela Escolar, Sierra de Santa Martha, Veracruz. Un espécimen de herbario de las plantas recolectadas fue depositado con el número 437 en el Herbario del Instituto de Investigaciones Biológicas de la Universidad Veracruzana. Para el Quimiotipo 2 se recolectaron ejemplares en Río Chumiapan, Laguna de Sotecomapan, Municipio de San Andrés Tuxtla, Veracruz. Un ejemplar de herbario de las plantas recolectadas fue depositado con el número 14425 en el Herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en la ciudad de México.

En la preparación de los extractos se utilizaron 140 g de hojas secas y maceradas para cada uno de los distintos Quimiotipos 1 y 2. La extracción se llevo a cabo a temperatura ambiente en matraces de vidrio de 2000 ml (Pyrex) forrados con papel aluminio (para evitar la descomposición de metabolitos fotosensibles) y etiquetados, colocándose en el interior de estos el material vegetal correspondiente, para posteriormente cubrirse con 1000 ml de solvente. La extracción primero se llevó a cabo con n-hexano, después con acetona y finalmente con metanol. Cada 24 horas se filtraron y concentraron los extractos por destilación, el proceso se realizó de manera exhaustiva hasta agotarse la extracción. Los extractos se colocaron en frascos ámbar etiquetados y tarados. De esta manera, se obtuvieron seis extractos de tres distintas polaridades crecientes para cada uno de los quimiotipos (Diagrama1):

- **Extracto Hexánico Quimiotipo 1 (Q1H)**
- **Extracto Acetónico Quimiotipo 1 (Q1A)**
- **Extracto Metanólico Quimiotipo 1 (Q1M)**
- **Extracto Hexánico Quimiotipo 2 (Q2H)**
- **Extracto Acetónico Quimiotipo 2 (Q2A)**
- **Extracto Metanólico Quimiotipo 2 (Q2M)**

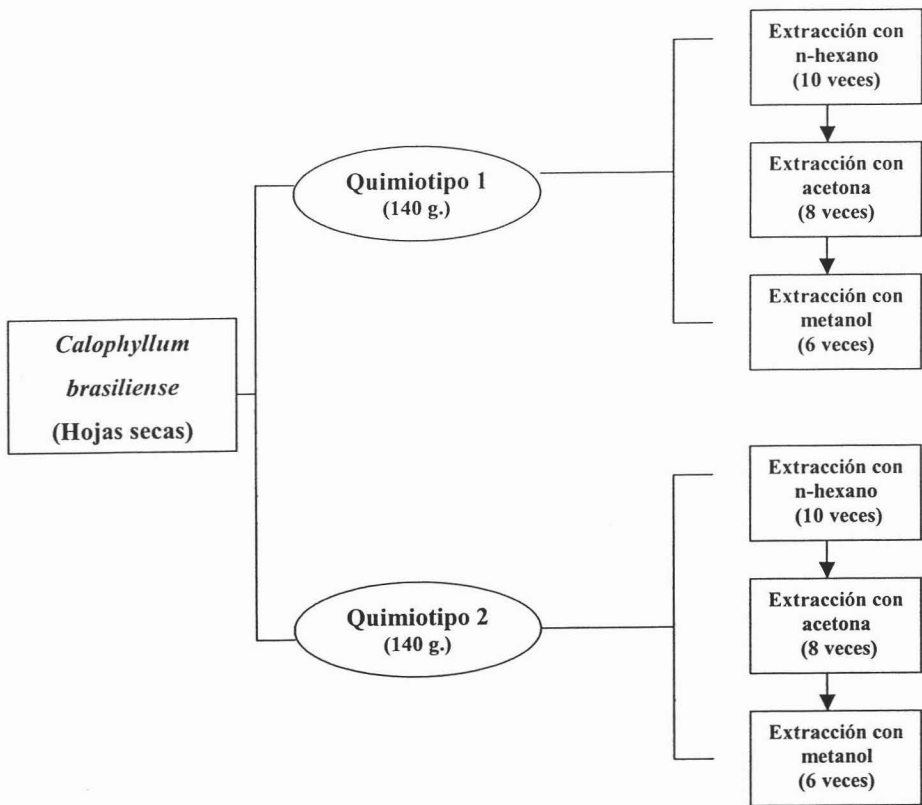


Diagrama 1. Tren de extracción de las hojas de *Calophyllum brasiliense*, Quimiotipos 1 y 2.

6.2 Aislamiento e identificación de compuestos.

Los compuestos fueron aislados de un extracto hexánico preparado de 1000 g de hojas secas de *Calophyllum brasiliense* perteneciente al Quimiotipo 2, utilizando la metodología ya descrita. Para el aislamiento de cada uno de los compuestos se utilizó la técnica de cromatografía en columna (CC) fase normal empacada con gel de sílice 70-230 (Merck), eluyendo con n-hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones. Las fracciones resultantes se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF). Los compuestos se identificaron con base en su coeficiente de reparto (Rf), punto de fusión (p. f.), datos espectrométricos de masas por IE (impacto electrónico) y espectroscópicos de IR (infrarrojo); RMN¹H (resonancia magnética nuclear de protón) y UV (ultravioleta).

6.2.1 Compuestos aislados.

Friedelina y Canofilol.

El extracto hexánico (41.42 g) fue resuspendido en metanol, de manera espontánea se obtuvo un precipitado el cual fue recuperado por filtración. El precipitado (1.46 g) fue sometido a CC fase normal, utilizando una malla de gel de sílice (50 g), eluida con hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones de polaridad creciente. De la columna resultaron 135 fracciones de 100 ml, analizadas en CCF y finalmente reunidas con base a la similitud en el Rf de las manchas. Las fracciones 20 a 101 resultaron ser friedelina (360 mg) y las fracciones 122 a 129 canofilol (400 mg). Ambos triterpenos fueron identificados con base a la similitud de su p. f. y datos espectroscópicos de IR y RMN¹H (Apéndice I), con los reportados en la literatura (Ahmad y Rahman, 1994).

Ácido Apetálico + Isoapetálico.

El sobrenadante metanólico del extracto hexánico se concentró en un rotavapor, obteniéndose una resina de color verde ámbar (35.69 g). Parte de este material (18 g) se pre-adsorbió en celita y se separó en sus constituyentes químicos por CC fase normal, en gel de sílice (300 g), eluida con hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones de polaridad creciente. Las 182 fracciones resultantes de 200 ml fueron analizadas por CCF y reunidas con base a la similitud en el Rf de las manchas. Las fracciones 40-43 presentaron

una sola mancha en CCF fase normal y dos manchas (una mucho mayor que la otra) en CCF fase reversa C-18. Esta sustancia aceitosa de color ámbar (10.04 g), fue identificada por datos espectrométricos de masas, así como también, espectroscópicos de IR; RMN¹H y UV (Apéndice I), como ácido apétálico con trazas de ácido isoapétálico (Govindachari *et al.*, 1968; Shen *et al.*, 2004).

6.2.2 Compuestos estándares.

Mammea A/BA y Amentoflavona.

Los estándares de los compuestos: la cumarina mammea A/BA y el biflavonoide amentoflavona, fueron proporcionados por el laboratorio.

6.3 Aislamiento e identificación de hongos.

La recolecta de hojas maduras de *Calophyllum brasiliense*, para el aislamiento de hongos, se realizó en un sitio aledaño a la carretera a Balzapote en el Municipio de San Andrés Tuxtla, Veracruz. Estas hojas fueron recolectadas de tres individuos marcados como B (17m, N18° 35.989', W95° 4.134'), C y D (17m, N18° 36.006', W95° 4.128') pertenecientes al Quimiotipo 2, creciendo en la rivera norte del río Balzapote. Las hojas presentaban en su superficie manchas blanquecinas circulares de diferentes tamaños (0.2 cm-1 cm) y manchas necróticas pequeñas (0.2 cm), algunas además con ligera clorosis; estos síntomas probablemente ocasionados por hongos. Las muestras se guardaron en sobres de papel hasta su posterior procesamiento en el laboratorio.

En el laboratorio estas hojas fueron cortadas en cuadros de aproximadamente 1cm² obteniéndose 100 trozos. La mitad de estos se lavaron en una solución de hipoclorito de sodio con agua destilada (1.25 %) por un minuto, transcurrido el tiempo se decantaron y escurrieron. Estos trozos de hoja, junto con los que no fueron tratados, se sembraron en cajas petri de plástico estériles de 100 mm x 15 mm con medio de cultivo de hongos Papa Dextrosa Agar (PDA), 10 segmentos de hoja por caja petri por tratamiento. Resultando en 5 cajas petri con tratamiento desinfectante marcadas como Cloro 1, Cloro 2, Cloro 3, Cloro 4 y Cloro 5; así como también, 5 cajas petri sin tratamiento desinfectante marcadas como 1, 2, 3, 4 y 5, finalmente se incubaron a 25 °C. En los días posteriores a la inoculación todas las cajas se revisaron con ayuda de un microscopio estereoscópico y se realizaron preparaciones semi-permanentes (con alcohol polivinílico, alcohol polivinílico + azul de algodón, lactofenol + azul de algodón) que fueron observadas al microscopio óptico. Se obtuvieron cepas puras de hongos mediante resiembras en el mismo medio de cultivo.

Los hongos fueron identificados con base en la morfología de las cepas maduras, con ayuda de claves taxonómicas (con descripciones e ilustraciones) publicadas en revistas científicas y libros especializados (Domsch *et al.*, 1993, Ellis, 1966, Ellis *et al.*, 1997, Klich *et al.*, 2002, Sneh *et al.*, 1991, Sutton, 1980).

6.4 Pruebas biológicas.

Los experimentos se realizaron *in vitro* con las cepas silvestres de hongos aisladas de las hojas de *Calophyllum brasiliense*, utilizando la técnica de incorporación de la solución del extracto o compuesto al medio de cultivo (Reyes *et al.*, 1997). Se efectuaron dos tipos de experimentos:

- ✓ A nivel de extracto
- ✓ A nivel de compuesto

6.4.1 A nivel de extracto.

Para el análisis de la actividad de los seis extractos (Q1H, Q2H, Q1A, Q2A, Q1M y Q2M) se utilizó una concentración de 10 mg/ml. Para ello, se pesaron 150 mg de cada uno y fueron resuspendidos con 1 ml de la solución: acetona/ agua destilada (9:1) en viales de 5 ml, se preparó un vial adicional con 1 ml de la solución para el control. Por otra parte, a 7 tubos para medio de cultivo de 50 ml se les agregó a cada uno 15 ml de medio de cultivo PDA. Se esterilizaron en autoclave por 15 minutos a 121 °C. Posteriormente, bajo la campana de flujo laminar, cada uno de los 7 tubos a una temperatura aproximada de 50 °C, se les incorporó el contenido de uno de los viales. Se homogenizó el medio con ayuda de un vortex y el contenido fue depositado en tres cajas petri de 50 mm x 15 mm de vidrio (Pyrex), 5 ml de medio por caja petri. Obteniéndose los siguientes tratamientos:

- 3 cajas petri con medio PDA + solución acetona /agua destilada (9:1) (Control)
- 3 cajas petri con medio PDA + solución acetona /agua destilada (9:1) + Q1H
- 3 cajas petri con medio PDA + solución acetona /agua destilada (9:1) + Q2H
- 3 cajas petri con medio PDA + solución acetona /agua destilada (9:1) + Q1A
- 3 cajas petri con medio PDA + solución acetona /agua destilada (9:1) + Q2A
- 3 cajas petri con medio PDA + solución acetona /agua destilada (9:1) + Q1M
- 3 cajas petri con medio PDA + solución acetona /agua destilada (9:1) + Q2M

Finalmente, todas las cajas petri se inocularon al centro con discos de micelio (6 mm) de la cepa del hongo a probar. Las cajas inoculadas se incubaron a 25 °C en una estufa microbiológica. Cada 24 horas se midió el crecimiento micelial (Diagrama 2). Este proceso concluyó cuando el hongo cubrió completamente la superficie de las cajas control.

6.4.2 A nivel de compuesto.

El análisis de la actividad de los compuestos se realizó usando la metodología antes descrita a una concentración menor (1 mg/ml). Para ello, se utilizaron 15 mg del compuesto a probar y se disolvieron en 1 ml de acetona en un vial de 5 ml. Se preparó un vial extra con 1 ml del disolvente para el control (Diagrama 3).

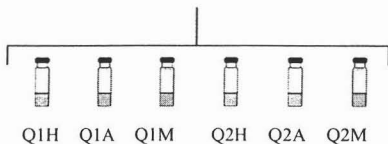
De esta manera se obtuvieron los siguientes tratamientos:

- **3 cajas petri con medio PDA + acetona (control)**
- **3 cajas petri con medio PDA + acetona + compuesto**

**Extractos de los Quimiotipos 1 y 2
de *Calophyllum brasiliense***

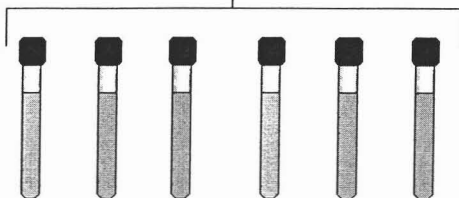
Control

Resuspensión de 150 mg de cada extracto

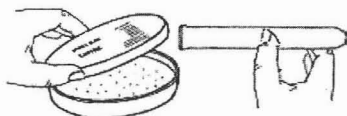


Viales con 1 ml de la solución
acetona / agua (9:1).

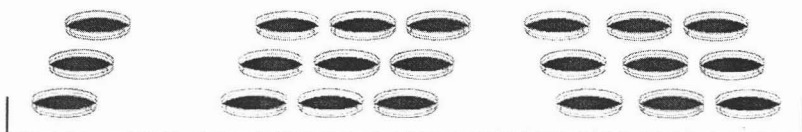
Incorporación al medio de cultivo



Tubos con 15 ml de medio
de cultivo PDA.



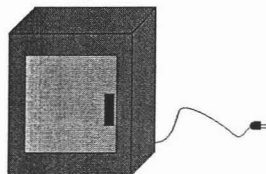
Vaciado de 5 ml de medio
por caja petri.



3 cajas petri por
tratamiento.

Inoculación al centro con discos de micelio.

Incubación a 25 °C



Observación y medición
de las cajas cada 24 horas

Diagrama 2. Experimento a nivel de extracto.

Compuestos de *Calophyllum brasiliense*

Control

Resuspensión de 15 mg de compuesto

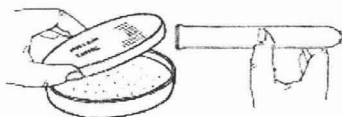


Viales con 1 ml de acetona.

Incorporación al medio de cultivo



Tubos con 15 ml de medio de cultivo PDA.



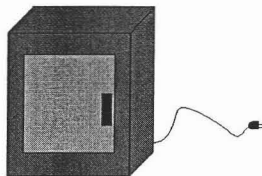
Vaciado de 5 ml de medio por caja petri.



3 cajas petri por tratamiento.

Inoculación al centro con discos de micelio.

Incubación a 25 °C



Observación y medición de las cajas cada 24 horas

Diagrama 3. Experimento a nivel de compuesto.

6.5 Análisis estadístico.

El procesamiento de los datos se realizó utilizando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, en donde, se comparó la media del crecimiento micelial de los controles contra la media del crecimiento micelial de los otros tratamientos.

7. RESULTADOS

7.1 Composición química de los extractos de *Calophyllum brasiliense*.

Se encontraron diferencias en cuanto al rendimiento de los extractos de ambos quimiotipos de *C. brasiliense*. Los extractos hexánicos y acetónicos del Quimiotipo 1, tuvieron un mayor rendimiento en comparación al Quimiotipo 2. A diferencia de lo sucedido entre los extractos metanólicos, en donde fue mayor el rendimiento para el Quimiotipo 2 (Tabla 1).

Tabla 1. Rendimiento de los extractos de *Calophyllum brasiliense*.

Extracto	Quimiotipo 1 (g)	% en peso seco	Quimiotipo 2 (g)	% en peso seco
Hexánico	8.04	5.74	6.99	4.99
Acetónico	8.03	5.73	6.92	4.94
Metanólico	16.04	11.45	23.64	16.9
Total	32.11	22.92	37.55	26.83

7.2 Hongos colonizadores de las hojas.

Cinco especies de hongos fueron aislados e identificados de las hojas de *C. brasiliense*; Cuatro de estas: *Aspergillus japonicus* Saito var. *japonicus*, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn var. *aeria* (Batista, Lima y Vasconcelos) M. B. Ellis, *Pestalotiopsis neglecta* (Thümen) Steyaert y *Trichoderma viride* Pers. ex Gray de las cajas petri sin tratamiento desinfectante; solo una especie, *Rhizoctonia repens* Bernard se aisló de las cajas petri con tratamiento desinfectante. Todas estas especies pertenecen al grupo de los hongos imperfectos (Deuteromycotina) por carecer o encontrarse raramente la fase sexual (Figura 4). Todas las especies aisladas sirvieron de modelo biológico para los experimentos *in vitro*.

Figura 4. Ubicación taxonómica de las especies de hongos estudiadas.

Reino Fungi

División Eumycota

Subdivisión Deuteromycotina

Clases

Hyphomycetes

Orden Moniliales

Familias

Agonomycetaceae

✓ *Rhizoctonia repens*

Moniliaceae

✓ *Aspergillus japonicus* var.
japonicus

✓ *Trichoderma viride*

Dematiaceae

✓ *Curvularia lunata* var. *aeria*

Coelomycetes

Orden Melanconiales

Familia

Melanconiaceae

✓ *Pestalotiopsis neglecta*

Fuente: Ainsworth *et al.* (1973); Ulloa y Halin (1978).

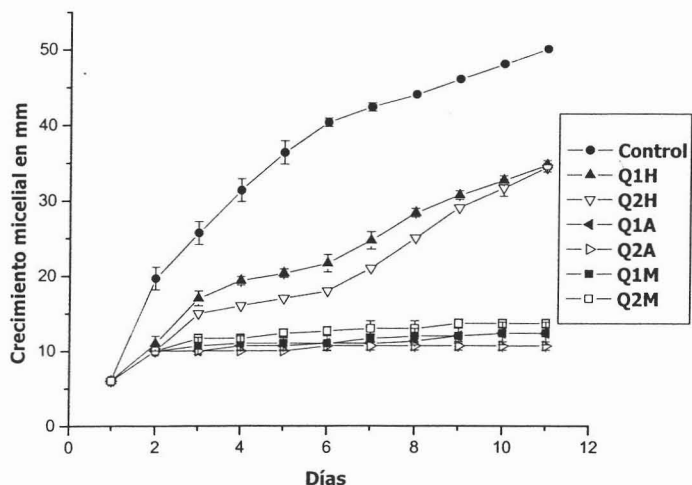
7.3 Actividad biológica.

Los extractos de ambos quimiotipos se probaron *in vitro* a una concentración de 10 mg/ml con las cinco especies de hongos aisladas, pero únicamente dos de ellas, *Curvularia lunata* var. *aeria* y *Rhizoctonia repens*, fueron inhibidas en su crecimiento micelial (Tabla 2).

Tabla 2. Efecto de los extractos de *Calophyllum brasiliense* a 10 mg/ml en el crecimiento micelial de los hongos aislados de las hojas.

Especies de hongos	% de crecimiento					
	Q1H	Q1A	Q1M	Q2H	Q2A	Q2M
<i>Aspergillus japonicus</i> var. <i>japonicus</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Curvularia lunata</i> var. <i>aeria</i>	69.4	24.6	24.6	68.6	21.4	27.4
<i>Pestalotiopsis neglecta</i>	100	100	100	100	100	100
<i>Rhizoctonia repens</i>	64.6	76.6	92	61.2	90	92.6
<i>Trichoderma viride</i>	100	100	100	100	100	100

En el caso de *C. lunata* var. *aeria* la mayor inhibición en su crecimiento fue debida a los extractos acetónicos y metanólicos de ambos quimiotipos, en proporciones similares (Q1A, 75.4 %; Q2A, 78.6 %; Q1M, 75.4 % y Q2M, 72.6 %) y en menor grado por los extractos hexánicos (Q1H, 30.6 % y Q2H, 31.4 %) (Gráfica 1 y Tabla 3).



^a Valores expresados como media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

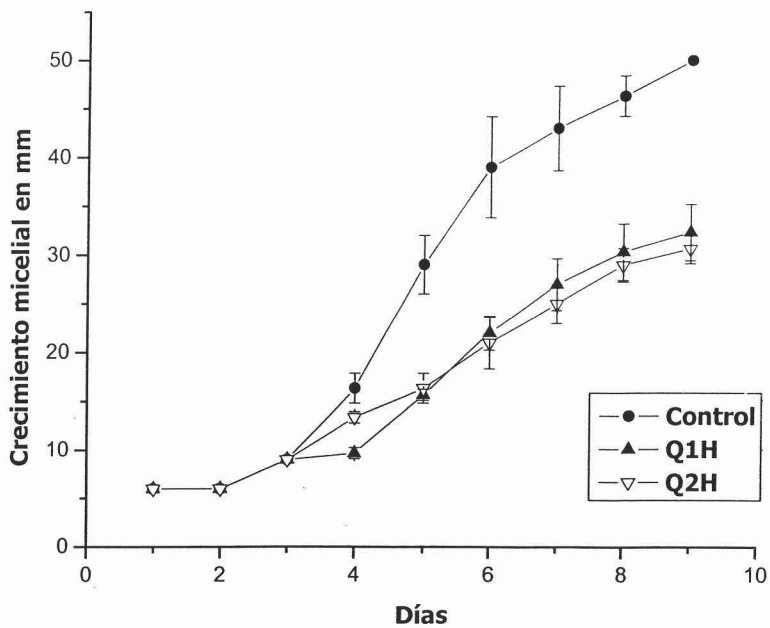
Gráfica 1. Efecto de los extractos hexánicos, acetónicos, y metanólicos a 10 mg/ml de los Quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense* en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* var. *aerea* ^a.

Tabla 3. Efecto de los extractos de *Calophyllum brasiliense* a 10 mg/ml en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* var. *aerea* ^a.

Tratamientos	n	Crecimiento micelial en mm	% de inhibición
Control	3	50 \pm 0	0
Q1H	3	34.7 \pm 0.6	30.6
Q1A	3	12.3 \pm 1.5	75.4
Q1M	3	12.3 \pm 1.5	75.4
Q2H	3	34.3 \pm 0.6	31.4
Q2A	3	10.7 \pm 0.6	78.6
Q2M	3	13.7 \pm 0.6	72.6

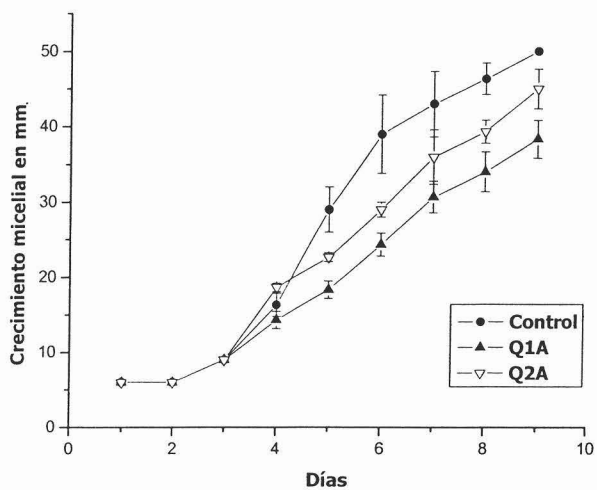
^a Valores expresados como media \pm la desviación estándar.

Una situación diferente se presentó con la especie *Rhizoctonia repens* la cual fue inhibida principalmente en su crecimiento por los extractos hexánicos (Q1H, 35.5 % y Q2H, 38.8 %) de ambos quimiotipos (Gráfica 2 y Tabla 4) y en menor porcentaje por los demás extractos (Q1A, 23.4 %; Q2A, 10 %; Q1M, 8 % y Q2M, 7.4 %) (Gráfica 3 y Tabla 4).

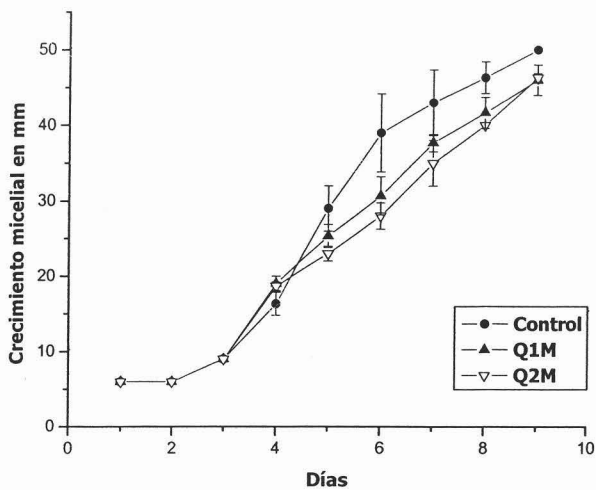


^a Valores expresados como media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

Gráfica 2. Efecto de los extractos hexánicos a 10 mg/ml de los Quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense* en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia repens* ^a.



a)



b)

^a Valores expresados como media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

Gráfica 3. Efecto de los extractos acetónicos (a) y metanólicos (b) a 10 mg/ml de los Quimiotipos 1 y 2 de *Calophyllum brasiliense* en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia repens* ^a.

Tabla 4. Efecto de los extractos de *Calophyllum brasiliense* a 10 mg/ml en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia repens* ^a.

Tratamientos	n	Crecimiento micelial en mm	% de inhibición
Control	3	50 ± 0	0
Q1H	3	32.3 ± 2.9	35.4
Q1A	3	38.3 ± 2.5	23.4
Q1M	3	46 ± 2.0	8
Q2H	3	30.6 ± 1.5	38.8
Q2A	3	45 ± 2.6	10
Q2M	3	46.3 ± 0.6	7.4

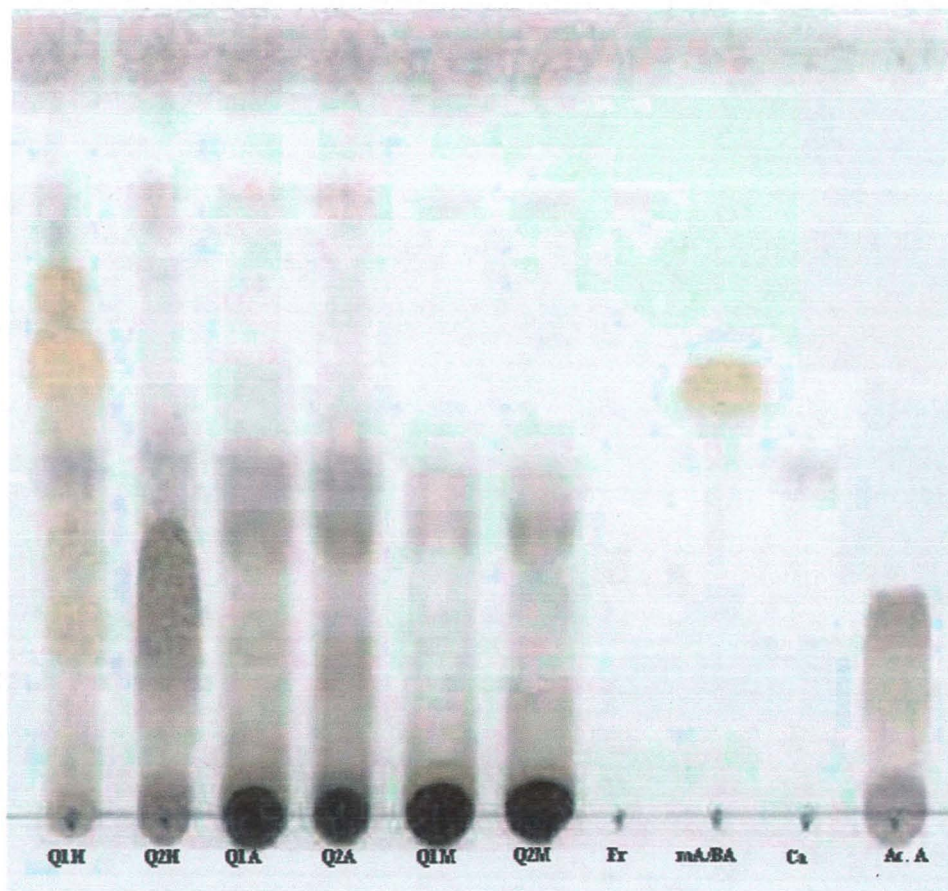
^a Valores expresados como media ± la desviación estándar .

Los resultados indicaron dos posibilidades:

1. La actividad inhibidora fue producida por una(s) sustancia(s) común(es) en ambos quimiotipos, pero con diferente concentración en los extractos.
2. La actividad inhibidora fue producida por sustancias diferentes, encontradas en los extractos de los quimiotipos.

Los hongos afectados, *Curvularia lunata* var. *aeria* y *R. repens*, se probaron con los principales compuestos presentes en los extractos de las hojas de ambos quimiotipos de *C. brasiliense* (Tabla 5) a una concentración de 1 mg/ml. Los compuestos fueron: mamea A/BA (presente en Q1H); ácido apétálico (presente en Q2H); los triterpenos friedelina y canofilol (presentes en Q1H, Q2H, Q1A, Q2A, Q1M y Q2M) (Figura 5); y el biflavonoide amentoflavona (presente en Q1A, Q2A, Q1M y Q2M).

Figura 5. Perfil cromatográfico en CCF de los extractos y compuestos aislados de las hojas de *Calophyllum brasiliense*.



Extractos: Q1H, Hexánico Quimiotipo 1, Q2H, Hexánico Quimiotipo 2; Q1A, Acetónico Quimiotipo 1; Q2A, Acetónico Quimiotipo 2; Q1M, Metanólico Quimiotipo 1; y Q2M, Metanólico Quimiotipo 2.
Compuestos: Fr, Friedelina; mA/BA, mammea A/BA; Ca, Canofilol; y Ac. A, Ácido Apetálico.
Sistema: Fase normal Hexano/Acetato de etilo (8:2). **Revelador:** Sulfato cérico.

Tabla 5. Compuestos mayoritarios de los extractos de *Calophyllum brasiliense*.

Compuestos	Extractos Quimiotipo 1			Extractos Quimiotipo 2		
	Hexánico	Acetónico	Metanólico	Hexánico	Acetónico	Metanólico
Ac. Apetálico				+		
Amentoflavona		+	+		+	+
Canofilol	+	+	+	+	+	+
Friedelina	+	+	+	+	+	+
Mammea A/BA	+					

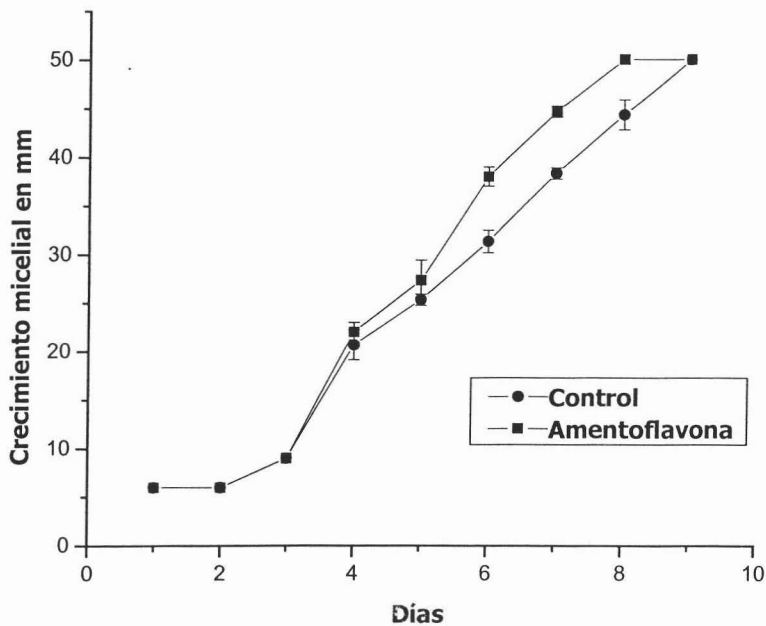
+ indica la presencia del compuesto en el extracto.

Las pruebas biológicas revelaron que los compuestos amentoflavona, canofilol y friedelina no tienen un efecto inhibitor en el crecimiento micelial de estos hongos (Tabla 6). No obstante, la amentoflavona aceleró el crecimiento micelial de *Rhizoctonia repens*, (Gráfica 4), al evaluarlos estadísticamente con un nivel de confianza del 99.5 % (p 0.05) los tratamientos resultaron significativamente diferentes a partir del sexto día.

Tabla 6. Efecto de compuestos de *Calophyllum brasiliense* a 1 mg/ml en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* var. *aeria* y *Rhizoctonia repens*.

Tratamientos	n	<i>C. lunata</i> var. <i>aeria</i>		<i>R. repens</i>	
		Crecimiento micelial en mm	% de inhibición	Crecimiento micelial en mm	% de inhibición
Control	3	50 ± 0	0	50 ± 0	0
Amentoflavona	3	50 ± 0	0	50 ± 0	0
Canofilol	3	50 ± 0	0	50 ± 0	0
Friedelina	3	50 ± 0	0	50 ± 0	0

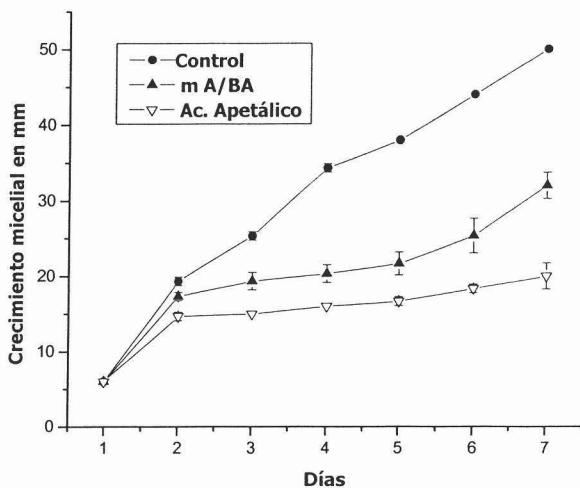
^a Valores expresados como media ± la desviación estándar



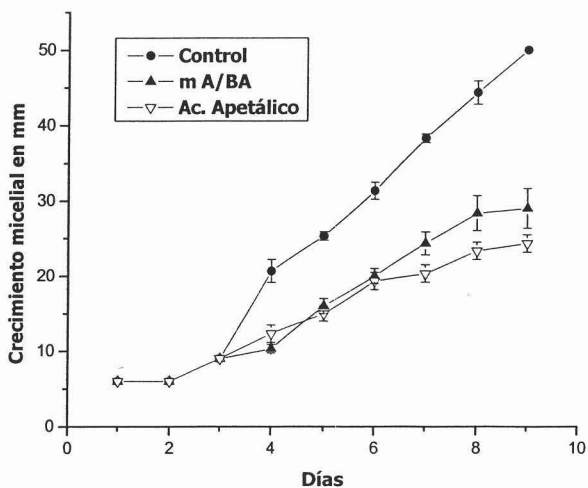
^a Valores expresados como media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

Gráfica 4. Actividad estimulante de la amentoflavona a 1 mg/ml en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia repens* ^a.

La situación fue diferente con los compuestos ácido apotánico y mammea A/BA, puesto que ambos presentaron actividad inhibitoria contra los hongos *Curvularia lunata* var. *aeria* y *R. repens* (Gráfica 5 y Tabla 7). Este hecho permite proponer que quizás estas sustancias son las responsables de la inhibición observada en los experimentos con los extractos hexánicos, de ambos quimiotipos, en contra de estas especies. Se observó que el ácido apotánico fue ligeramente más potente que la mammea A/BA en el caso de *C. lunata* var. *aeria*, pero no se observaron diferencias significativas con la especie *R. repens* hasta el séptimo día.



a)



b)

^a Valores expresados como media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

Gráfica 5. Actividad inhibidora del ácido apetélico y la mammea A/BA a 1 mg/ml en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* var. *aerea* (a) y *Rhizoctonia repens* (b) ^a.

Tabla 7. Efecto de los compuestos de *Calophyllum brasiliense* a 1 mg/ml en el crecimiento micelial de los hongos *Curvularia lunata* var. *aeria* y *Rhizoctonia repens* ^a.

Tratamientos	n	<i>C. lunata</i> var. <i>aeria</i>		<i>R. repens</i>	
		Crecimiento micelial en	% de inhibición	Crecimiento micelial en	% de inhibición
		mm		mm	
Control	3	50 ± 0	0	50 ± 0	0
Mammea A/BA	3	32 ± 1.8*	36	29 ± 2.6*	42
Ácido apetalico	3	20 ± 1.7*	60	24.3 ± 2.6*	51.4

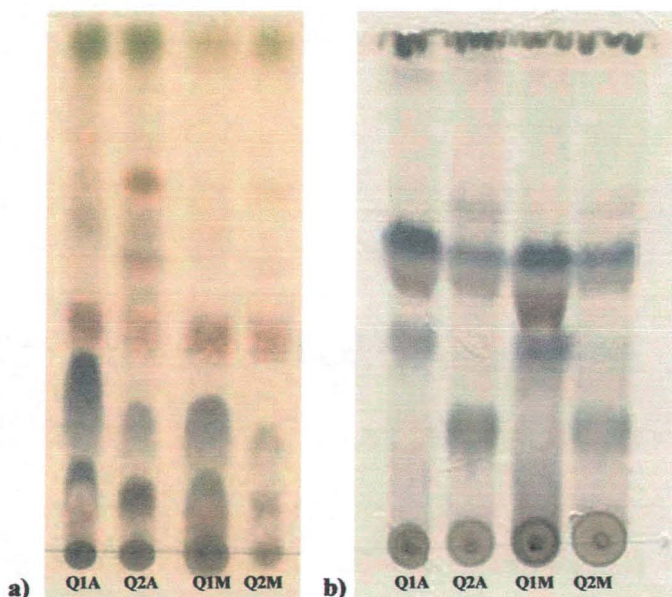
^a Valores expresados como media ± la desviación estándar.

* A un nivel de 0.05 los tratamientos son significativamente diferentes

Por otro lado, con la finalidad de conocer el o los compuesto(s) causante(s) de la actividad inhibidora mostrada por los extractos acetónicos y metanólicos de ambos quimiotipos, en estos hongos, se llevó a cabo el aislamiento biodirigido empleando el hongo más susceptible, *C. lunata* var. *aeria*.

En primera instancia, se compararon por CCF los perfiles de todos estos extractos, mediante cromatofolios de gel de sílice con base de aluminio (ALUGRAM), fase normal (SIL-G/UV 254) y reversa (RP-18W/UV 254). Los mejores sistemas de elusión resultaron ser, para la fase normal, hexano/acetato de etilo (1:1) y para la fase reversa, cloroformo metanol (9:1). Los cromatofolios se observaron con luz ultravioleta de onda larga (350 nm) y corta (254 nm), y se revelaron con sulfato cérico y cloruro férrico. Como producto de este análisis se llegó a la conclusión de que los perfiles cromatográficos de los extractos acetónicos y metanólicos de ambos quimiotipos de *C. brasiliense* son similares (Figura 6).

Figura 6. Perfiles cromatográficos en CCF de los extractos acetónicos y metanólicos de las hojas de *Calophyllum brasiliense*. Fase normal (a) y reversa (b).

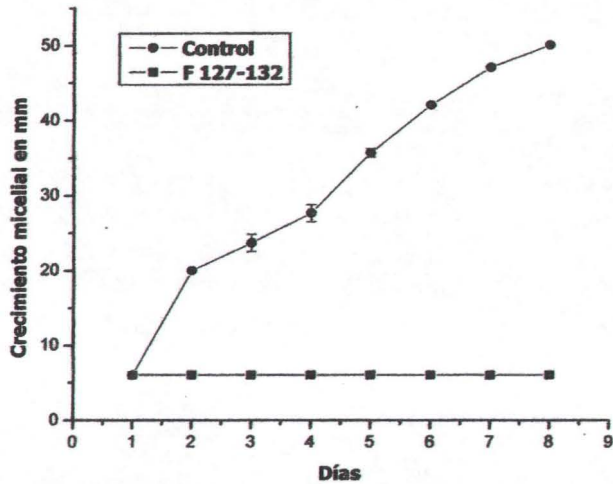


Extractos: Q1A, Acetónico Quimiotipo 1; Q2A, Acetónico Quimiotipo 2; Q1M, Metanólico Quimiotipo 1; y Q2M, Metanólico Quimiotipo 2.

Sistema: Fase normal hexano/acetato de etilo (1:1) y Fase reversa cloroformo/metanol (9:1).

Revelador: Cloruro férrico.

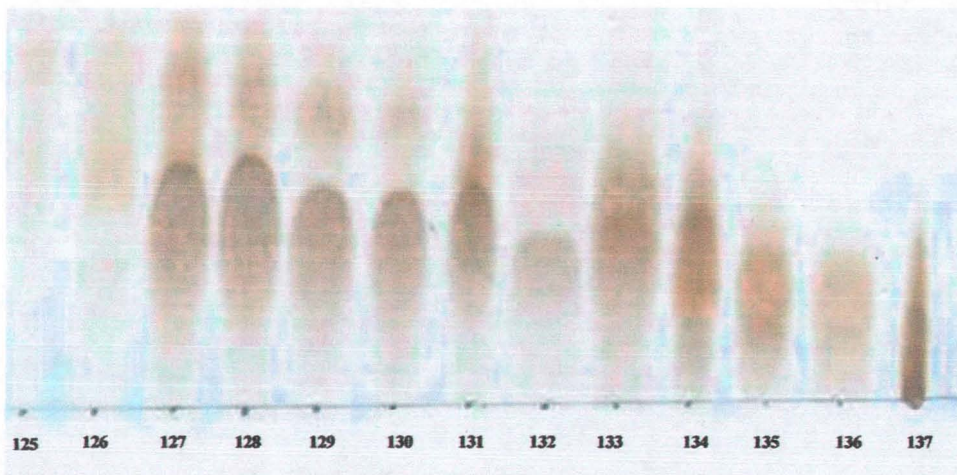
Este hecho, dio la pauta a pensar, que el efecto inhibitor quizá fue causado por un(os) compuesto(s) común(es) en todos los extractos. Por ello, se tomaron y pulverizaron 30 gramos de un extracto acetónico Quimiotipo 2 (preparado a partir de un kilogramo de hojas disponibles en ese momento), con la finalidad de ser sometido a un fraccionamiento en CC fase normal en 300 g de gel de sílice (MERCK), se eluyó con hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones de polaridad creciente. Las 149 fracciones resultantes de 200 ml se examinaron en CCF, y se reunieron con base en la similitud de sus perfiles cromatográficos. La actividad antifúngica de cada una de estas fracciones reunidas se examinó siguiendo la metodología de los experimentos antes mencionados, a una concentración de 10 mg/ml. Las fracciones 127-132 inhibieron el crecimiento del hongo a un 100% (Gráfica 6, Figura 7 y Tabla 8).



^a Valores expresados como media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

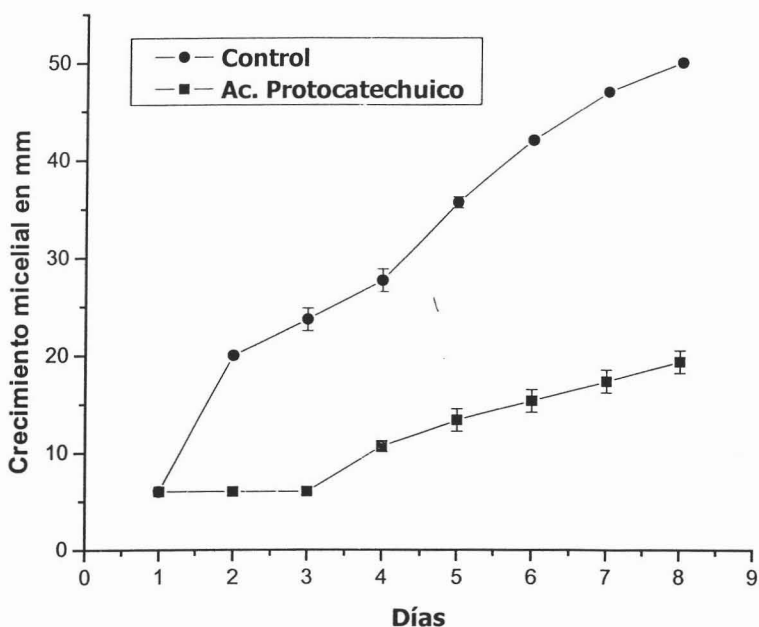
Gráfica 6. Actividad inhibidora de las fracciones 127-132 a 10 mg/ml en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* var. *aeria* ^a.

Figura 7. Perfil cromatográfico de las fracciones 127-132.



Sistema: Fase normal hexano/acetato de etilo (1:1). Revelador: Sulfato cérico.

Al resuspender estas fracciones en diclorometano se formó un sólido blanquecino (480 mg). En CCF este compuesto reveló un Rf igual al ácido protocatechuico de una muestra auténtica (SIGMA). Su p. f. y datos espectroscópicos de RMN¹H, fueron idénticos a los reportados para este compuesto, el cual al ser probado a 1 mg/ml, ratificó ser el agente causal de la actividad inhibitora en el hongo *Curvularia lunata* var. *aeria* (Gráfica 7 y Tabla 8).



^a Valores expresados como media de tres réplicas \pm la desviación estándar.

Gráfica 7. Actividad inhibitora del ácido protocatechuico a 1 mg/ml en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* var. *aeria* ^a.

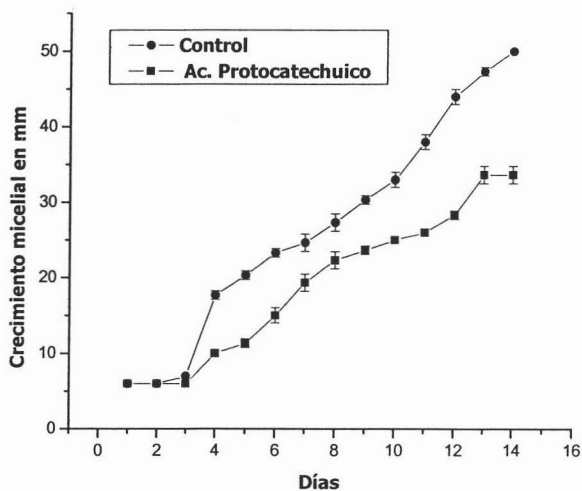
Tabla 8. Efecto de la fracción activa y del ácido protocatechuico de *Calophyllum brasiliense* en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata* var. *aeria* ^a.

Tratamientos	n	Crecimiento micelial en mm	% de inhibición
Control	3	50 ± 0	0
F(127-132)	3	6 ± 0*	100
Ac. protocatechuico	3	19.3 ± 1.2*	61.4

^a Valores expresados como media ± la desviación estándar.

* A un nivel de 0.05 los tratamientos son significativamente diferentes.

Adicionalmente, el ácido protocatechuico fue probado a la misma concentración (1 mg/ml) contra *Rhizoctonia repens*, ya que este hongo también fue afectado por los extractos acetónicos y metanólicos de ambos quimiotipos de *C. brasiliense*. Los resultados indicaron que este compuesto también inhibe el crecimiento micelial del hongo *R. repens* (Gráfica 8 y Tabla 9). Sin embargo su efecto inhibitorio fue mucho menor al observado en *C. lunata* var. *aeria*.



^a Valores expresados como media de tres réplicas ± la desviación estándar.

Gráfica 8. Actividad inhibitoria del ácido protocatechuico a 1 mg/ml en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia repens* ^a.

Tabla 9. Efecto del ácido protocatechuico de *Calophyllum brasiliense* en el crecimiento micelial de *Rhizoctonia repens* ^a.

Tratamientos	n	Crecimiento micelial en mm	% de inhibición
Control	3	50 ± 0	0
Ac. protocatechuico	3	33.7 ± 1.2*	32.6

^a Valores expresados como media ± la desviación estándar .

* A un nivel de 0.05 el tratamiento es significativamente diferente.

Este efecto sugiere que el ácido protocatechuico probablemente es el responsable de la inhibición observada en *R. repens* en los experimentos a nivel de extracto.

8. DISCUSIÓN

Los resultados indican que en las hojas de cada uno de los dos quimiotipos de *Calophyllum brasiliense* con distribución en México, se encuentran compuestos mayoritarios tales como mammea A/BA; (33% del extracto hexánico del Quimiotipo 1; Reyes *et al.*, 2004), y ácido apetélico (51% del extracto hexánico del Quimiotipo2), capaces de inhibir el crecimiento micelial de los hongos *Curvularia lunata* var. *aeria* y *Rhizoctonia repens*.

La familia Clusiaceae cuenta con varias especies ricas en metabolitos secundarios que presentan actividad biocida. Por ejemplo, las cumarinas mammea E/BA y E/BB, aisladas de *Mammea americana*, presentan actividad insecticida (Crombie, 1999); otros compuestos relacionados como son la mammea A/BA + A/BB y C/OA + C/OB, aisladas de *C. brasiliense* Quimiotipo 1, reducen el crecimiento de bacterias enteropatógenas (Reyes *et al.*, 2004). También se han estudiado otra clase de compuestos conocidos como cromanonas, aislados de semillas, hojas, duramen y corteza de diferentes especies del género *Calophyllum*. De la corteza de un ejemplar de *C. brasiliense* recolectado al sur de Veracruz, se han aislado recientemente seis nuevas cromanonas, los ácidos: brasiliensofilico A, isobrasiliensofilico A, brasiliensofilico B, isobrasiliensofilico B, brasiliensofilico C e isobrasiliensofilico C. Todos estos compuestos presentaron actividad antibacteriana en las especies *Bacillus cereus* y *Staphylococcus epidermidis* (Cottiglia *et al.*, 2004). Otros compuestos, como el ácido calolóngico e isocalolóngico, obtenidos de la corteza del tallo de *C. caledonicum*, son inhibidores potentes del hongo *Aspergillus fumigatus* (Hay *et al.*, 2003). Cabe resaltar, que estos compuestos funguicidas son isómeros estructurales del ácido apetélico e isoapetélico.

En lo que respecta al ácido protocatechuico, es bien conocida su actividad fungistática inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación endógena de esporas de algunas especies de hongos (Walker, *et al.*, 1955). De hecho es común encontrar a este compuesto citado en la literatura como ejemplo típico de inhibidor preformado secretado por las plantas al medio ambiente (Swain, *et al.*, 1979). Esta sustancia biológicamente activa la podemos encontrar en diferentes especies de plantas, por lo que ha sido un compuesto ampliamente estudiado. En los hongos, este compuesto fenólico puede inactivar enzimas

respiratorias, así como también, enzimas extracelulares al tener la capacidad de interactuar con los grupos SH (sulfidrido), los cuales, normalmente funcionan como sitios activos (Lyr, 1965). Cabe hacer notar, que este mecanismo de acción es bastante eficiente, si recordamos que los hongos requieren predigerir extracelularmente con sus enzimas el alimento, para posteriormente absorberlo. El ácido protocatechuico, ya antes había sido reportado como constituyente de las hojas de la especie *Calophyllum brasiliense*, en ejemplares recolectados en Brasil (da Silva *et al.*, 2001) y México (Reyes *et al.*, 2004). Dicha sustancia posee actividad analgésica (da Silva *et al.*, 2001) y antimicrobiana, lo que justifica su uso popular (Pretto *et al.*, 2004).

En contraste con el efecto inhibitorio mostrado por los compuestos ya mencionados, la amentoflavona estimuló el crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia repens*. Este efecto no es raro, puesto que existe evidencia de metabolitos secretados por los tejidos de las plantas capaces de estimular el crecimiento de los hongos (factores de crecimiento), algunos fuertemente específicos (Neville *et al.*, 1995). Entre los compuestos se encuentran aminoácidos, azúcares, minerales, y otros no nutritivos tales como compuestos fenólicos y flavonoides. Más aún, se sabe que para algunas especies del género *Rhizoctonia* es necesario que la planta hospedera cuente con alguna sustancia esencial de reconocimiento (factor de crecimiento) para la formación de un colchón de hifas necesario para invadir sus tejidos (Agrios, 1999). No obstante, otros componentes mayoritarios de las hojas de *C. brasiliense* como son los triterpenos friedelina y canofilol, no presentan ningún tipo de actividad en el crecimiento micelial.

Por otro lado, si comparamos “los estilos de vida” de los hongos aislados con los resultados obtenidos, podemos notar que la mammea A/BA y el ácido apetalico solo tuvieron actividad con hongos que tienen antecedentes como parásitos facultativos. *Curvularia lunata* var. *aeria* ha sido reportada como parásito, sobre todo en plantas cultivadas de la familia Poaceae de importancia económica: *Cynodon*, *Oryza*, *Pennisetum*, *Sorghum*, *Triticum*, y *Zea* (Portal de Patología de Semillas, 2004). Adicionalmente, esta especie produce micosis en pacientes susceptibles, desde el pie de atleta común hasta queratitis, por lo que también es considerada de importancia médica (Luque *et al.*, 1986). En el caso de *R. repens*, este se encuentra normalmente como micorriza asociada a orquídeas (Warcup,

1981), exhibiendo una considerable especificidad por las orquídeas del género *Diuris* y *Orthoceras*. Sin embargo, en relación a estas especies, existe una línea delgada entre el mutualismo y el parasitismo, ya que el hongo puede causar la muerte de semillas o plántulas (Warcup, 1985). La plasticidad del hongo es tal, que se le puede encontrar como patógeno de otras especies de plantas (Ozkoc *et al.*, 2002) o como saprobio formando parte de la flora del suelo; ya sea como propágulo (esclerocios) o creciendo entre la materia orgánica.

9. CONCLUSIONES

- En las hojas de los Quimiotipos 1 y 2 de la especie *Calophyllum brasiliense* con distribución en México, existen metabolitos secundarios capaces de inhibir y/o estimular el crecimiento de algunos hongos presentes en las hojas.
- Los metabolitos mammea A/BA y ácido apetélico, componentes mayoritarios de los extractos hexánicos de los Quimiotipos 1 y 2 respectivamente, inhiben *in vitro* el crecimiento de las especies: *Curvularia lunata* var. *aeria* y *Rhizoctonia repens*.
- Otro metabolito, el ácido protocatechuico, componente de los extractos acetónicos y metanólicos de ambos quimiotipos, también inhibe *in vitro* el crecimiento de las mismas especies.
- El metabolito amentoflavona, componente de los extractos acetónicos y metanólicos de ambos quimiotipos, *in vitro*, aceleró el crecimiento de la especie *R. repens*.
- Otros metabolitos secundarios mayoritarios de las hojas de los Quimiotipos 1 y 2 de la especie *C. brasiliense*, como son los triterpenos friedelina y canofilol, no presentaron actividad inhibidora en el crecimiento de las especies de hongos estudiadas: *Aspergillus japonicus* var. *japonicus*, *C. lunata* var. *aeria*, *Pestalotiopsis neglecta*, *R. repens*, *Trichoderma viride*.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Aerts, R. 1997. Clime, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystem: a triangular relationship **Oikos** **79**: 439-449.
2. Agrawal, P. K., Lal, B., Shukla, P. K., Khan, Z. A. y Srivastava, O. P. 1982. Clinical and experimental keratitis due to *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn var. *aeria* (Batista, Lima and Vasconcelos) Ellis. **Sabouraudia** **20** (3): 225-232.
3. Agrios, G. N. 1988. **Plant Pathology**. Academic Press. San Diego, Cal., USA.
4. Ahmad, V. U. y Arman A. U. 1994. **Pentacyclic Triterpenoids. Handbook of Natural Products Data. Vol. 2**. Elsevier. The Netherlands.
5. Ainsworth, G. C., Sparrow, F. K. y Sussman, A. S. 1973. **The Fungi. An Advanced Treatise. Vols. IV A-B**. Academic Press. New York and London.
6. Alvarez-Sanchez, J. y Becerra-Enríquez, R. 1996. Leaf decomposition in a Mexican Tropical Rain forest. **Biotropica** **28** (4b): 657-667.
7. Allen, E.A., Hoch, H.C., Steadmany, R. J. y Stavely, R. J. 1991. Influence of leaf surface feature on spore deposition on the epiphytic growth of Phytopathogenic fungi. *In*: J. H. Andrews y Hirano, S. S. (eds), **The microbial ecology of leaves**. Springer-Verlag. New York. Pp 87-110.
8. Andersen, T. F. 1990. A study of hifal morphology in the form genus *Rhizoctonia*. **Mycotaxon** **37**: 25-46.
9. Batista, A.C. y Peres, G.E.P. 1965. *Camarosporium* Schulz, *Coniothyrium* Corda e *Septoria* Sacc. spp. estudados no IMUR. **Mycopathologia et Mycologia Applicata** **25** (1-2): 144-160.
10. Biesen, P.S. 1983. Changes in the carbohydrate and nitrogen content of bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves infected with *Curvularia lunata* var. *aeria*. **Acta Botanica Indica** **11** (2):146-149.
11. Bills, G. F. 1996. Isolation and analysis of endophytic fungal communities from woody plants. *In*: S. C. Redlin y L. M. Carris (eds), **Endophytic Fungi Grasses Woody Plants. Systematics, Ecology and evolution**. APS press. St. Paul. Minn., USA. Pp. 31-65.
12. Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sec. nov. **Canadian Journal of Botany** **62**: 924-931.

13. Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. **Canadian Journal of Botany** 69: 2357-2372.
14. Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. **Canadian Journal of Botany** 69: 2373-2417.
15. Bissett, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. **Canadian Journal of Botany** 69: 2418-2420.
16. Bugos, R. C., Sutherland, J. B. y Adler, J. H. 1988. Phenolic Compound Utilization by the Soft Rot Fungus *Lecythophora hoffmannii*. **Applied and Environmental Microbiology** 54 (7): 1882-1885.
17. Cottiglia, F., Dhanapal, B., Sticher, O. y Heilmann, J. 2004. New Chromanone Acids with Antibacterial Activity from *Calophyllum brasiliense*. **Journal of Natural Products** 67: 537-541.
18. Crandall, B. S. 1949. An endemic vascular wilt disease of Basillo, *Calophyllum brasiliense* var. *rekoii*, in El Salvador. **Plant Disease Reporter** 33: 463-465.
19. Crawley, M. J. 1997. Plant Secondary Metabolism. In: **Plant Ecology**. Blackwell science. Oxford. Pp 132-155.
20. Crombie, L., Games, D. E. y McCormick A. 1967. Extractives of *Mammea americana* L. Part II. The 4-Phenilcoumarins. Isolation and structure of Mammeins A/AA, A/cyclo-D, A/BA and A/BB. **Journal of Chemical Society C**: 2553-2558.
21. Crombie, L. 1999. Natural product chemistry and its part in the defense against insects and fungi in agriculture. **Pesticide Science** 55: 761-774.
22. da Silva, K. L., dos Santos A. R., Mattos, P. E., Yunes, R. A., Delle-Monache, F. y Cechinel-Filho, V. 2001. Chemical composition and analgesic activity of *Calophyllum brasiliense* leaves. **Therapie** 56 (4):431-434.
23. Deacon, J.W. 1997. **Introducción a la Micología Moderna**. Ed. Limusa México.
24. Domsch, K. H., Gams, W. y Anderson, T.H. 1993 **Compendium of soil fungi. Vol. 1**. IHW - Verlag. Germany.
25. Duke, J.A. 1994. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. CRC Press. England.
26. Ellis, M. B. 1966. Dematiaceous hyphomycetes. VII. *Curvularia*, *Brachysporium*, etc. **Micological paper** 106 : 1-57.
27. Ellis, M. B. 1971. **Dematiaceous Hyphomycetes**. CAB International Mycological Institute. England.

28. Ellis, M. B. 1976. **More Dematiaceous Hyphomycetes**. CAB International Mycological Institute. England.
29. Ellis, M. B. y Ellis, J.P. 1997. **Microfungi on Land Plants**. An Identification Handbook. New Enlarged Edition. The Richmond Publishing. Co. LTD. England.
30. Frankland, J.C. 1981. Mechanisms in fungal successions. *In*: D. T. Wicklow y Carroll, G. C. (eds), **The Fungal Community**. Marcel Dekker. New York. Pp 403-426.
31. Friend, J. 1979. Phenolic Substances and Plant Disease. *In*: T. Swain, J. B. Harborne and C. F. Van Sumere (eds.) **Biochemistry of Plant Phenolic**. vol. 12. Plenum Press. New York y London. Pp 557-588.
32. García-Guzmán, G. y Dirzo, R. 2004. Incidence of leaf pathogens in the canopy of a Mexican tropical wet forest. **Plant Ecology** **172**: 41-50.
33. Golley, F. B. 1983. Decomposition. *In*: F. B. Golley (ed.) **Tropical Rain Forest Ecosystems structure and function**. Elsevier Scientific Publishing. Amsterdam. Pp 157-166.
34. Govindachari, T. R., Prakash, D. y Viswanathan, N. 1968. Structure of apetalic acid. **Tetrahedron** **24**: 6411-6415.
35. Guilet, D., Séraphin, D., Rondeau, D., Richomme, P. y Bruneton, J. 2001. Cytotoxic coumarins from *Calophyllum dispar*. **Phytochemistry** **58**: 571-575.
36. Harley, J. L. 1971. Fungi in ecosystems. **Journal of Ecology** **59**: 653-668.
37. Hawksworth, D.L. B.E. Kirsop. 1988. **Filamentous Fungi**. Cambridge University Press. England.
38. Hawksworth, D.L. 1991. Presidential Address 1990. The Fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance and conservation. **Mycological Research** **95**: 641-55.
39. Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C. y Pegler, D. N. 2001. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi**. CAB International. England.
40. Hawksworth, D. L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Micological Research** **105** (12): 1422-1432.
41. Hay, A. E., Guilet, D., Morel, C., Larcher, G., Macherel, D., Le Ray, A. M., Litaudon, M. y Richomme, P. 2003. Antifungal Chromans Inhibiting the

- Mitochondrial Respiratory Chain of Pea Seeds and New Xanthones from *Calophyllum caledonicum*. **Planta Medica** **69**: 1130-1135.
42. Heredia Abarca, G. 2003. Los hongos microscópicos en la descomposición de hojas. *In*: Alvarez-Sanchez, J. y Naranjo-García, E. (eds.) **Ecología del Suelo en la Selva Tropical Húmeda de México**. Instituto de Ecología, A.C., Instituto de Biología y Facultad de Ciencias, UNAM. Xalapa, México. Pp 263-273.
 43. Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. **El reino de los hongos**. Fondo de Cultura Económica. México.
 44. Hirst, J. M. 1965. Dispersal of soil microorganisms, *In*: K. F. Baker and W.C. Snyder (eds.) **Ecology of Soil – Borne Plant Pathogens**. J. Murray. London. Pp 69-81.
 45. Hudson, H. J. 1968. The ecology of fungi on plant remains above the soil. **New Phytologist** **67**: 837-874.
 46. Huerta-Reyes, M., Basualdo, M., Fumiko, A., Jimenez-Estrada, M., Soler, C., y Reyes-Chilpa, R. 2004. HIV-1 Inhibitory Compounds from *Calophyllum brasiliense* Leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** **27** (9): 1471-1475.
 47. Isaac, S. 1992. **Fungal-Plant Interactions**. Chapman and Hall. London.
 48. Jager, E.S., Wehner, F.C. y Korsten L. 2001. Microbial Ecology of the Mango Phylloplane. **Microbial Ecology** **42** (2): 201-207.
 49. Jones, R. Parkinson, S. M. Wainwright, M. and Kilham, K. 1991. Oxidations, of thiosulphate by *Fusarium oxysporum*, grow under oligotrophic conditions. **Mycological Research** **95**: 1169-74.
 50. Kendrick, B. 2000. **The fifth Kingdom**. Focus publishing. USA.
 51. Klich, M. A. y Pitt, J. I. 2002. **A laboratory guide to the common Aspergillus species and their telomorphs**. CSIRO Division of Food Science. North Ryde, Australia.
 52. Kudela, M., Hochmut, R. y Leontovyc, R. 1976. Forest protection in Cuba. **Silvaecultura- Tropica-et-subtropica** **4**: 97-112.
 53. Langvad, F. 1980. A simple and rapid method for qualitative and quantitative study of fungal flora of leaves. **Canadian Journal Microbiology** **26**: 666-670.

54. Larran, S., Perello, A., Simon, M. R. y Moreno, V. 2002. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** **18** (7): 683-686.
55. Lee, O. H. K. y Hyde, K. D. 2002. Phylloplane fungi in Hong Kong mangroves: evaluation of study methods. **Mycologia** **94** (4): 596-606.
56. Lewis, D.H. 1973. Concepts of fungal nutrition and the origin of biotrophy. **Biological Reviews** **48**: 261-278.
57. Lewis, D.H. 1974. Micro-organisms and plants the evolution of parasitism and mutualism. *In*: **Symposium of the Society for General Microbiology** **24**: 367-392.
58. Lewis, D.H. 1985. Symbiosis and Mutualism: crisp concepts and soggy semantics. *In*: D. H. Boucher (ed.). **The biology of mutualism**. Croom Helm, London. Pp 29-39.
59. Lewis, W.H. 1977. Plants affecting man is health, *In*: **Medical Botany**. Wiley InterScience Publication. U.S.A.
60. Lorian, V. 1991. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Williams & Wilkins. Baltimore, USA.
61. Luque, A. G., Nanni, R. y de Bracalenti, B. J. 1986. Mycotic keratitis caused by *Curvularia lunata* var. *aeria*. **Mycopathologia** **93** (1): 9-12.
62. Mansfiel, J. W. 1983. Antimicrobial Compounds, *In*: J. A. Callow (ed.) **Biochemical Plant Patology**. J. Wiley and Sons. New York.
63. Melin, E. 1946. Der Einfluss von Waldstreueextrakte auf das wachstum von Boden pilzen mit besonderer Berücksichtigung der Wurzelpilze von Bäumen. **Symbolae Botanicae Upsalienses** **8**: 1-16.
64. Mendes, M. A. S., da Silva, V. L. y Dianese, J.C. 1998. **Fungos em Plants no Brasil**. Embrapa-SPI/Embrapa-Cenargen. Brasilia.
65. Mercado-Sierra, A., Holubová – Jechová, U., y Mena Portales, J. 1997. **Hifomicetes demaciáceos de Cuba Enteroblásticos**. Museo Regionale di Scienze Naturali. Torino.
66. Miranda, F. 1952. **La Vegetación de Chiapas**. Ediciones del gobierno del estado. Tuxtla Gutiérrez, CHIS. México.
67. Moore- Landecker, F. 1972. **Fundamental of the Fungi**. Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J.

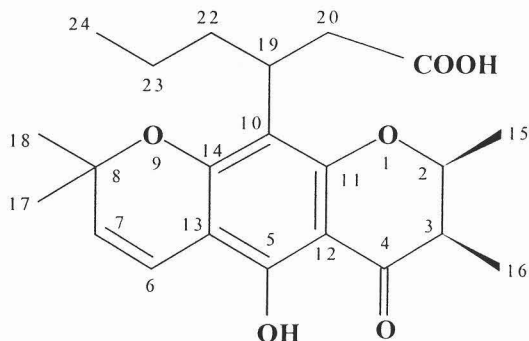
68. Moore, R.T. 1988. The genera *Rhizoctonia*-like fungi: *Ascorhizoctonia*, *Ceratorhiza* gen. nov., *Epulorhiza* gen. nov., *Moniliopsis*, and *Rhizoctonia*. **Mycotaxon** **29**:91-99.
69. Morel, C., Guilet, D., Oger, J. L., Séraphin, D., Sévenet, T., Wiart, C., Hadi, A. H., Richomme, P. and Bruneton, J. 1999. 6-Acylcoumarins from *Mesua racemosa*. **Phytochemistry** **50**: 1243-1247.
70. Narayanasamy, P. 2001. **Plant Pathogen Detection and Disease Diagnosis**. Marcel Dekker, Inc. New York.
71. Neville, J.D. and Webster J. 1995. **Fungal Ecology**. Chapman and Hall. London.
72. Niembro, R. A. 1990. **Arboles y Arbustos Útiles de México**. Ed. Limusa. México.
73. Otero, J.T., Ackerman, J. D. Y Bayman P. 2002. Diversity and host specificity of endophytic *Rhizoctonia*-like fungi from tropical orchids. **American Journal of botany** **89** (11): 1852-1858.
74. Ozcoc, I., Hatat Karaca, G. y Erper, I. 2002. Pathogenicity of *Rhizoctonia repens* Bernard on different Plants and its effect on the suppression of Root-Rot on Cucumber Plants. **Acta Horticulture** **579**: 463-467.
75. Paul, P. K. y Sharma, P. D. 2002. *Azadirachta indica* leaf extract induces resistanse in barley against leaf stripe disease. **Physiological and Molecular Plant Pathology** **61** (1): 3-13.
76. Plattner, R. D., Spencer, G. F., Weisleder, D. y Kleiman, R. 1974. Chromanone acids in *Calophyllum brasiliense* seed oil. **Phytochemistry** **13**: 2597-2602.
77. Pennington, T. D. y Sarukhan, J. 1968 **Manual para la Identificación de Campo de los Principales Árboles Tropicales de México**. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales. México.
78. Pirozynski, K. A. and Dalpe, Y. 1989. Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. **Symbiosis**. **7**: 1-36.
79. Pirozynski, K. A. and Hawksworth, D.L. 1988. **Coevolution of Fungi with Plants and Animals**. Academic Press. London.
80. Pirozynski, K. A. and Malloch, D. W. 1975. The origin of land plants: a matter of mycotrophism. **Biosystems** **6**: 153-64.
81. Portal de Patología de Sementes, 2004. www.patologiadesementes.com.br/

82. Pretto, J. B., Cechinel-Filho, V., Noldin, V. F., Sartori, M. R. K., Isaias, D. E. B. y Bella Cruz, A. 2004. Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae/Guttiferae). **Zeitschrift für Naturforschung** **59c**: 657-662.
83. Ramírez-Chávez, E. Lucas-Valdez, L. Virgen-Calleros, G. y Molina-Torres, J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. **Agrociencia** **34**: 207-215.
84. Raper, J. R. 1966. Life cycles, basic patterns of sexuality, and sexual mechanisms, In G.C. Ainsworth and A.S. Sussman (ed.), **The Fungi An Advanced Treatise**, vol. II. Academic Press. New York and London.
85. Reyes-Chilpa, R., Jiménez-Estrada M., Estrada-Muñiz E. 1997. Antifungal xanthenes from *Calophyllum brasiliense* heartwood. **Journal of Chemical Ecology** **23**: 1901-1911.
86. Reyes-Chilpa, R., Estrada-Muñiz E., Ramírez-Apan, T., Amekraz, B., Amuelas, A., Jankowsky, C. y Vázquez-Torres, M. 2004. Cytotoxic effects of Mamea type coumarins from *Calophyllum brasiliense*. **Life Science** **75**: 1635-1647.
87. Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. **Mycological Papers** **116**: 1-56.
88. Rutter, R. A. 1990. **Catálogo de las plantas Útiles de la Amazonia Peruana**. Lingüístico de Verano. Yarinacocha, Iquitos, Peru.
89. Samuels, G. L. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. **Micological Research** **100**: 923-935.x
90. Sartori, N. T., Canepelle, D., de SP, Jr., Martins, D.T. 1999. Gastroprotective effect from *Calophyllum brasiliense* Camb. bark on experimental gastric lesions in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology** **67**: 149-156.
91. Shen, Y., Wang, L., Khalil, A. T. y Kuo, Y. 2004. Chromanones and Dihydrocoumarins from *Calophyllum blancoi*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** **52** (4): 402-405.
92. Smith, I. M., et al. 1992. **Manual de enfermedades de las Plantas**. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
93. Sneh, B., Burpee, L. y Ogosh, A. 1991. **Identification of Rhizoctonia species**. Academic Press. St. Paul. Minn., USA.

94. Stout, G. H., Hickernell, G. K. y Sears, D. 1968. *Calophyllum* Products. IV. Papuanic and Isopapuanic Acids. **Tetrahedron Letters** 33 (11): 4191-4200.
95. Subramanian, C.V. y Vittal, B.R. 1979. Studies on litter fungi II. Fungal colonization of *Atlantia monophylla* Corr. leaves and litter. **Nova Hedwigia** 63: 361-369.
96. Sutton, B.C. 1969. Forest microfungi. III. The heterogeneity of *Pestalotia* de Not. section *sexloculatae* Klebahn *sensu* Guba. **Canadian Journal of Botany** 47 (12): 2083-2094.
97. Sutton, B. C. 1980. **The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata**. CAB International Mycological Institute. England.
98. Ulloa, M. y Halin, R. 1978. **Atlas de Micología Básica**. Ed. Concepto. México.
99. Vasquez, M. R. 1990. **Useful plants of Amazonian Peru**. National Agricultural Library. U.S.A.
100. Wainwright, M. 1988. Metabolic diversity of fungi in relation to growth and mineral cycling in soil – a review. **Transactions of the British Mycological Society** 90: 159-70.
101. Walker, J. C. y Stahmann, M. A. 1955. Chemical nature of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology** 6: 351-366.
102. Webber, J. F., Jacobs, K. y Wingfield, J. 1999. A re-examination of the vascular wilt pathogen of takamaka (*Calophyllum inophyllum*). **Mycological Research** 103 (12): 1588-1592.
103. Wiehe, P.O. 1941. **Plant Pathology**. Report of the Department Agriculture. Mauritius.

I. APÉNDICE COMPUESTOS

Ácido apetálico.



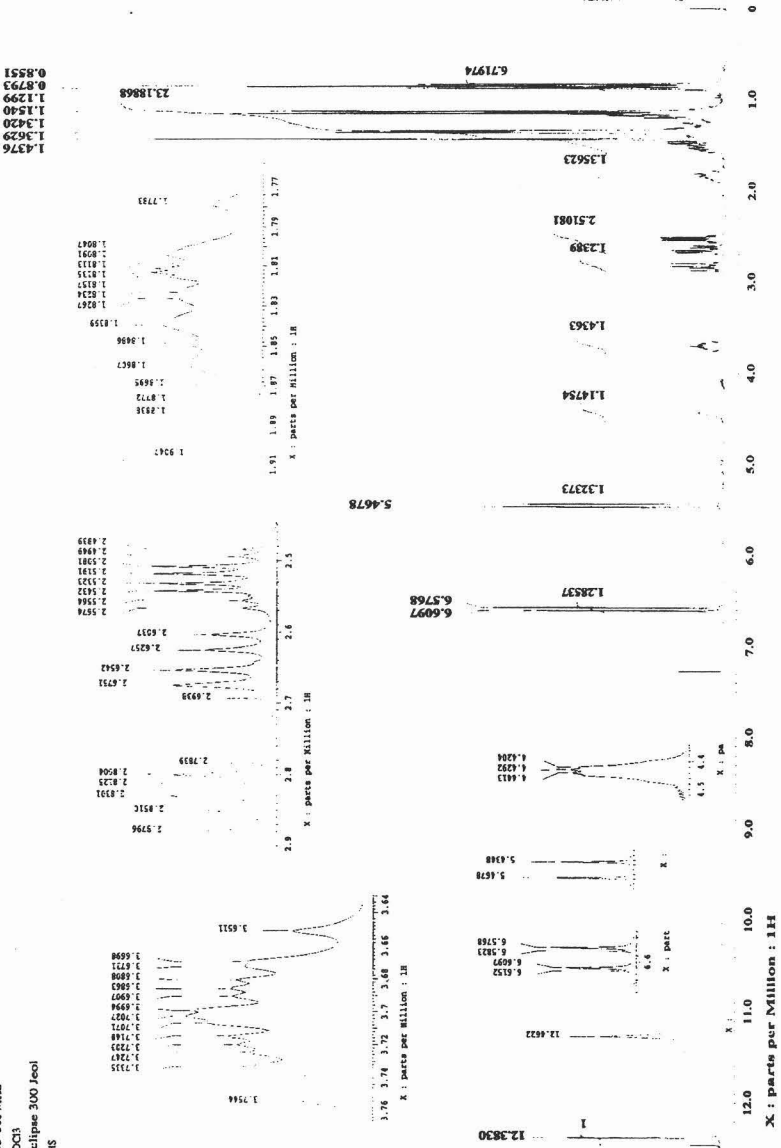
C₂₂, H₂₈, O₆, aceite amarillo.

$[\alpha]_D^{25} = -74.85^0$ ($c=1.75$, CHCl₃); UV (MeOH) λ max nm (log ϵ): 2.74 (4.33) y 298 (3.95); IR (CHCl₃) ν_{max} : 3.516 (OH); 2979; 2932 y 2872 (CH), 1742 (COOH), 1706 (C=O), 1625 (C=C), 1450 (CH₂), 1385 (CH₃) y 1293 (C-O) cm⁻¹.

Datos de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃)

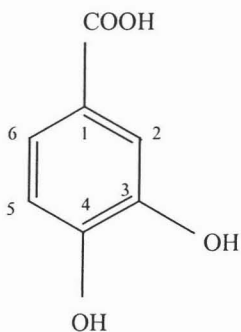
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
CH ₃ -24	0.85	t	7.2	3
CH ₃ -16	1.14	d	7.5	3
H-23	1.17	m	-	2
CH ₃ -15	1.34	d	6.6	3
CH ₃ -18	1.36	s	-	3
CH ₃ -17	1.43	s	-	3
H-22	1.52	m	-	1
H-22	1.83	m	-	1
H-3	2.52	cd	(7 y 3)	1
H20	2.64	dd	(14.8 y 6.6)	1
H20'	2.84	dd	(14.8 y 8.5)	1
H19	3.70	m	-	1
H-2	4.43	cd	(6.2 y 3.6)	1
H-7	5.45	d	9.9	1
H-6	6.59	d	9.9	1
OH-5	12.38	s	-	1

Dr. R. Reyes Ch.
 Eduardo Aguilera
 P43 300 MHz
 CDC3
 Eclipse 300 Jeol
 RMH



Espectro 1. Espectro de RMN¹H del Ácido Acético.

Ácido protocatechuico (3,4 Ácido dihidroxibenzoico).

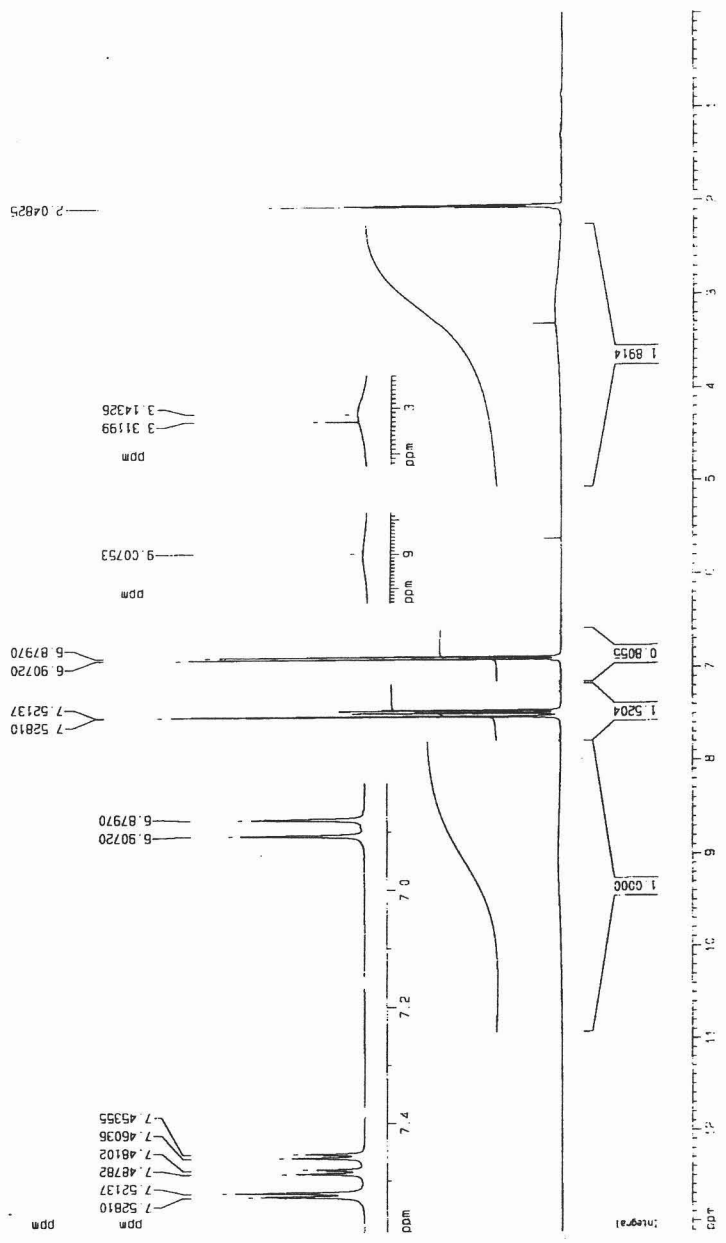


C₇, H₆, O₄, sólido blanco, p. f. 197-203.

Datos de RMN¹H (300 MHz, Acetona D₆).

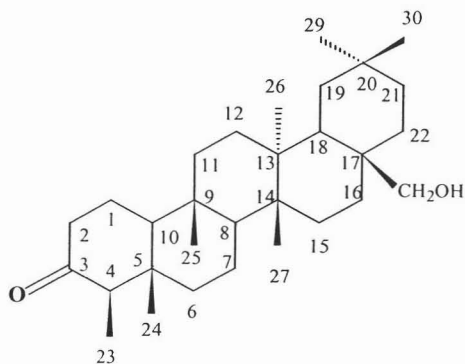
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
H-5	6.89	d	8.25	1
H-6	7.47	dd	2.04 y 8.2	1
H-2	7.52	d	2	1
OH	9.00	s	-	1

Instituto de Biología, UNAM
 Facultad de Biología, UNAM
 Laboratorio de Biología Molecular
 Av. Insurgentes Sur No. 703
 México, D.F. 06702
 Tel. 562 2111
 Fax 562 2111



Espectro 2. Espectro de RMN¹H de Ácido Protocatechuico.

Canofilol



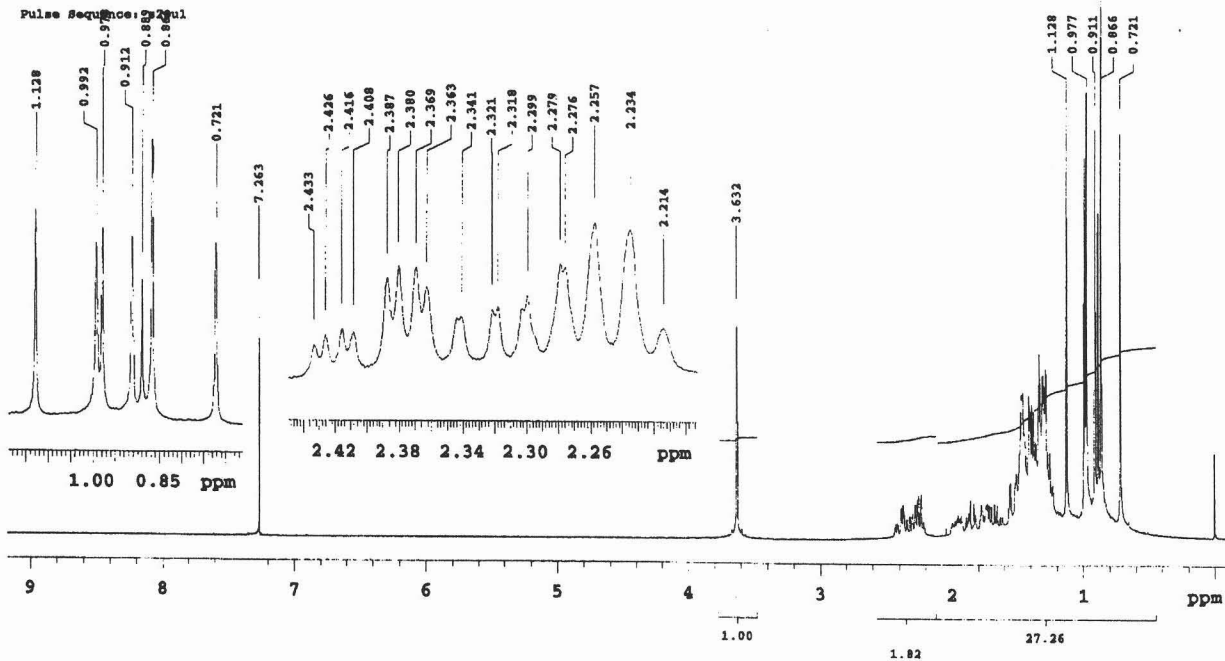
$C_{30} H_{50} O_2$, cristales blancos, p. f. 279 – 282.

IR (KBr) ν_{max} : 3545, 2933, 2866, 1707, 1465 y 1387 cm^{-1} .

Datos de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃).

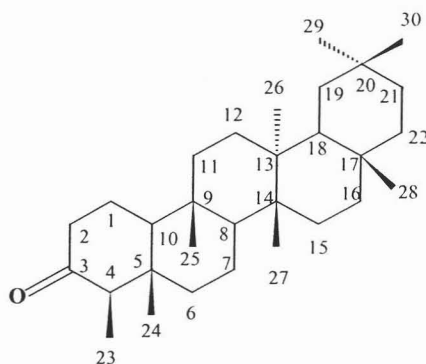
Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
CH ₃ -24	0.72	s	-	3
CH ₃ -25	0.86	s	-	3
CH ₃ -23	0.88	s	-	3
CH ₃ -27	0.91	s	-	3
CH ₃ -26	0.97	s	-	3
CH ₃ -29	0.99	s	-	3
CH ₃ -30	1.12	s	-	3
CH ₂ -28	3.63	s	-	2

Instituto de Química UNAM NE
Dr. Ricardo Reyes/Eduardo A.
Clave:Ca
CDCl₃
Varian-Unity 300MHz-C
1R
No. Orden:3540
18-08-03



Espectro 3. Espectro de RMN¹H de Canofilol.

Friedelina



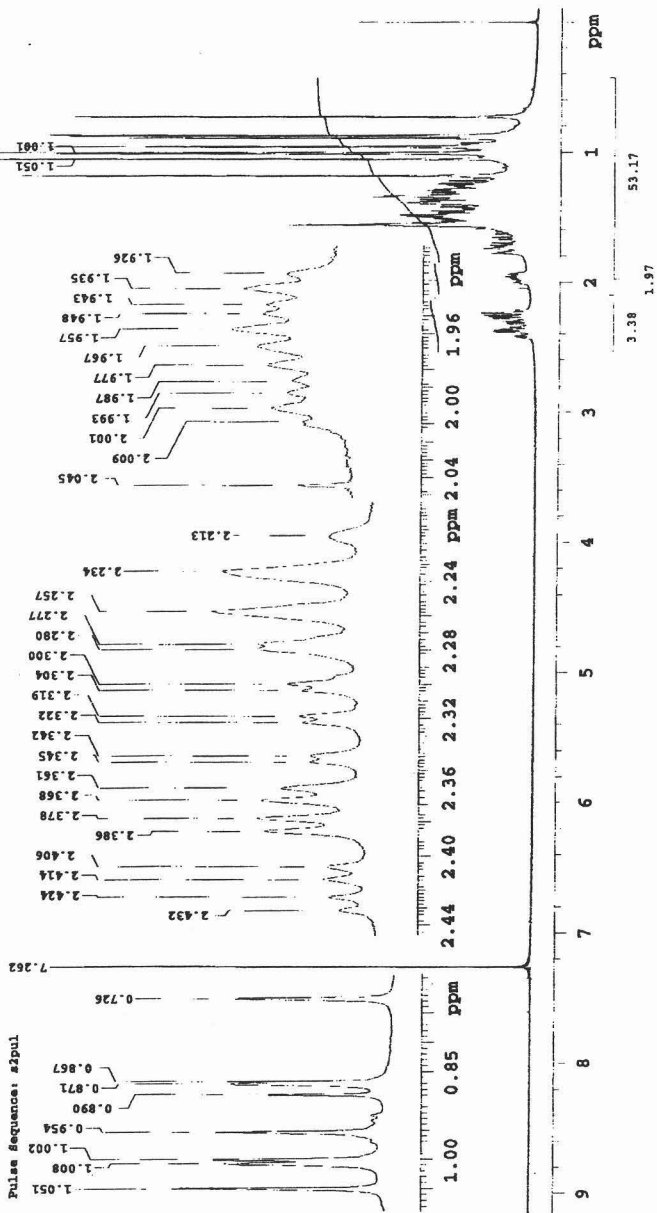
$C_{30}H_{50}O$, cristales blancos, p. f. 267 – 269.

IR (KBr) ν_{max} : 2926, 2860, 1711, 1453 y 1390 cm^{-1} .

Datos de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃).

Protón	δ (ppm)	Multiplicidad	Constante de acoplamiento J (Hz)	Número de H
CH ₃ -24	0.72	s	-	3
CH ₃ -25	0.86	s	-	3
CH ₃ -23	0.87	d	6.6	3
CH ₃ -29	0.95	s	-	3
CH ₃ -26	1.00	s	-	3
CH ₃ -30	1.00	s	-	3
CH ₃ -27	1.05	s	-	3
CH ₃ -28	1.18	s	-	3
H-8	1.34	m	-	1
H-10	1.48	m	-	1
H-18	1.55	m	-	1
H-1	1.67	m	-	1
H-1	1.95	m	-	1
H-4	2.24	m	-	1
2H-2	2.37	m	-	2

Instituto de Quimica UNAM NE
 Dr. Ricardo Reyes/Eduardo A.
 Cleve/FZ
 CDCl3
 Varian-Unity 300MHz-C
 1H
 No. Orden: 3539
 18-08-03



Espectro 4. Espectro de RMN¹H de Friedelina.

II. APÉNDICE HONGOS

Aspergillus japonicus Saito var. *japonicus*, 1906. *Shokubutsugaku Zasshi* 20: 61.

DESCRIPCIÓN:

Las colonias crecen de 4.5-7 cm de diámetro en siete días a 25 °C en medio de cultivo Extracto Czatopec Levadura Agar (CYA), formando un micelio blanco con áreas conidiales pardo oscuras. Esclerocios, cuando se presentan, blancos a color crema. Al reverso, el cultivo presenta una coloración naranja parduzco o ligeramente amarillo verdoso. Diámetro de la colonia en Extracto Czatopec Levadura Agar con 20 % de sacarosa (CY20S) >70 mm, otras características similares a aquellas reportadas para CYA. Diámetro de la colonia en Extracto de Malta Agar (MEA) >70 mm; conidios café oscuro a negros; micelio blanco; cultivo al reverso incoloro. Diámetro de la colonia de (5-)20-25(-55)mm a 37 °C.

Los conidióforos presentan una cabeza radiada; que mide (150-)300-600(-1400) µm de longitud, incolora o algo pigmentada cerca del ápice; vesículas de 14-30(-47) µm de ancho. Uniseriadas con fialides de 5-9 x 3.5-4.5 µm de diámetro. Conidios globosos a subglobosos y ocasionalmente elipsoidales, en un rango de 4-5(-6) x 4-5 µm, con la superficie equinulada.

SUBSTRATO:

Ejemplares examinados:

Aislados de la superficie de las hojas vivas de *Calophyllum brasiliense*.

Distribución y substratos registrados:

Esta especie saprobia ha sido aislada principalmente del suelo; en la rizósfera y materia orgánica vegetal en descomposición (Klich, *et al.*, 2002).

OBSERVACIONES:

Las características morfológicas de los ejemplares examinados coinciden con la descripción de Klich, *et al.*, 2002; los promedios de las medidas de las estructuras se encuentran dentro de los límites registrados para esta especie.

Curvularia lunata (Wakker) Boedijn var. *aeria* (Batista, Lima y Vasconcelos) M. B. Ellis, 1933. **Bull. Jard. Bot. Buitenz, III 13** (1): 127.

Sinonimia: *Malustella aeria* Batista, Lima y Vasconcelos 1966.

Curvularia caricae-papayae Suvastana y Bilgrami 1963.

Curvularia lycopersici Tandon y Kakar 1964.

DESCRIPCIÓN:

Colonias dispersas, pardo oscuras a negras, algodonosas, flocosas, con frecuencia zonadas en el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Micelio compuesto por hifas ramificadas, pardo pálidas a pardas, septadas, lisas de 2-4 μm de ancho. Estroma siempre presente en cultivo, largo, negro, cilíndrico, simple o ramificado. Conidióforos solitarios o en pequeños grupos, no ramificados, rectos o flexuosos, frecuentemente geniculados, pardo pálidos a pardos, septados, de 300-500 μm de longitud, de 5-7.5 μm de grosor en la base, 4-5 μm hacia el ápice. Conidios rectos o curvos, elipsoidales, ovoides o claviformes, con 2-4(3) septos, en ocasiones con uno o más septos más oscuros y gruesos que los otros, con las células centrales pardas a pardo oscuras, la células de los extremos pardo pálidas, la tercera célula a partir de la base usualmente mas oscura, de 24-33.6 x 8.8-12.8 μm , en cultivo de 18-28.5 x 8 -13.2 μm , lisos; hilio no protuberante.

SUBSTRATO:

Ejemplares examinados:

Aislados de la superficie de las hojas vivas de *Calophyllum brasiliense*.

Distribución y sustratos registrados:

Especie ampliamente distribuida en los trópicos (Ellis, 1966). Aislada de diferentes sustratos, principalmente: aire, suelo y en varias especies de plantas como saprobio o patógeno facultativo.

OBSERVACIONES:

Las características morfológicas de los ejemplares examinados coinciden con la descripción de Mercado-Sierra, 1984; los promedios de las medidas de las estructuras se encuentran dentro de los límites registrados para esta especie.

Pestalotiopsis neglecta (Thümen) Steyaert, 1949. **Bull. Jard. Bot. Brux.** 19: 300.

DESCRIPCIÓN:

Micelio inmerso, hialino a café pálido, ramificado y septado. Acérvulo epífilo de aproximadamente 0.1mm de diámetro. Conidióforos hialinos, ramificados y septados. Conidios fusiformes, rectos o ligeramente curvados de 22-28 x 6-8 μm , 4 septos, células finales hialinas y células intermedias pardo pálidas; las dos superiores frecuentemente más oscuras que la tercera. Sétulas apicales de 2 a 3, de 10-23 μm de longitud, apéndice basal de 4-7 μm de longitud.

SUBSTRATO:

Ejemplares examinados:

Aislados de la superficie de las hojas vivas de *Calophyllum brasiliense*.

Distribución y substratos registrados:

Aislado de hojas de *Euonymus japonicus*, *Acacia polyacantha* y *Mangifera indica* (Ellis *et al.*, 1997).

OBSERVACIONES:

Las características morfológicas de los ejemplares examinados coinciden con la descripción de Sutton, 1980 y Ellis *et al.*, 1997; los promedios de las medidas de las estructuras se encuentran dentro de los límites registrados para esta especie.

Rhizoctonia repens Bernard, 1909. **Ann. Sci. Nat. Bot. IX 9:** 31.

Sinonimia: *Epulorhiza repens* (Bernard) Moore, 1987.

Teleomorfo: *Tulasnella calospora* Warcup y Talbot, 1967.

DESCRIPCIÓN:

Hifas hialinas, septadas, lisas y de pared delgada, tortuosas, rastreras, irregulares en grosor (2-3.5µm de diámetro) y de crecimiento lento (< 3 mm / día). En cultivo las ramas hifales están orientadas en dirección al crecimiento de la colonia formando ángulos rectos (90⁰) y agudos (45⁰) con una constricción en el punto de unión con la hifa principal. Un septo es formado en la rama cerca de la constricción. Frecuentemente, muchas de las células de la hifa principal dan origen a nuevas ramas cerca de su extremo final distal, de este modo, el septo en la hifa principal esta cercano a la rama. El número de núcleos en la punta de las hifas jóvenes usualmente es dos (menos frecuente 1-3); por lo que pertenece al grupo de los binucleados. Forma esclerocios diminutos, sumergidos y dispersos; arreglados en racimos de células molinioides de pared delgada, hialina, elipsoides a cercanamente esféricas (13-18 x 8-17 µm), en cadenas ramificadas y no ramificadas.

SUBSTRATO:

Ejemplares examinados:

Aislados de los tejidos internos de las hojas vivas de *Calophyllum brasiliense*.

Distribución y substratos registrados:

Cosmopolita, ubicuo, hongo endófito comúnmente encontrado asociado a las raíces de orquídeas como micorriza; en *Orchis morio* y principalmente en especies de los géneros *Diuris* y *Orthoceras* (Warcup, 1981). También como patógeno de plantas (Ozkoc *et al.*, 2002) o como saprobio formando parte de la flora del suelo; en forma de propágulo (esclerocios) o creciendo entre la materia orgánica.

OBSERVACIONES:

Las características morfológicas de los ejemplares examinados coinciden con la descripción de Sneh, *et al.*, 1991; los promedios de las medidas de las estructuras se encuentran dentro de los límites registrados para esta especie.

Trichoderma viride Rifai, 1969. **Mycol. Papers** 116: 1-56.

Sinonimia: *Trichoderma lignorum* Tode ex Harz 1871.

Trichoderma glaucum Abbott 1926.

Teleomorfo: *Hypocrea rufa* (Pers. ex Fr.) Fr. 1849, *Hypocrea aurantiaca* P. Henn. 1900, *Hypocrea coprosma* Dingley 1952, *Hypocrea atrogelatinosa* Dingley 1956, *Hypocrea muroiana* Hino y Katsumoto 1958, *Hypocrea albo-medullosa* Doi 1972.

DESCRIPCIÓN:

Las colonias crecen de 4.5-7-5 cm de diámetro en cinco días a 20 °C en Harina de Avena Agar (OA). Los conidióforos están ramificados piramidalmente; con ramas cortas cerca de la punta y en la base, largas con repetidas ramificaciones. Fiálides arregladas en grupos divergentes de 2 a 4, delgadas y curvadas irregularmente. Conidios casi globosos de 3.6 - 4.5 (o a 4.8) µm de diámetro; en su mayor parte distintivamente rugosos.

SUBSTRATO:

Ejemplares examinados:

Aislados de la superficie de las hojas vivas de *Calophyllum brasiliense*.

Distribución y substratos registrados:

Es un hongo saprobio del suelo, comúnmente reportado y ampliamente distribuido, se encuentra en el más mundano y extremo de los hábitats, desde áreas alpinas hasta regiones tropicales. Predominante en suelos muy húmedos, ricos en materia orgánica principalmente vegetal de zonas boscosas, aunque también se le puede encontrar en marismas, manglares, pantanos, suelos duros, desiertos, tundras, sabanas, chaparrales y turberas. Es micoparásito y puede llegar a causar podredumbre de papas y frutos cítricos almacenados (Domsch, *et al.*, 1993).

OBSERVACIONES:

Las características morfológicas de los ejemplares examinados coinciden con la descripción de Domsch, *et al.*, 1993; los promedios de las medidas de las estructuras se encuentran dentro de los límites registrados para esta especie.