



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS BIODINÁMICOS A  
PARTIR DE LA ESPECIE ENDÓFITA *BISCOGNIAUXIA* SP.**

**TESIS**

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

**PRESENTA**

**CARLOS ANTONIO FAJARDO HERNÁNDEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

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

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

**ASESOR DEL TEMA:**

---

**Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar**

**SUSTENTANTE:**

---

**Carlos Antonio Fajardo Hernández**

## ÍNDICE

Lista de figuras

Lista de cuadros

Lista de tablas

Lista de abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Importancia de los productos naturales obtenidos a partir de organismos fúngicos ...	1
1.2 Biodiversidad del reino Fungi en México .....	3
1.3 Los organismos endófitos .....	4
1.3.1 Características de las asociaciones endófito-hospedero.....	5
1.3.2 Producción de metabolitos secundarios .....	6
1.3.3 Identificación de hongos endófitos .....	7
1.4 Xylariaceae .....	8
1.4.1 Producción de metabolitos secundarios por Xylariaceae .....	9
1.4.2 Biscogniauxia .....	13
1.5 Cáncer, un problema de salud a nivel mundial .....	17
1.5.1 Los productos naturales como alternativa terapéutica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer .....	18
2. HIPÓTESIS .....	21
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....	22
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	23
4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio .....	23
4.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala .....	23
4.3 Preparación de los extractos orgánicos.....	24
4.4 Estudios de derreplicación.....	25
4.5 Ensayo de citotoxicidad.....	26
4.5.1 Cultivo y suspensión de las líneas celulares .....	26
4.5.2 Procedimiento .....	26
4.6 Fraccionamiento primario del extracto orgánico P11-7 (10×) .....	27
4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en la fracción P11-7 <sub>8</sub> .....	27

4.8 Fraccionamiento primario del extracto orgánico P11-7 (30×) .....	32
4.9 Aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en la fracción P11-7 <sub>5</sub> .....	32
4.10 Caracterización de los productos naturales .....	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos a partir de la fuente vegetal .....	37
5.2 Estudio químico de la especie fúngica <i>Biscogniauxia</i> sp. ....	39
5.2.1 Estudio químico del extracto en mediana escala 10× .....	39
5.2.1.1 Caracterización del fitólido B (1) .....	40
5.2.1.2 Caracterización del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H- furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (2) .....	45
5.2.2 Estudio químico del extracto en mediana escala 30× .....	51
6. CONCLUSIONES .....	54
7. PERSPECTIVAS .....	55
8. BIBLIOGRAFÍA .....	56

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Estructuras del ácido orselínico y ejemplos selectos de metabolitos secundarios de tipo azafilona producidos por <i>Hypoxylon</i> y <i>Entonaema</i> .	11
2	Ejemplos de pigmentos tipo naftaleno y otros metabolitos característicos de <i>Hypoxiloideae</i> .	12
3	Ejemplos de azafilonas producidas por especies de <i>Annulohypoxylon</i> y <i>Creosphaeria</i> .	13
4	Diagrama de flujo de los procesos de fraccionamiento y purificación de P11-7.	28
5	(A) Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico P11-7 (10×) y (B) fraccionamiento secundario de la fracción P11-7 <sub>8</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.	30
6	Fraccionamiento secundario de la fracción P11-7 <sub>8-5</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.	31
7	Fraccionamiento secundario de la fracción P11-7 <sub>8-9</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.	32
8	Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico P11-7 (30×).	34
9	Fraccionamiento secundario de la fracción P11-7 <sub>5</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.	35
10	(A) <i>Tillandsia</i> sp. y (B-F) Especies fúngicas aisladas: códigos P11-2, P11-3, P11-6, P11-7 y P11-19, respectivamente.	37
11	Fitólido B (1).	40
12	Espectros de (A) <sup>1</sup> H RMN y (B) <sup>13</sup> C RMN del fitólido B (1).	42
13	(A) Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) del fitólido B (1).	43
14	Espectro COSY del fitólido B (1).	45
15	9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (2).	45
16	Espectros de (A) <sup>1</sup> H RMN y (B) <sup>13</sup> C RMN del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (2).	47

Figura		Página
17	(A) Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); (B) Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (2).	48
18	Espectro COSY de 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (2).	49
19	Productos mayoritarios de tipo azafilona producidos por <i>Monascus</i> .	51
20	5-metilmeleína (3).	52
21	Principales esqueletos de carbono de los policétidos observados, frecuentes en cultivos de los géneros <i>Daldinia</i> , <i>Entonaema</i> , <i>Phylacia</i> y <i>Thamnomycetes</i> (A-D) y <i>Annulohypoxylon</i> , <i>Biscogniauxia</i> , <i>Camillea</i> , <i>Hypoxylon</i> y <i>Pyrenomyxa</i> (E, F).	53

## Lista de cuadros

Cuadro		Página
1	Clasificación de los principales géneros de la familia Xylariaceae en subfamilias.	9
2	Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico de P11-7 (10×).	29
3	Fraccionamiento secundario de la fracción P11-7 <sub>8</sub> por HPLC a nivel preparativo.	31
4	Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto P11-7 (30×).	33



## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Productos naturales obtenidos a partir de especies de <i>Biscogniauxia</i> .	15
2	Resultados de las evaluaciones biológicas, estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados y rendimiento obtenido de los extractos en pequeña y mediana escala.	38
3	Datos espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$ , 300 MHz; $^{13}\text{C}$ 125 MHz; $\delta$ en ppm; $J$ en Hz) del fitólido B ( <b>1</b> ) y del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído ( <b>2</b> ) en $\text{CDCl}_3$ .	44

## Lista de abreviaturas

°C	Grado Celsius	MEA	Agar extracto de malta
δ	Desplazamiento químico	MeCN	Acetonitrilo
μg	Microgramos	MeOH	Metanol
μL	Microlitros	mg	Miligramos
μm	Micrómetros	MHz	Megahertz
A549	Carcinoma pulmonar	min	Minutos
Abs	Absorbancia	mL	Mililitros
ADN	Ácido dextrorribonucleico	mm	Milímetros
ADNr	Ácido desoxirribonucleico ribosomal	mM	Milimolar
CCA	Cromatografía en columna abierta	mm <sup>2</sup>	Milímetros cuadrados
CCF	Cromatografía en capa fina	NEQs	Nuevas entidades químicas
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado	nm	Nanómetros
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	NRPS	Péptido sintasa no ribosomal
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
COSY	Espectro de correlación homonuclear	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Da	Dalton	PDA	Agar papa dextrosa
DMSO	Dimetilsulfóxido	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	PKS	Policétido sintasa
EM	Espectrometría de masas	ppm	Partes por millón
ESI	Ionización por la técnica de electrospray	psi	Libras por pulgada cuadrada
g	Gramos	RMN	Resonancia magnética nuclear
HCT15	Adenocarcinoma colorrectal	rpm	Revoluciones por minuto
HeLa	Cáncer cervical	RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
HEp-2	Carcinoma laringeal	TCA	Ácido tricloroacético
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	TIC	Total ion current
HR	Alta resolución	TMS	Tetrametilsilano
Hz	Hertz	TRIS	Tris-hidroximetil-aminoetano
ITS	Espaciadores de transcripción internos	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultraeficiencia
kcal	Kilocalorías	UV	Espectro en el ultravioleta
kV	Kilovolts	V	Volts
LPS	Lipopolisacárido	WiDr	Adenocarcinoma de colon
M	Millones	YESD	Extracto de levadura peptona dextrosa

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Importancia de los productos naturales obtenidos a partir de organismos fúngicos

Durante varias décadas, los compuestos derivados de microorganismos, plantas y animales han sido la base de la terapia contra distintas enfermedades. Entre los años de 1981 y 2002, del 75% de los fármacos novedosos utilizados para el tratamiento de enfermedades infecciosas y del 60% para el tratamiento del cáncer, tuvieron su origen a partir de fuentes naturales. En el periodo entre 2001-2005, fueron introducidos en las prácticas alopáticas 23 nuevos fármacos derivados de productos naturales para el tratamiento de distintos padecimientos (infecciones bacterianas y fúngicas, diabetes, cáncer, dislipidemias, dermatitis atópica, desórdenes genéticos y enfermedad de Alzheimer)(Lam, 2007).

Por otra parte, los productos naturales obtenidos a partir de hongos han demostrado su importancia en la salud humana debido a su gran aplicación en la terapéutica contemporánea. El descubrimiento fortuito de la penicilina producida por el hongo filamentoso *Penicillium notatum* (Fleming, 1929), y su amplio uso terapéutico en la década de los 40's, marcó el comienzo de una nueva era en la medicina, y promovió la bioprospección de la naturaleza como fuente de nuevos agentes bioactivos. Así, los microorganismos son una fuente invaluable de metabolitos bioactivos estructuralmente diversos, además de biosintetizar algunos de los productos más importantes para la industria farmacéutica. Estos incluyen agentes antibacterianos, tales como las penicilinas (aislados de *Penicillium* sp.), cefalosporinas (de *Cephalosporium acremonium*), aminoglucósidos, tetraciclinas y otros policétidos de diversos tipos estructurales (de los *Actinomycetales*); agentes inmunosupresores, tales como las ciclosporinas (de *Trichoderma* sp. y *Tolypocladium* sp.) y la rapamicina (de *Streptomyces* sp.); agentes reductores de colesterol, tales como mevastatina (de *Penicillium* sp.) y lovastatina (de *Aspergillus* sp.); antihelmínticos y antiparasitarios, tales como las ivermectinas (de *Streptomyces* sp.) (Cragg & Newman, 2013; Butler & Buss, 2006). Una de las ventajas del estudio de organismos fúngicos como fuente de moléculas bioactivas es que pueden cultivarse en gran escala en medios de cultivo apropiados, facilitando con ello el

suministro ilimitado y constante de principios activos o de la materia prima necesaria para el desarrollo de otros fármacos. Los organismos fúngicos, así como los actinomicetos, han sido el grupo más investigado durante los últimos 50 años para la obtención de nuevas entidades químicas (NEQs) (Bailly, 2009).

Cabe mencionar que algunas NEQs pueden generarse como resultado de las interacciones entre los organismos y su hábitat, favoreciendo a su vez las posibilidades de supervivencia y competencia (Mishra & Tiwari, 2011). Por otro lado, los avances en la investigación de los grupos de genes que codifican para algunas enzimas implicadas en la biosíntesis de los metabolitos secundarios microbianos, tales como el complejo policétido sintasa (PKS) y/o péptido sintasa no ribosomales (NRPS), han permitido el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios con un bajo rendimiento en los procesos de fermentación estándares (Cragg & Newman, 2013; McAlpine *et al.*, 2005). Así, cerca de 14,000 compuestos han sido obtenidos a partir de estos organismos, lo que representa aproximadamente el 6% de todos los compuestos aislados de la naturaleza. Aunado a esto, la falta de éxito para cultivar la mayoría de los microorganismos provenientes de fuentes naturales ha limitado considerablemente el estudio de los ecosistemas microbianos naturales, y se ha estimado que menos del 1% de los microorganismos observados al microscopio han logrado cultivarse. A pesar de estas limitantes, el número de agentes quimioterapéuticos eficaces de origen microbiano descubiertos y desarrollados a la fecha ha sido importante (Pace, 1997; Cragg & Newman, 2013). Se espera que en los próximos 10 años este porcentaje se incremente significativamente con la mejora de los métodos de cultivo y fermentación de estos organismos, además de la creciente explotación de la metabolómica de los microorganismos no cultivables. Así, nuevos compuestos que pertenecen a nuevas clases estructurales y que poseen propiedades biológicas inusuales pueden ser descubiertos a partir de estos microorganismos, mientras que la mejora de las técnicas analíticas para la rápida derreplicación de compuestos conocidos permitirá la obtención selectiva de NEQs (Cragg & Newman, 2013; Bailly, 2009).

## 1.2 Biodiversidad del reino Fungi en México

El reino de los hongos es un grupo ubicuo y megadiverso morfológica, fisiológica y genéticamente. Se estima que el número de especies sobre la Tierra varía entre 1.5 y 5 M de especies (Mishra & Singh, 2014; Sette *et al.*, 2013). Estos organismos eucariontes, son en su mayoría descritos como filamentosos de crecimiento apical, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y/o sexual por medio de esporas, y con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014).

México, es considerado un país megadiverso en cuanto a grupos de organismos, ocupando el quinto lugar en el mundo por su gran número de especies y endemismos, y cuenta con el 10% de la diversidad terrestre del planeta. Se estima que en nuestro país existen cerca de 200,000 especies de hongos de los cuales se conocen alrededor de 8,000 (4%). Adicionalmente se conocen 4,500 especies de hongos macroscópicos, lo que representa el 6.6% de la biodiversidad fúngica en el mundo (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014; Guzmán, 1998).

La diversidad fúngica mexicana es mayor en los bosques tropicales y subtropicales que en los bosques de encinos y coníferas de zonas templadas, y menor en las zonas áridas. Para hacer un completo inventario de hongos en un bosque tropical, se deben de tomar en cuenta más de 30 tipos de hábitats y microhábitats, así como la participación de más de 21 especialistas en diferentes grupos taxonómicos. En México, si consideramos este criterio, el porcentaje de especies por describir en este tipo de ecosistemas y la escasez de taxónomos especializados, requeriría de cientos de años para completar el registro total de las especies que se desarrollan en estas regiones (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). Los factores importantes que se tienen que tomar en cuenta para poder realizar una estimación global de la diversidad de especies fúngicas existente son las siguientes (Bass & Richards, 2011):

- (1) la heterogeneidad del hábitat
- (2) las relaciones especies-ecosistema
- (3) la especificidad e inclusividad de secuencias iniciadoras

- (4) la profundidad de la secuenciación (saturación de muestreo)
- (5) la estructuración biogeográfica
- (6) los ambientes relativamente inexplorados, y
- (7) la comparación entre los métodos de muestreo moleculares.

En este contexto, y tomando en cuenta que los organismos fúngicos pueden crecer sobre una amplia gama de sustratos gracias a su método de nutrición simple (por absorción a través de sus membranas superficiales y sus potentes enzimas extracelulares)(Guzmán, 1998), existe un gran número de especies de hongos por descubrir en nuestro país, representando a su vez una enorme oportunidad en la búsqueda de nuevos metabolitos biodinámicos a partir de estos organismos.

### **1.3 Los organismos endófitos**

El término "endófito" originalmente introducido por de Bary (1866), se refiere a cualquier organismo microscópico que se encuentra colonizando internamente los tejidos vegetales de plantas. Así, el "endofitismo" es por lo tanto, una relación de costo-beneficio entre la planta y el microorganismo, la cual es transitoria, asintomática y discreta, y se establece en su totalidad dentro de los tejidos del organismo anfitrión vivo (Mishra & Singh, 2014; Mueller *et al.*, 2004; Kusari *et al.*, 2012; Suryanarayanan, 2013; Prado *et al.*, 2012).

Los organismos fúngicos endófitos son un grupo muy diverso, polifilético y en ocasiones, son altamente específicos a su hospedero o de un tejido vegetal delimitado. Se ha observado que la composición de la microbiota interna es distinta en las diferentes estructuras, órganos y tejidos de los organismos vegetales (incluyendo tallos y hojas), aunque algunas especies de endófitos también se pueden encontrar en la microbiota epífita (superficial) o rizósfera (en el suelo y/o raíces). Algunos endófitos pueden llegar a ser saprobios durante la senescencia del hospedero o patógenos cuando el anfitrión se vuelve susceptible. Además, una característica de estos organismos es que frecuentemente no esporulan, lo cual representa un reto para establecer su identidad taxonómica (Chaverri & Gazis, 2011). Debido a que estos organismos generalmente no

causan ningún síntoma de enfermedad en las plantas hospederas, su interacción con éstas implica un intercambio metabólico (Mueller *et al.*, 2004; Chaverri & Gazis, 2011; Mishra & Singh, 2014).

En general, se ha planteado que el modo de transmisión de los endófitos puede ser vertical (a través de semillas hospederas) u horizontal (a través de la propagación por ascosporas o conidios). Los endófitos de plantas leñosas pueden ser originados a partir de la transmisión horizontal debido a la ausencia generalizada de semillas de árboles. Así, la infección por endófitos de transmisión horizontal depende de la disponibilidad y la viabilidad de los propágulos de hongos en el medio ambiente circundante (Chaverri & Gazis, 2011).

### **1.3.1 Características de las asociaciones endófito-hospedero**

Los organismos endófitos poseen un inmenso potencial para mejorar la resistencia del huésped ofreciendo protección contra una variedad de factores de estrés biótico y abiótico, así como contra los organismos herbívoros a través de la producción de diversos metabolitos secundarios. Así, se ha observado que estos organismos fomentan la liberación de compuestos fenólicos a la rizosfera, lo que resulta en una absorción más eficiente de fósforo en el suelo y una mayor tolerancia al aluminio y otros metales a través de la quelación. Además, facilitan la absorción de nutrientes esenciales necesarios para el crecimiento vegetal, el establecimiento de las plantas en el suelo estimulando la formación de raíces, absorción de agua, iones, el almacenamiento de nutrientes, y desempeñan un papel clave para afectar la tolerancia del huésped al calor, la sequía, la contaminación por metales pesados en el suelo, la evolución, la biodiversidad vegetal y el aumento de la ecofisiología de las plantas hospederas (Mishra & Singh, 2014; Mueller *et al.*, 2004; Prado *et al.*, 2012).

Se han establecido dos hipótesis principales para describir la interacción que estos organismos tienen con su hospedero (Kusari *et al.*, 2014):

- *Antagonismo equilibrado*: ésta hipótesis explica la manera en la que un endófito evita la activación de las defensas del huésped, asegurando la auto-resistencia antes de ser incapacitado por los metabolitos tóxicos del anfitrión, encontrando una forma para crecer dentro de su hospedero sin causar manifestaciones visibles de infección o enfermedad. Además, se propone que la colonización asintomática es un equilibrio de los antagonismos entre el hospedero y el endófito. Los endófitos y patógenos poseen muchos factores de virulencia que son contrarrestados por los mecanismos de defensa de la planta. Si la virulencia del hongo y defensa de la planta están en equilibrio, la asociación sigue siendo aparentemente asintomática y no virulenta. Esta fase sólo es un período transitorio en que los factores ambientales juegan un papel importante para desestabilizar el delicado equilibrio de los antagonismos. Si los mecanismos de defensa de las plantas contrarrestan completamente a los factores de virulencia de los hongos, los organismos fúngicos perecerían. Finalmente, la interacción planta-endófito podría no ser específicamente equilibrada entre la virulencia y la defensa, pero sí una interacción mucho más compleja, precisa y controlada (Kusari *et al.*, 2014).

- *Coevolución planta-endófito*: ésta hipótesis plantea que los endófitos auxilian a su hospedero en la defensa química mediante la producción de metabolitos secundarios bioactivos. Éste fenómeno está relacionado con la preadaptación evolutiva de los endófitos que infectan la misma planta, independientemente de su capacidad biosintética. El mecanismo de protección del hospedero puede ser mediado por la producción de metabolitos secundarios, por micoparasitismo o la inducción de resistencia sistémica. Estos organismos pueden contribuir a la defensa del huésped contra fitopatógenos mediante el control de la fisiología vegetal, además de que los endófitos pueden limitar el estrés de la planta a través de la simbiosis (Kusari *et al.*, 2012; Prado *et al.*, 2012).

### **1.3.2 Producción de metabolitos secundarios**

La mayoría de los estudios sobre productos naturales de hongos endófitos están enfocados en el aislamiento y el análisis de compuestos bioactivos. Sin embargo, muy pocas de éstas investigaciones se centran en la función de estos compuestos en el medio ambiente, o sobre las asociaciones planta-endófito (Prado *et al.*, 2012; Mishra & Singh,



2014). Estos organismos han mostrado su enorme capacidad para producir nuevos e interesantes metabolitos secundarios, con posible aplicación farmacéutica, industrial y/o agroquímica (Mishra & Singh, 2014). Así, estos organismos pueden ser utilizados para la obtención sustentable de compuestos biodinámicos. Finalmente, es posible que algunos de los llamados "metabolitos secundarios vegetales" puedan ser en realidad productos naturales de origen fúngico (Mishra & Singh, 2014; Kusari *et al.*, 2012). Debido a la interacción continua entre los endófitos y sus hospederos, se ha propuesto que existe una transferencia horizontal de genes entre el genoma de la planta y el del endófito o viceversa, como un mecanismo por el cual estos organismos pueden producir compuestos que se creían eran exclusivos del metabolismo vegetal (Kusari *et al.*, 2012).

Por otro lado y debido a las interacciones entre hongos endófitos con su hospedero u otros endófitos, las condiciones de cultivo *in vitro* pueden afectar el tipo de metabolitos secundarios que se producen. Está bien establecido que los procesos metabólicos de los microorganismos son críticamente dependientes de los parámetros del cultivo. Por lo tanto, es altamente deseable establecer sistemas de cultivo adecuados y desafiar a las complejas interacciones que poseen los endófitos dentro del sistema mediante el uso de diferentes parámetros de fermentación accesibles, y/o utilizar inductores o antagonistas para modular el crecimiento y las condiciones de producción de estos compuestos (Kusari *et al.*, 2012; Kusari *et al.*, 2014).

### **1.3.3 Identificación de hongos endófitos**

De manera general, para la identificación de cualquier organismo fúngico se requiere de exámenes morfológicos que incluyen el análisis de la esporulación y las características de las esporas. Sin embargo, la mayoría de los endófitos no esporulan en cultivos artificiales, por lo que la identificación basada en esta morfología resulta imposible. Así, estos organismos se logran identificar mediante el análisis de los espaciadores de transcripción internos (ITS) de las secuencias 18S del ADN ribosomal (ITS1 y ITS2), reconocidos como marcadores moleculares a nivel de especie en los hongos. Este enfoque permite la evaluación de la diversidad global (incluyendo los organismos no cultivables) de los hongos endófitos. Las secuencias que comparten al

menos un 97% de similitud por pares (que se encuentra dentro del rango intraespecífico de las especies divergentes de hongos) se agrupan en "unidades taxonómicas operacionales" y se identifican mediante la opción BLAST en la base de datos NCBI GenBank (Prado *et al.*, 2012). Si la similitud genética, utilizando la región 18S ADNr y la región aún más conservada 28S ADNr es baja, se permite la asignación de los taxones a nivel de género, familia u orden. Por otra parte, el enfoque metagenómico complementario mediante PCR del hábitat, se puede desarrollar para recuperar endófitos que no crecen en medios de cultivo estándar o que tienen asociaciones obligatorias con su anfitrión (Prado *et al.*, 2012).

#### 1.4 Xylariaceae

*Xylariaceae* (Xylariales, Ascomycotina) es una gran familia que comprende más de 51 géneros (GenBank, 2015). *Xylariaceae* tiene especies representativas en la mayoría de los países del mundo y constituye uno de los grupos de hongos endófitos de mayor interés como fuentes de compuestos novedosos (Stadler, 2011) (**Cuadro 1**).

En general, los individuos pertenecientes a ésta familia se localizan en bosques tropicales y bosques de niebla, así como también en ambientes estacionalmente secos. Además, son los más numerosos en las zonas tropicales de América y Asia. Por otra parte, el hecho de que muchos miembros de esta familia recurren como especies endófitas impone restricciones para mapear potencialmente su distribución con precisión, junto con la falta de estudios realizados por especialistas particularmente en los trópicos (Whalley, 1996; Rogers, 2000).

Éstos organismos poseen diferentes estilos de vida y funciones en la naturaleza debido a la capacidad que poseen para colonizar una amplia gama de sustratos, ocupar diferentes hábitats (debido a su capacidad para destruir sustratos lignocelulósicos), descomponer la madera y como fitopatógenos y endófitos; sin embargo, no se encuentran a menudo en el suelo (Whalley, 1996; Rogers, 2000; Stadler, 2011). Por otro lado, los endófitos de la familia *Xylariaceae* pueden actuar de forma antagonista a parásitos ya que estos metabolizan a su propio arsenal de metabolitos secundarios para la defensa de su hábitat

(antibióticos, compuestos fitotóxicos), los cuales pueden acumularse substancialmente en las plantas hospederas (Whalley, 1996; Stadler, 2011).

**Cuadro 1.** Clasificación de los principales géneros de la familia Xylariaceae en subfamilias (Stadler, 2011)

Hypoxyloideae	Xylaroideae	Otros
<i>Anthostomella</i>	<i>Astrocystis</i>	<i>Ascovirgaria</i>
<i>Areolospora</i>	<i>Ascotricha</i>	<i>Creosphaeria</i>
<i>Biscogniauxia</i>	<i>Discoxylaria</i>	<i>Kretzchmariella</i>
<i>Camillea</i>	<i>Engleromyces</i>	<i>Lopadostoma</i>
<i>Chlorostroma</i>	<i>Entoleuca</i>	<i>Whalleya</i>
<i>Daldinia</i>	<i>Euepixylon</i>	
<i>Entonaema</i>	<i>Halorosellinia</i>	
<i>Hypoxylon</i>	<i>Hypocopra</i>	
<i>Induratia</i>	<i>Jumillera</i>	
<i>Obolarina</i>	<i>Kretzschmaria</i>	
<i>Phylacia</i>	<i>Leprieuria</i>	
<i>Pyrenomomyxa</i>	<i>Nemania</i>	
<i>Rhopalostroma</i>	<i>Podosordaria</i>	
<i>Thamnomyces</i>	<i>Poronia</i>	
<i>Theissenia</i>	<i>Rosellinia</i>	
<i>Thuemenella</i>	<i>Sarcoxylon</i>	
<i>Versiomyces</i>	<i>Stilbohypoxylon</i>	
<i>Vivantia</i>	<i>Xylaria</i>	

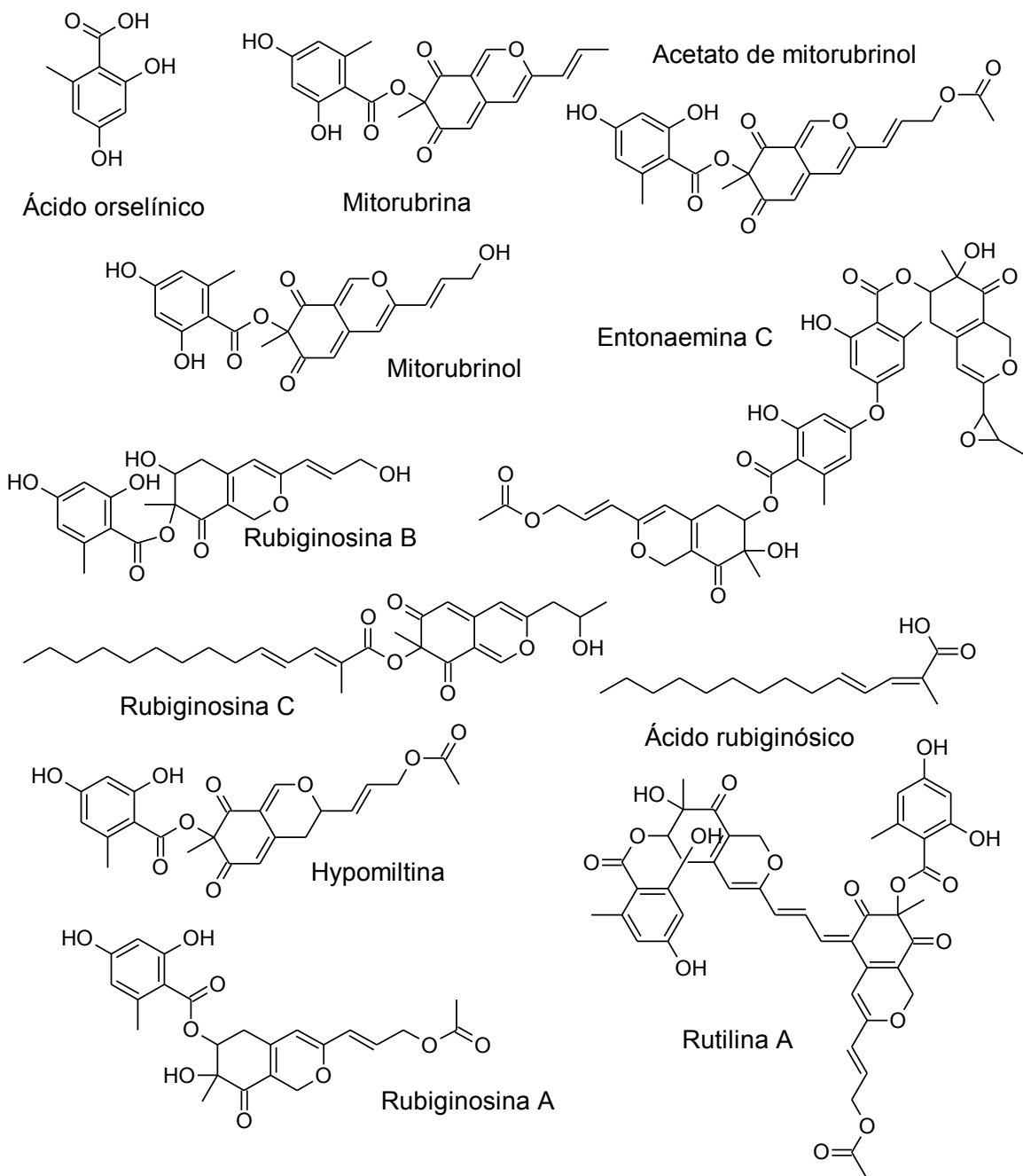
#### 1.4.1 Producción de metabolitos secundarios por Xylariaceae

El término "metabolito" se refiere a compuestos (pequeñas moléculas con pesos moleculares menores a 1000 Da) que son esenciales para la vida de un organismo a través de procesos metabólicos esenciales (metabolitos primarios) o bien, no esenciales, pero necesarios para la supervivencia dentro de un entorno determinado (metabolitos secundarios) (Wolfender *et al.*, 2015).

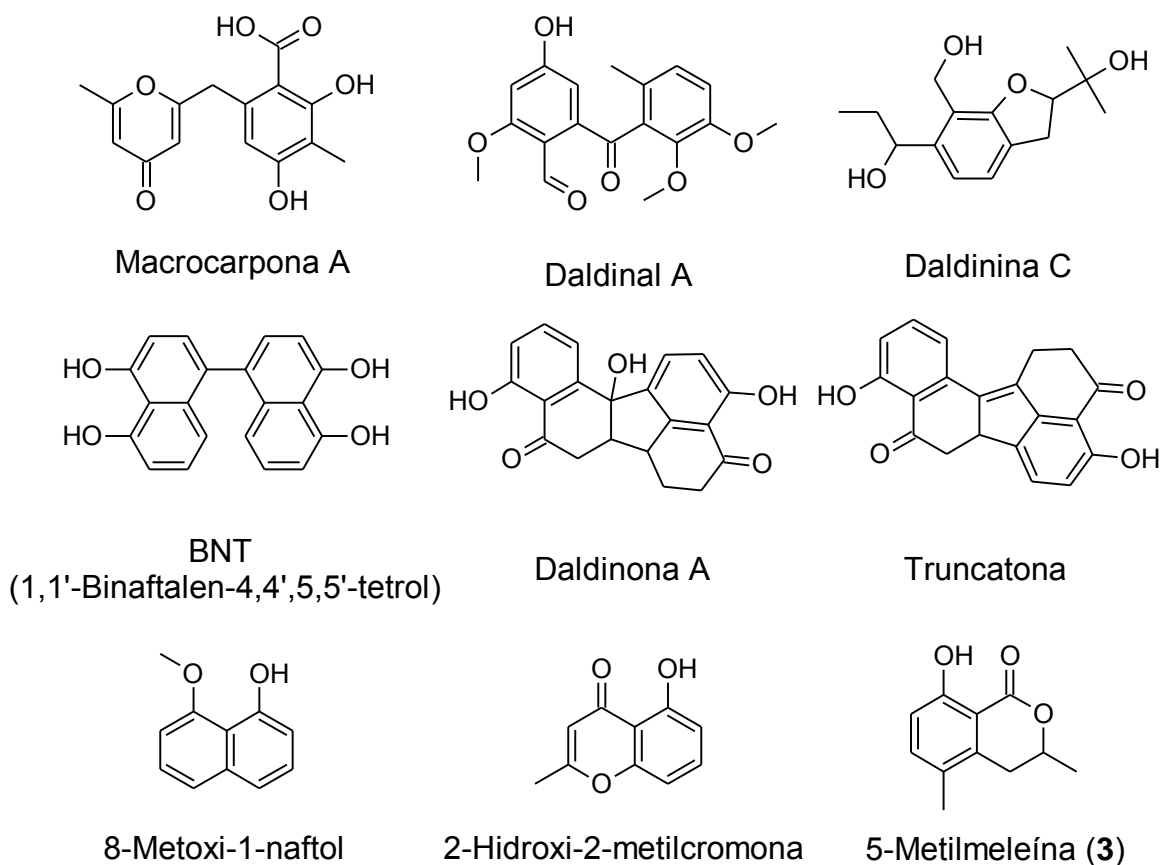
A partir de la combinación de estudios morfológicos y moleculares, se acepta que la familia Xylariaceae está dividida en dos linajes principales, Hypoxyloideae y Xylaroideae, y varios géneros cuyas características de clasificación con el resto de la familia no son plenamente comprendidas (Stadler & Hellwig, 2005). Aparte de la *Clavicipitaceae*,

*Hypocreaceae*, y *Trichomaceae*, ésta familia representa uno de los grupos de hongos mejor estudiados en la producción de metabolitos secundarios biológicamente activos y taxonómicamente importantes. Sin embargo, sólo algunas especies han sido estudiadas exclusivamente para establecer su contenido metabólico (Stadler & Hellwig, 2005).

Los primeros metabolitos secundarios obtenidos de los miembros de la familia Xylariaceae fueron aislados antes de 1960 (Stadler, 2011; Stadler *et al.*, 2007). Muchos de éstos compuestos son pentacétidos provenientes de la biosíntesis de la melanina o hexacétidos producidos por variaciones en la ruta metabólica acetato-malonato y pueden estar conjugados con tetracétidos, ácido orselínico o ácidos grasos (**Figura 1**) (Stadler *et al.*, 2007). La gran mayoría de los metabolitos de Xylariaceae conocidos a la fecha son policétidos (Stadler, 2011). Por otra parte, los pigmentos producidos por la subfamilia *Hypoxiloideae* son derivados de naftaleno (**Figura 2**), las mitorubrininas y otros compuestos de tipo azafilona (**Figura 3**). Sin embargo, es importante mencionar que las azafilonas e incluso los derivados de naftaleno tienen una distribución taxonómica restringida.

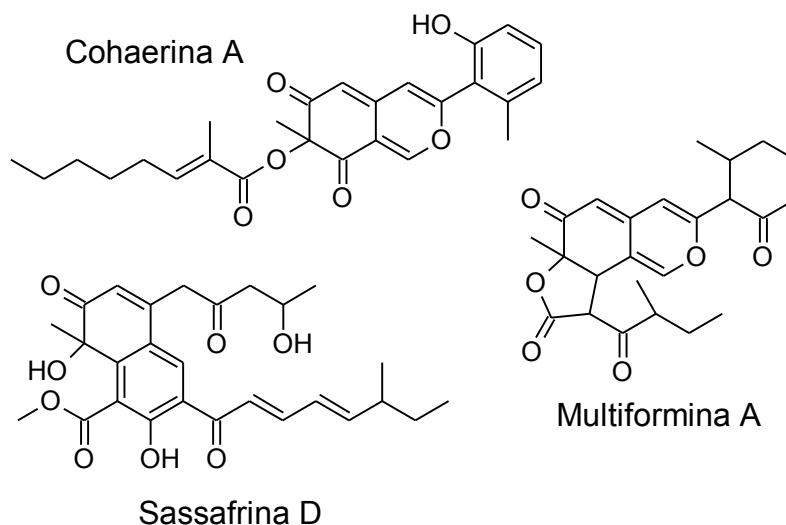


**Figura 1.** Estructuras del ácido orselínico y ejemplos selectos de metabolitos secundarios de tipo azafilona producidos por *Hypoxylon* y *Entonaema* (Stadler et al., 2007).



**Figura 2.** Ejemplos de pigmentos tipo naftaleno y otros metabolitos característicos de *Hypoxiloideae* (Stadler *et al.*, 2007).

Por otro lado, las sassafrinas y multiforminas poseen un amplio espectro de actividad antibiótica; las cohaerinas muestran actividades similares, ligeramente más eficaces que las estructuralmente relacionadas multiforminas (**Figura 3**), lo que indica que la presencia del anillo aromático adicional en este tipo de compuestos no influye sustancialmente en el efecto nematocida y/o antibiótico. Además, diversos compuestos han sido caracterizados de acuerdo a su efecto en los sistemas biológicos y se ha encontrado que poseen un mecanismo de acción inespecífico, el cual se deriva de la reactividad de este tipo de moléculas con el nitrógeno presente en proteínas y ácidos nucleicos. El hecho de que estos pigmentos se localicen en altas concentraciones debajo de la superficie estromatal (extrolitos) formando gránulos, sugiere que funcionan como una primer línea de defensa química para el organismo los cuales son esenciales para la supervivencia del hongo y la coevolución (Stadler *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Ejemplos de azafilonas producidas por especies de *Annulohyphoxylon* y *Creosphaeria* (Stadler *et al.*, 2007).

Las funciones naturales de los metabolitos secundarios producidos por la familia Xylariaceae son bastante evidentes en el caso de los numerosos compuestos con propiedades antibióticas. Por otro lado, se observa que los Xylariaceae fitopatógenos producen un gran número de fitotoxinas que probablemente están implicadas en el parasitismo y son factores determinantes en la virulencia (Stadler & Hellwig, 2005). No obstante, aunque la importancia quimiotaxonómica de algunas familias de compuestos está bien establecida, sus funciones biológicas y ecológicas no se han estudiado sistemáticamente (Stadler, 2011).

#### 1.4.2 Biscogniauxia

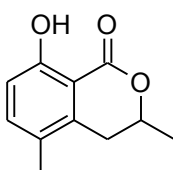
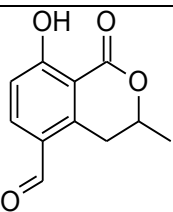
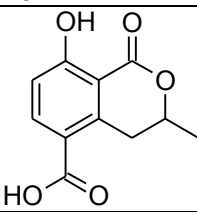
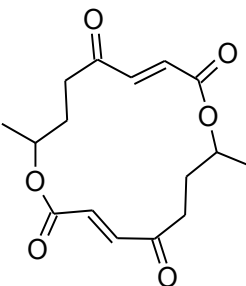
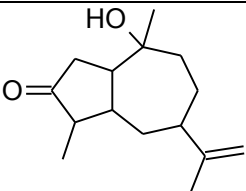
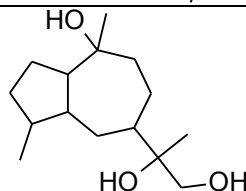
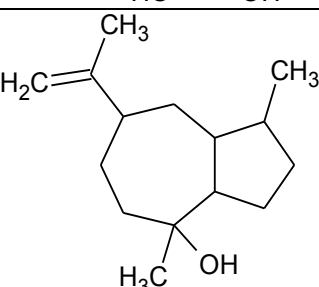
Los microorganismos pertenecientes al género *Biscogniauxia* (Xylariaceae) se clasifican como saprófitos facultativos ya que pueden pasar la mayoría de su ciclo en forma parasitaria y permanecer por largos periodos en material muerto (Nugent *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que varias especies del género *Biscogniauxia* pueden vivir como endófitos; por ejemplo el aislamiento de *B. formosana* a partir de *Cinnamomum sp.* (Cheng *et al.*, 2012) y *B. nummularia* a partir de una especie de ciruelo (*Cephalotaxus harringtonia*) (Amand *et al.*, 2012).

Los metabolitos producidos por éste género han sido estudiados principalmente para tratar de explicar las relaciones taxonómicas que éste organismo establece con su entorno (Whalley & Edwards, 1985; Stadler, 2011), y pertenecen a una variedad de compuestos estructuralmente diversos: terpenoides, ciclopéptidos, policétidos, citocalasinas, xantonas y xilocetales, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en *Xylaria* sp. (Cheng *et al.*, 2011) (**Tabla 1**). Algunas especies como *Biscogniauxia nummularia*, *B. marginata* y *B. mediterranea* producen al metabolito 5-metilmeleína (**3**), componente característico y mayoritario de muchas especies de *Hypoxylon*. Así mismo, existe evidencia de que este compuesto y sus derivados (por ejemplo, la 5-formilmeleína y la 5-carboximeleína) están implicados en algunas enfermedades en plantas (Whalley, 1996; Stadler *et al.*, 2007; Evidente *et al.*, 2005).

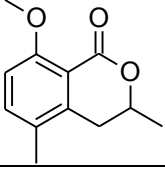
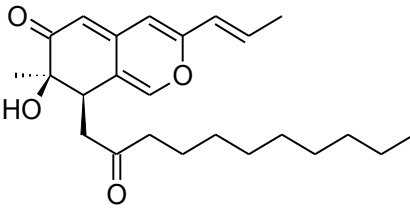
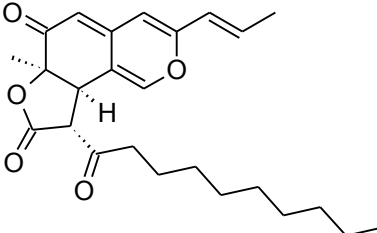
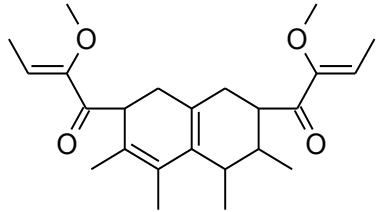
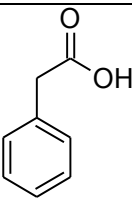
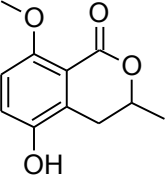
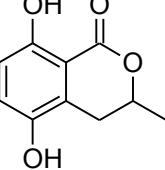
En los últimos años se ha logrado el aislamiento de diversos productos naturales con perspectivas prometedoras, como es el caso de la xylaranona y el xylaranol B producidos por *B. nummularia*, los cuales presentan un potente efecto antigerminativo en semillas de *Raphanus sativus* y pueden estar involucrados en la latente patogénesis de éste organismo (Amand *et al.*, 2012); las biscogniazafilonas A y B poseen un efecto antagonista frente a la cepa H<sub>37</sub>Rv de *Mycobacterium tuberculosis* (Cheng *et al.*, 2012) y el biscopirano, la 5-metilmeleína (**3**) y el ácido fenilacético aislados de *B. mediterranea*, tienen un efecto fitotóxico que pudiera estar relacionado con el decaimiento del roble (*Quercus suber* L.) (Evidente *et al.*, 2005).



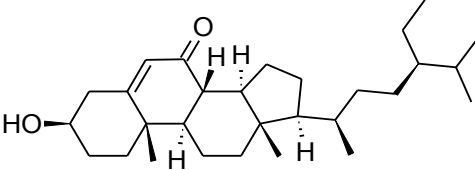
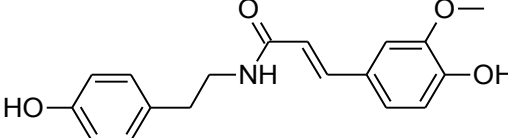
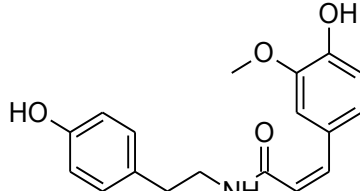
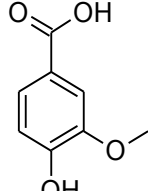
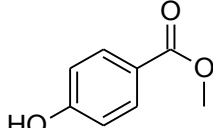
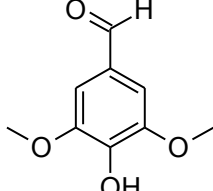
**Tabla 1.** Productos naturales obtenidos a partir de especies de *Biscogniauxia*.

Especie	Compuesto	Estructura	Actividad
<i>B. marginata</i> , <i>B. nummularia</i> , <i>B. mediterranea</i>	5-metilmeleína (3) (Whalley & Edwards, 1985; Amand <i>et al.</i> , 2012; Evidente <i>et al.</i> , 2005)		Fitotoxina
<i>B. marginata</i> , <i>B. cylindrospora</i>	5-formilmeleína (Whalley & Edwards, 1985; Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Fitotoxina
<i>B. marginata</i> , <i>B. cylindrospora</i>	5-carboximeleína (Whalley & Edwards, 1985; Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Fitotoxina
<i>B. marginata</i>	Pirenoforina (Whalley & Edwards, 1985)		Fitotoxina, Agente antifúngico
<i>B. nummularia</i>	Xylaranona (Amand <i>et al.</i> , 2012)		Actividad antigerminativa contra semillas de <i>Raphanus sativus</i>
<i>B. nummularia</i>	Xylaranol B (Amand <i>et al.</i> , 2012)		Actividad antigerminativa contra semillas de <i>Raphanus sativus</i>
<i>B. nummularia</i>	Pogostol (Amand <i>et al.</i> , 2012)		No reportada

**Tabla 1.** Productos naturales obtenidos a partir de especies de *Biscogniauxia* (continuación).

<i>B. nummularia</i>	8-metoxi-5-metilmeleína (Amand <i>et al.</i> , 2012)		Fitotoxina
<i>B. formosana</i>	Biscogniazafilona A (Cheng <i>et al.</i> , 2012)		Antimicrobacteriano contra <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv
<i>B. formosana</i>	Biscogniazafilona B (Cheng <i>et al.</i> , 2012)		Antimicrobacteriano contra <i>M. tuberculosis</i> cepa H37Rv
<i>B. mediterranea</i>	Biscopirano (Evidente <i>et al.</i> , 2005)		Fitotoxina
<i>B. mediterranea</i>	Ácido fenilacético (Evidente <i>et al.</i> , 2005)		Fitotoxina
<i>B. cylindrospora</i>	(3S)-5-hidroxi-8-O-metilmeleína (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Fitotoxina
<i>B. cylindrospora</i>	5-hidroximetilmeleína (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Fitotoxina

**Tabla 1.** Productos naturales obtenidos a partir de especies de *Biscogniauxia* (continuación).

<i>B. cylindrospora</i>	3 $\beta$ -hidroxiestigmast-5-en-7-ona (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		No reportada
<i>B. cylindrospora</i>	N- <i>trans</i> -feruloiltiramina (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Inhibidor de la agregación plaquetaria; hepatoprotector
<i>B. cylindrospora</i>	N- <i>cis</i> -feruloiltiramina (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		No reportada
<i>B. cylindrospora</i>	Ácido vanílico (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Antifúngico
<i>B. cylindrospora</i>	Metilparabeno (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Conservador; agente antimicrobiano; fitotoxina
<i>B. cylindrospora</i>	Siringaldehído (Cheng <i>et al.</i> , 2011)		Agente de escisión del ADN

## 1.5 Cáncer, un problema de salud a nivel mundial

El cáncer es un proceso de crecimiento y diseminación incontrolado de células que puede aparecer prácticamente en cualquier órgano o tejido del cuerpo humano. El tumor suele invadir el tejido circundante y puede provocar metástasis en puntos distantes entre los diferentes órganos y tejidos (OMS, 2015).

Se estima que 14,1 millones de nuevos casos de cáncer y 8,2 millones de muertes por cáncer se produjeron en el año 2012 en todo el mundo. El cáncer de pulmón y de mama son los tipos de cánceres más frecuentemente diagnosticados y la principal causa de muerte por cáncer en hombres y mujeres, respectivamente. Sin embargo, en los países más desarrollados, el cáncer de próstata es el más frecuentemente diagnosticado en hombres y el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Otros tipos de cáncer diagnosticados con frecuencia en todo el mundo incluyen el de hígado, estómago, colon y recto, en hombres, y de estómago, cuello uterino y colorrectal en mujeres. Los países menos desarrollados presentan sólo el 57% de los casos y el 65% de las muertes por cáncer en todo el mundo (Torre *et al.*, 2015).

En México, del total de defunciones durante el 2013, 12.8% se debieron a algún tumor y de éstas, el 93.4% por tumores malignos, así, las neoplasias son la tercer causa de mortalidad en las mujeres, en tanto que para los hombres, es la quinta causa (INEGI, 2015). A pesar de los esfuerzos y avances médicos en el campo de la oncología, el cáncer se sigue ubicando entre las principales causas de mortalidad tanto a nivel mundial como nacional. Finalmente, la problemática del cáncer seguirá desplazándose a países menos desarrollados, debido al crecimiento y envejecimiento de la población y al aumento de la prevalencia de los factores de riesgo conocidos y estilo de vida poco saludable, además de que los mecanismos de reparación celular pierden eficacia con la edad (INEGI, 2015).

### **1.5.1 Los productos naturales como alternativa terapéutica para el tratamiento de distintos tipos de cáncer**

La historia del descubrimiento y desarrollo de fármacos contra el cáncer está estrechamente vinculada a los productos naturales y la farmacología de sustancias de origen natural. Los mecanismos de defensa químicos en los reinos vegetal y animal a menudo implican agentes citotóxicos o citostáticos. En consecuencia, los seres humanos pueden beneficiarse de la competencia entre las formas de vida procariotas y eucariotas, y los refinamientos que repercuten en toxinas que abrumen los mecanismos de defensa celular (Huryn & Wipf, 2014).

Los productos naturales obtenidos a partir de bacterias y plantas han jugado un papel muy importante en el descubrimiento de fármacos contra el cáncer resultando en un gran número de agentes útiles clínicamente. Así, entre los años 40's hasta la fecha, de los 175 fármacos contra el cáncer, 131 (75%) pertenecen a la categoría de "otras moléculas no sintéticas". De éstos, 85 (49%) son productos naturales o sus derivados (Cragg & Newman, 2013; Evidente *et al.*, 2014; Bailly, 2009; Huryn & Wipf, 2014). Actualmente, el 47% de los medicamentos contra el cáncer y 52% de los nuevos productos químicos introducidos en el mercado son de origen natural (Mishra & Singh, 2014). En 1964, la actinomicina se convirtió en el primer producto natural aprobado para su indicación en oncología. Otros medicamentos basados en productos naturales tales como antraciclinas, alcaloides de la vinca (vincristina, vinorelbina), lignanos, epipodofilotoxinas, derivados de camptotecina y taxoides que se lanzaron antes de 1997, siguen siendo una parte esencial en la terapia y el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer (Basmadjian *et al.*, 2014; Evidente *et al.*, 2014).

En comparación con los fármacos sintéticos, los productos naturales suelen ser más complejos químicamente debido a la presencia de centros quirales, heteroátomos (O, N, S, etc.) y sistemas de anillos policíclicos. Como consecuencia de esta complejidad estructural, los productos naturales son en ocasiones más selectivos hacia diversos blancos terapéuticos que los fármacos sintéticos (Basmadjian *et al.*, 2014). Recientemente, el descubrimiento de nuevos productos naturales o NEQs ha disminuido debido principalmente al avance en las técnicas sintéticas combinatoriales, además del desarrollo de nuevos anticuerpos monoclonales. A pesar de esto, los productos naturales continúan siendo fuentes valiosas de productos novedosos y complejos químicamente que sirven de inspiración para el desarrollo de nuevos agentes contra el cáncer y otras enfermedades (Bailly, 2009).

A pesar de que a partir de organismos fúngicos no se ha obtenido a la fecha ninguna molécula líder o agente terapéutico contra el cáncer, estos microorganismos producen diversos metabolitos pertenecientes a diversas clases estructurales que incluyen compuestos aromáticos, aminoácidos, antracenonas, butanólidos, butenólidos, citocalasanos, macrólidos, naftalenonas, pironas, terpenos, etc. (Evidente *et al.*, 2014), y

que podrían ser de gran interés en la actualidad para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con posible actividad anticancerígena.

## **2. HIPÓTESIS**

2.1 Las especies fúngicas aisladas a partir de hábitats inexplorados representan candidatos idóneos para la obtención de moléculas bioactivas novedosas.

2.2 Los organismos endófitos poseen la capacidad de biosintetizar diferentes tipos de moléculas en beneficio de su anfitrión vegetal, por lo que su asociación es indispensable para la vida de ambas especies.

2.3 Las pruebas de citotoxicidad y estudios de derreplicación representan ensayos de monitoreo adecuados que permitirán la selección de las especies fúngicas capaces de producir metabolitos secundarios novedosos con actividad citotóxica.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se generó como parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios biodinámicos de origen fúngico, con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevas moléculas bioactivas que sirven como prototipos de nuevos fármacos con actividad anticancerígena y/o antiproliferativa de utilidad para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, además de enriquecer el conocimiento de la diversidad microbiana que existe en nuestro país.

Así, el objetivo general del presente trabajo es realizar el aislamiento de metabolitos biodinámicos novedosos a partir de especies fúngicas selectas con actividad citotóxica. Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Realizar el aislamiento de hongos endófitos a partir de fuentes vegetales selectas.
- 2.- Obtener los cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos aislados.
- 3.- Preparar los cultivos en pequeña escala de todas las especies con la finalidad de obtener los extractos orgánicos correspondientes mediante técnicas de maceración y partición.
- 4.- Realizar la evaluación de citotoxicidad y los estudios de derreplicación de cada uno de los extractos orgánicos.
- 5.- Realizar la identificación molecular de los organismos de estudio.
- 6.- Preparar los cultivos en mediana escala de las especies seleccionadas con base en los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas y análisis de derreplicación.
- 7.- Realizar el fraccionamiento preliminar de al menos uno de los extractos activos mediante técnicas cromatográficas convencionales.
- 8.- Realizar el aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en una de las especies objeto de estudio, utilizando técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia.



## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

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

El aislamiento de las especies fúngicas endófitas, se realizó a partir de hojas asintomáticas de la planta epífita identificada como *Tillandsia* sp. (Bromeliaceae), (19°19'24" N; 99°10'39" O) colectadas en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Para cada muestra recolectada se realizó un proceso de limpieza superficial con agua con el objetivo de retirar residuos de tierra, sustancias extrañas o microorganismos que pudieran alterar la integridad del material recolectado. Posteriormente, las muestras se dividieron en fragmentos pequeños (1-2 mm<sup>2</sup>), los cuales fueron esterilizados mediante lavados sucesivos con soluciones de etanol al 95% (10 segundos), hipoclorito de sodio al 70% (2 min) y finalmente con una solución de etanol al 70% (2 min). Todas las muestras se mantuvieron en condiciones de esterilidad previa a su inoculación en los medios de crecimiento adecuados. El crecimiento de los microorganismos se realizó en tubos de reacción Eppendorf (1.5 mL) conteniendo medio de agar papa dextrosa (PDA) o de extracto de malta (MEA), colocando un fragmento de muestra en cada tubo (10 tubos de cada medio por muestra). Una vez detectado algún crecimiento, proceso que tardó entre 7 y 30 días, se transfirió el micelio de las diferentes colonias en condiciones estériles a cajas de Petri con medio PDA.

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

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

El cultivo en mediana escala para el microorganismo seleccionado fue realizado siguiendo la estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior, utilizando los inóculos preparados en medio líquido YESD, y 75 g de arroz/150 mL de agua de medio sólido (10×) ó 450 g de arroz/900 mL de agua (30×). Los procesos de fermentación se realizaron durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-oscuridad 12/12 horas.

### **4.3 Preparación de los extractos orgánicos**

La preparación de los extractos orgánicos en pequeña y/o mediana escala se realizó a partir de cada cultivo sólido (inciso 4.2), mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente con agitación constante (100 rpm) durante 24 horas, empleando como disolvente de extracción una mezcla de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (1:1) [90 mL para los cultivos en pequeña escala, 150 mL y 900 mL para los cultivos en mediana escala 10× y 30×, respectivamente]. Transcurrido este tiempo de extracción, al extracto obtenido se le adicionaron 60 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 40 mL de  $\text{CHCl}_3$  para los cultivos en pequeña escala, y 90 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 60 mL de  $\text{CHCl}_3$  (10×) ó 1800 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  y 1200 mL de  $\text{CHCl}_3$  (30×) para los cultivos en mediana escala. El extracto se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos. Enseguida se separó la fase orgánica de la fase acuosa, y esta última se sometió a un proceso de extracción con  $\text{CHCl}_3$  (20 y 40 ó 240 mL para los cultivos en pequeña escala y mediana escala 10× y 30×, respectivamente). La fase orgánica obtenida de esta última extracción se llevó a sequedad a presión reducida. Posteriormente, ésta fracción fue resuspendida en una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) [60 mL y 120 mL ó 600 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala 10× y 30×, respectivamente] y se sometió a un proceso de desgrase con hexano (60 mL y 120 mL ó 600 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala 10× y 30×, respectivamente), la fracción de hexano se descartó y la fracción orgánica resultante se evaporó a sequedad a presión reducida.

#### 4.4 Estudios de derreplicación

Los estudios de derreplicación se realizaron utilizando a la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS) (El-Elimat *et al.*, 2013). Para la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) se utilizó un cromatógrafo marca Waters (Waters Corp., MA, EEUU) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA), el control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información fueron realizados utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). Todos los análisis se registraron a una temperatura de 40°C, empleando una columna Acquity BEH C<sub>18</sub> (Waters Co., MO, EEUU; 1.7 µm, 2.1 × 10 mm). La elución se realizó con una mezcla binaria constituida por MeCN (**A**)-ácido fórmico 0.1% (**B**), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15% **A** e incrementando la composición hasta 100% **A** durante 8 minutos, manteniendo una composición isocrática por 1.5 min y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 minutos. La detección se realizó mediante un barrido desde 200 hasta 500 nm con una resolución de 4 nm.

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

## 4.5 Ensayo de citotoxicidad

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

**4.5.1 Cultivo y suspensión de las líneas celulares:** Todas las líneas celulares fueron conservadas en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%), y se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 100% de humedad relativa, hasta obtener células en fase logarítmica de crecimiento. Enseguida, 24 horas previas al ensayo se realizó el cambio de medio de cultivo, mediante el lavado de las células con 5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), posterior a este lavado se adicionaron 0.3 mL de tripsina, para desprender a las células de la caja de crecimiento y se incubó durante 5 minutos, transcurrido este tiempo de incubación, se analizó en el microscopio que las células se hubieran desprendido por completo, y se adicionaron 2 mL de medio RPMI 1640 y se homogenizó la suspensión. Finalmente, se realizó un conteo de las células en una cámara de Neubauer hasta obtener una suspensión de aproximadamente 10<sup>4</sup>.

**4.5.2 Procedimiento:** el ensayo se realizó en placas de poliestireno para cultivo celular de 96 pozos (250 µL de capacidad) con una suspensión de células de aproximadamente 10<sup>4</sup>. Para cada muestra a evaluar se prepararon dos diferentes concentraciones (2 y 20 µg/mL en DMSO al 10%). A continuación, se transfirieron a cada pozo 190 µL de la suspensión de células y 40 µL de las muestras de prueba a las concentraciones indicadas. Posteriormente, las cajas se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% y 100% de humedad relativa. Al cabo del periodo de incubación, se realizó una fijación celular mediante la adición 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) e incubando la placa durante 30 min a 4°C. Al término de la incubación, se decantó el TCA y se realizaron tres lavados sucesivos con agua y enseguida se secó la placa a temperatura ambiente, posteriormente a cada pozo, se le adicionaron 100 µL de una solución en MeOH del colorante sulforodamida B (0.4%); enseguida se incubó por

segunda vez la placa a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se eliminó el exceso de colorante lavando la placa con una solución de ácido acético al 1%, finalmente, se secó la placa y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 564 nm, adicionando 200  $\mu$ L de una solución de tris-hidroximetil-aminoetano (TRIS) (10 mM). Como control positivo se utilizó vinblastina (2  $\mu$ g/mL) y como control negativo el disolvente DMSO. Finalmente, el porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó mediante la siguiente expresión matemática:

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

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

#### 4.6 Fraccionamiento primario del extracto orgánico P11-7 (10 $\times$ )

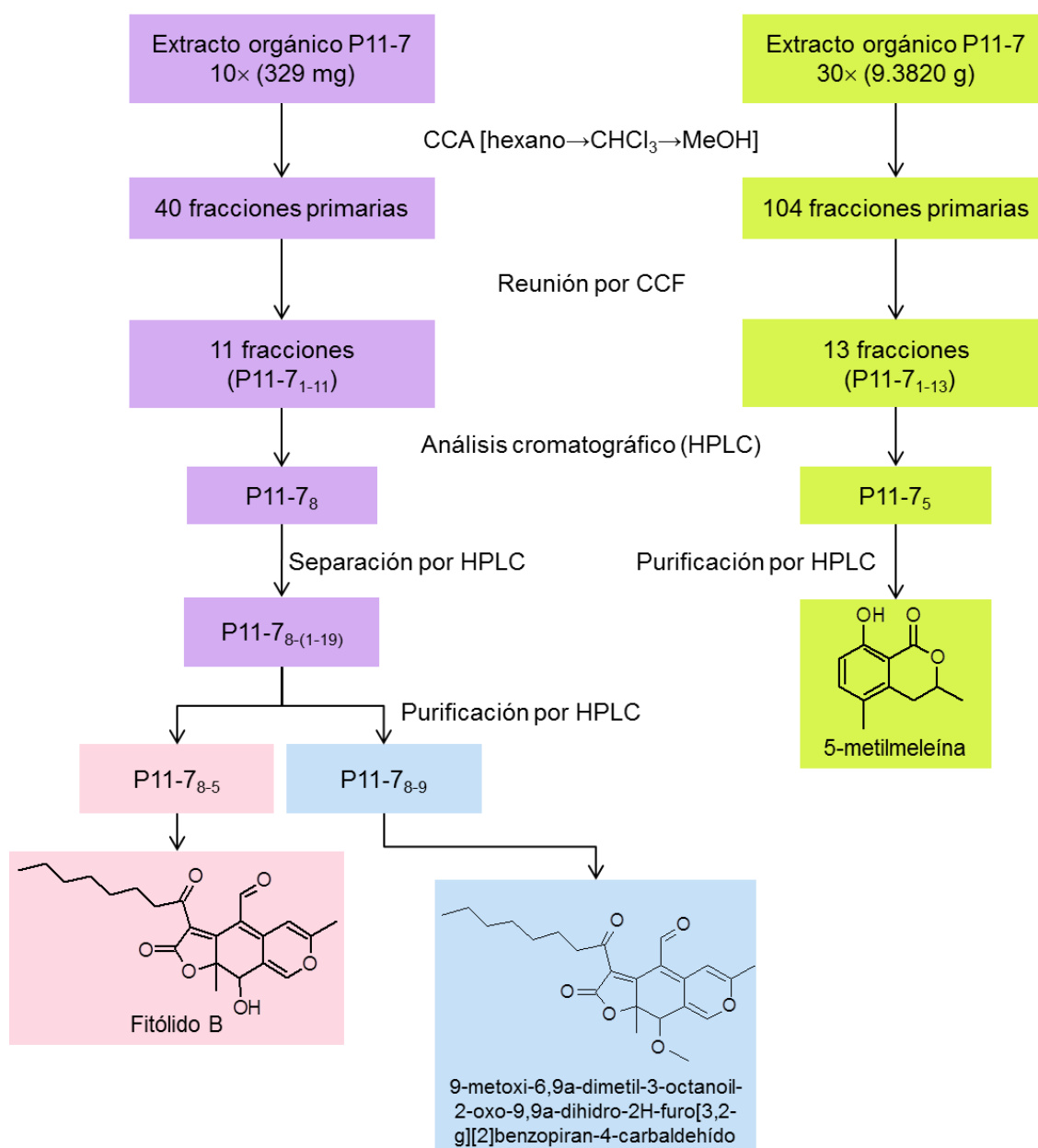
El proceso de fraccionamiento y purificación se resume en la **Figura 4**. El fraccionamiento primario del extracto orgánico P11-7 (10 $\times$ , 329 mg) se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) empacada con 80 g de gel de sílice 60 (tamaño de partícula 10-12  $\mu$ m, Merck Corp. NJ, EEUU). Como fase móvil se utilizaron hexano, mezclas de hexano-CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-MeOH y MeOH en orden creciente de polaridad (**Cuadro 2**), obteniéndose un total de 40 fracciones primarias, de 80 mL cada una, que fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en un conjunto de 11 fracciones (P11-7<sub>1</sub>-P11-7<sub>11</sub>).

#### 4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en la fracción P11-7<sub>8</sub>

Con la finalidad de analizar la complejidad de cada una de las fracciones primarias (inciso 4.6), se realizó un análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con un detector PDA y otro de dispersión de luz evaporativo (ELSD); éste último con las siguientes condiciones: ganancia 100; presión de gas 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y

temperatura del tubo  $50^{\circ}\text{C} \pm 25^{\circ}\text{C}$ . El control del equipo, el procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). El análisis de las muestras se llevó a cabo en una columna Phenomenex Gemini  $\text{C}_{18}$  ( $5\ \mu\text{m}$ ,  $250 \times 4.6\ \text{mm}$ ); fase móvil: MeCN **(A)** y ácido fórmico en agua (0.1%) **(B)**; gradiente: 40%  $\rightarrow$  100% **(A)**; tiempo de corrida: 30 min; flujo: 1 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm **(Figura 5)**.

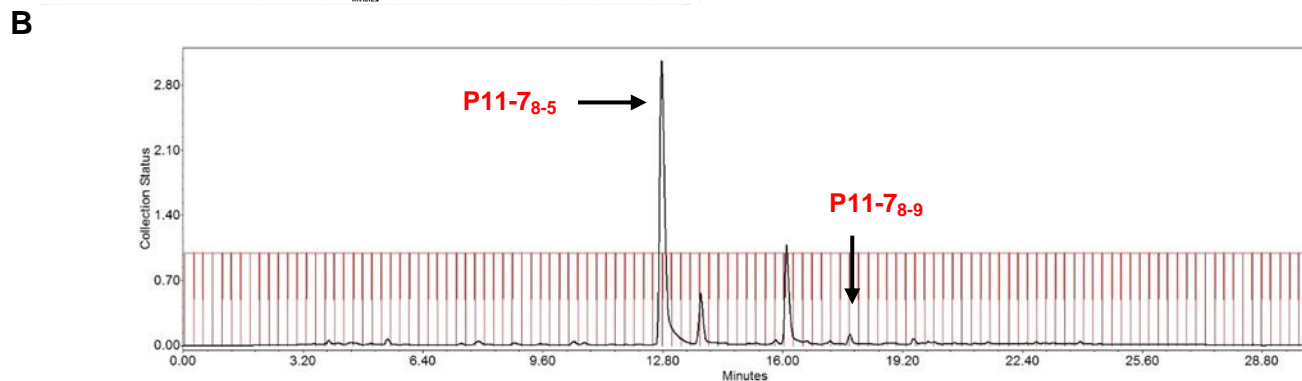
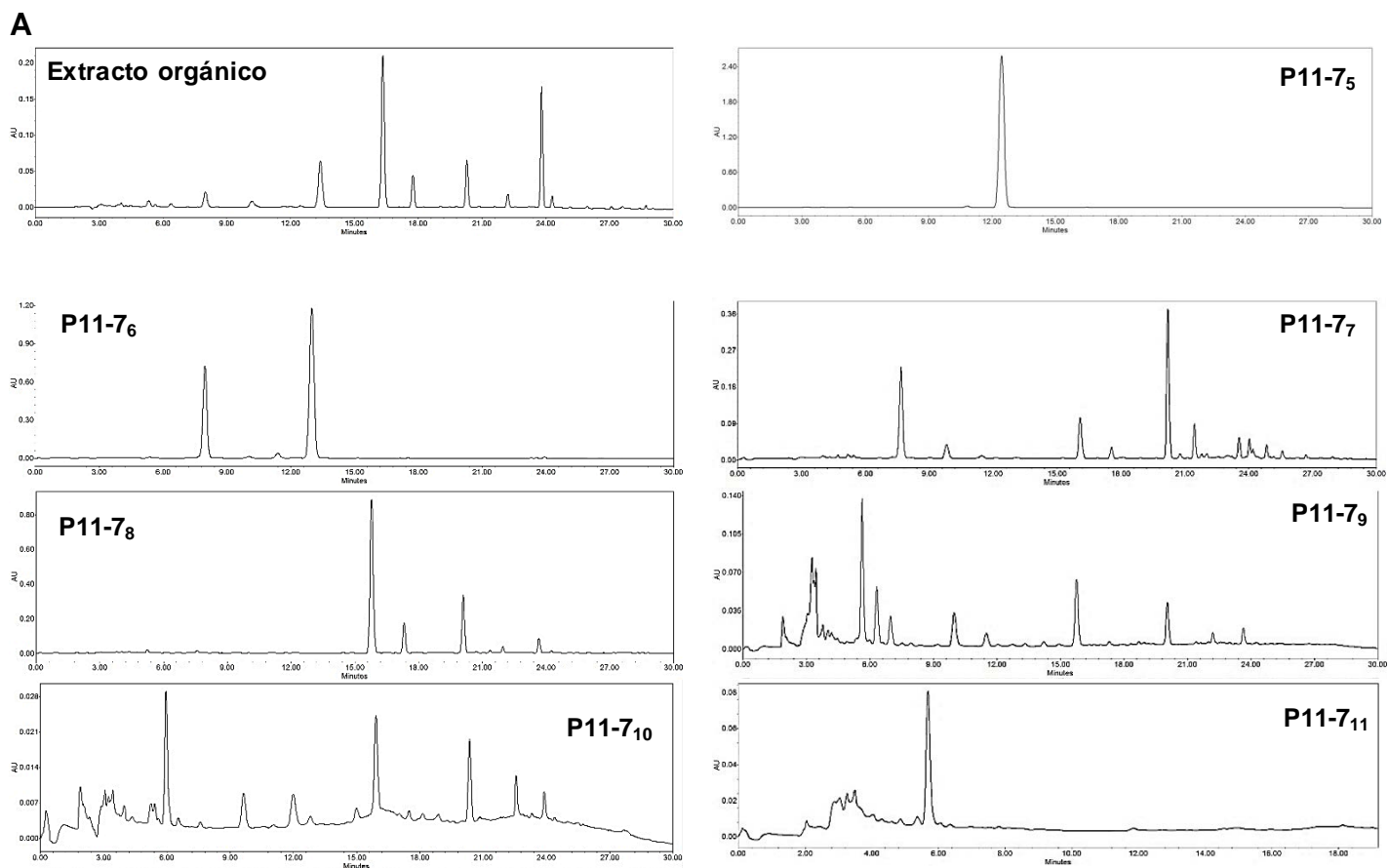
#### Fraccionamiento primario extracto orgánico P11-7



**Figura 4.** Diagrama de flujo de los procesos de fraccionamiento y purificación de P11-7.

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

La separación de los compuestos presentes en la fracción primaria P11-7<sub>8</sub> (215.8 mg), se realizó mediante el escalamiento de las condiciones de análisis utilizadas a nivel analítico en una columna preparativa Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico en agua (1%) (**A**) y MeCN (**B**); gradiente: 40% → 100% (**B**); tiempo de corrida: 30 min; flujo: 19 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm; tiempo de recolección: 15 segundos (**Cuadro 3, Figura 5**).

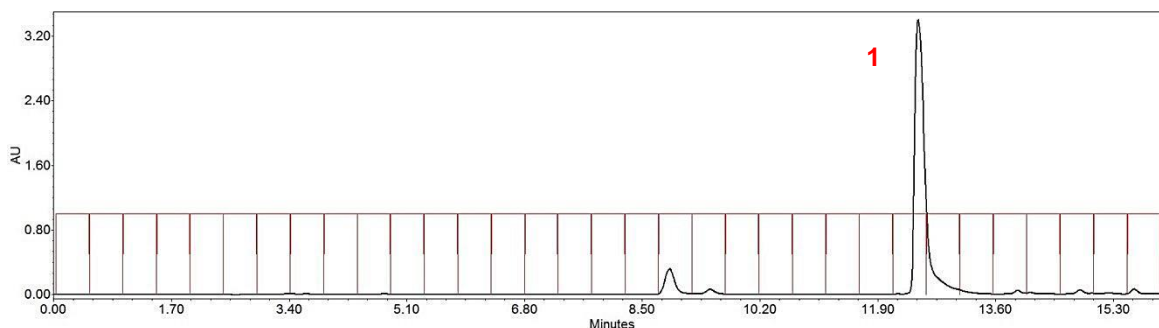


**Figura 5.** (A) Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico P11-7 (10×) y (B) fraccionamiento secundario de la fracción P11-7<sub>8</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.

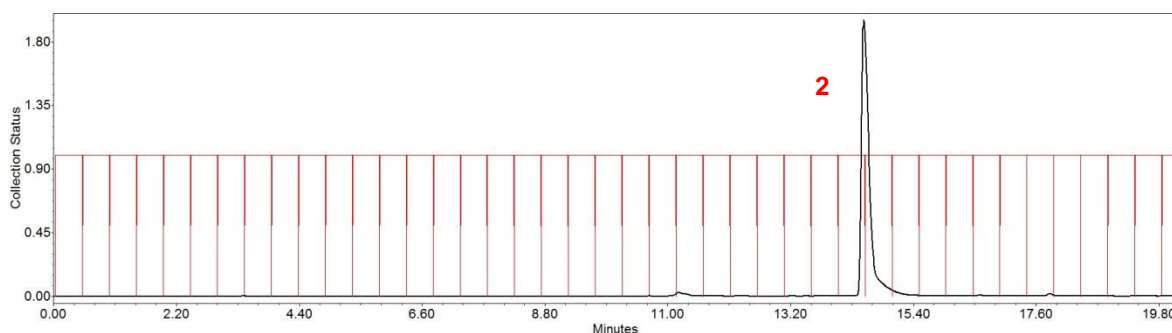


<b>Cuadro 3.</b> Fraccionamiento secundario de la fracción <b>P11-7<sub>8</sub></b> por HPLC a nivel preparativo.			
<b>Fracción</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Fracción</b>	<b>Peso (mg)</b>
P11-7 <sub>8-1</sub>	1.7	P11-7 <sub>8-11</sub>	2.1
P11-7 <sub>8-2</sub>	2.3	P11-7 <sub>8-12</sub>	5.3
P11-7 <sub>8-3</sub>	1.1	P11-7 <sub>8-13</sub>	1.0
P11-7 <sub>8-4</sub>	1.2	P11-7 <sub>8-14</sub>	1.0
P11-7 <sub>8-5</sub>	58.9	P11-7 <sub>8-15</sub>	2.4
P11-7 <sub>8-6</sub>	21.4	P11-7 <sub>8-16</sub>	20.9
P11-7 <sub>8-7</sub>	2.6	P11-7 <sub>8-17</sub>	2.4
P11-7 <sub>8-8</sub>	1.5	P11-7 <sub>8-18</sub>	2.7
P11-7 <sub>8-9</sub>	19.2	P11-7 <sub>8-19</sub>	1.3
P11-7 <sub>8-10</sub>	1.1		

La purificación de los compuestos de interés presentes en las fracciones secundarias P11-7<sub>8-5</sub> (58.9 mg) y P11-7<sub>8-9</sub> (19.2 mg), se realizó mediante HPLC, empleando las siguientes condiciones de análisis: columna preparativa Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico en agua (1%) (**A**) y MeCN (**B**); gradiente: 50% → 100% (**B**); tiempo de corrida: 16 y/o 20 min; flujo: 21.24 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm; tiempo de recolección: 15 segundos. Este procedimiento permitió el aislamiento del **fitólido B (1)**; (*t<sub>R</sub>*: 12.55 min, 33.6 mg) de la fracción P11-7<sub>8-5</sub> (**Figura 6**); así como del **9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (2)**; (*t<sub>R</sub>*: 14.61 min, 10.4 mg) a partir de la fracción P11-7<sub>8-9</sub> (**Figura 7**).



**Figura 6.** Fraccionamiento secundario de la fracción P11-7<sub>8-5</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.



**Figura 7.** Fraccionamiento secundario de la fracción P11-7<sub>8-9</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.

#### 4.8 Fraccionamiento primario del extracto orgánico P11-7 (30×)

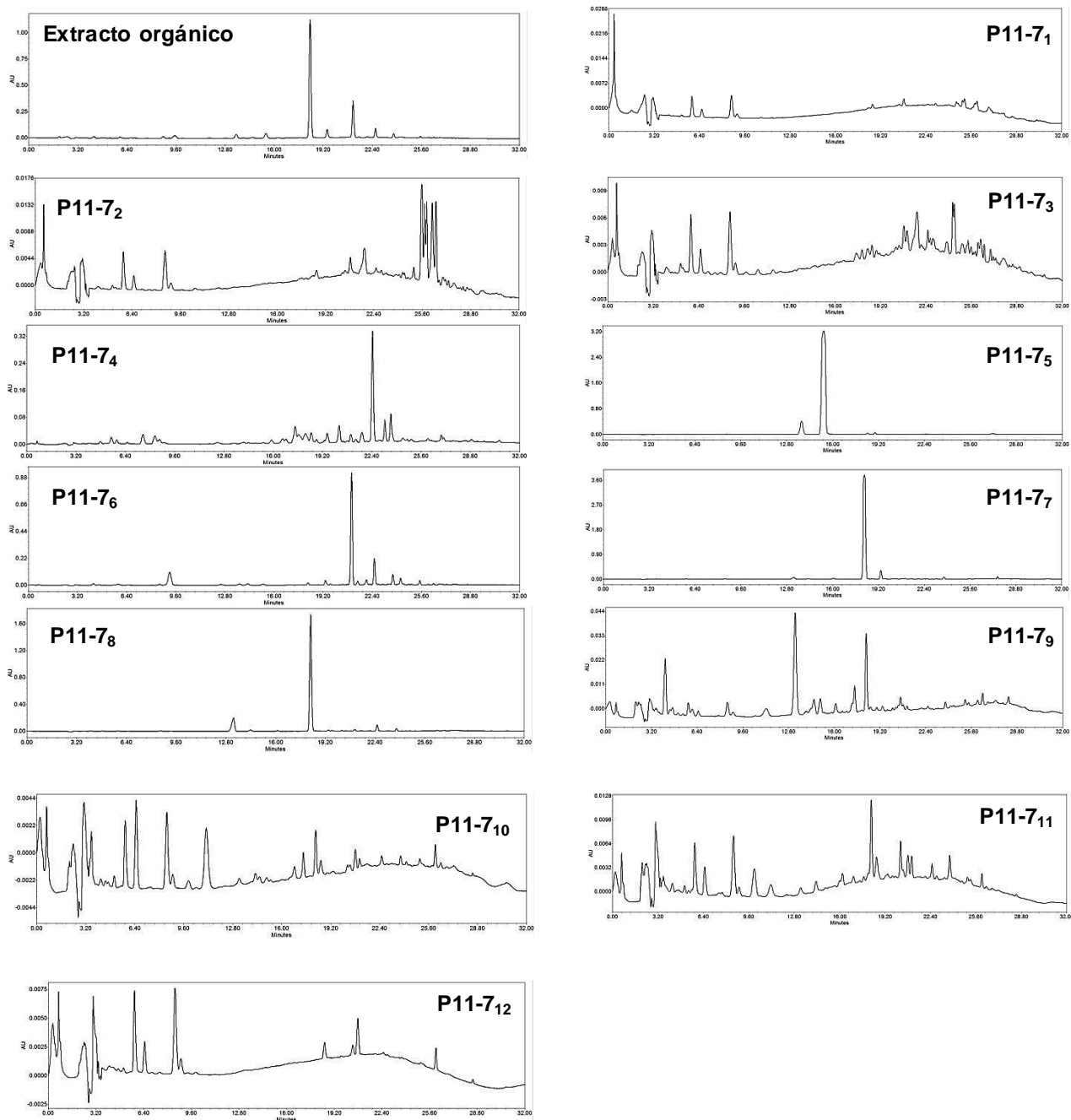
El fraccionamiento primario del extracto orgánico P11-7 (30×, 9.3820 g) se llevó a cabo mediante una CCA empacada con 750 g de gel de sílice 60 (tamaño de partícula 10-12  $\mu\text{m}$ , Merck Corp. NJ, EEUU). Como fase móvil se utilizaron hexano, mezclas de hexano- $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH y MeOH en orden creciente de polaridad (**Cuadro 4**). Éste proceso generó un conjunto de 13 fracciones (P11-7<sub>1</sub>-P11-7<sub>13</sub>) reunidas con base en su similitud cromatográfica.

#### 4.9 Aislamiento y purificación de los metabolitos presentes en la fracción P11-7<sub>5</sub>

Con la finalidad de analizar la complejidad de cada una de las fracciones obtenidas a partir del fraccionamiento indicado en el inciso anterior, se realizó un análisis por HPLC utilizando las mismas condiciones analíticas descritas en el inciso **4.7** de esta sección (**Cuadro 4, Figura 8**).

**Cuadro 4.** Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto **P11-7** (30×).

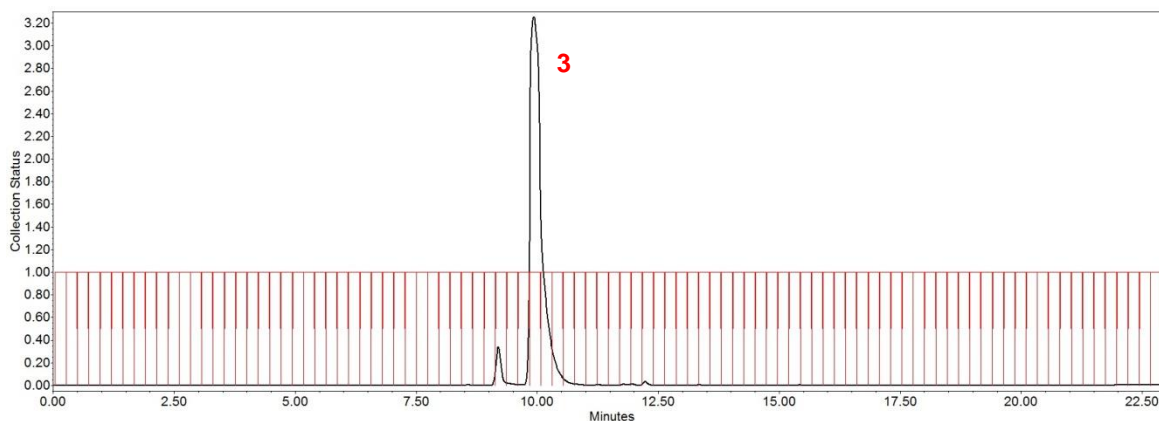
<b>Sistema de elución</b>	<b>Fracciones</b>	<b>Clave/Peso (mg)</b>
Hexano	1-12	P11-7 <sub>1</sub> / 29.5
Hex-CHCl <sub>3</sub> (9:1)		
Hex-CHCl <sub>3</sub> (8:2)	13-24	P11-7 <sub>2</sub> / 17.8
Hex-CHCl <sub>3</sub> (7:3)		
Hex-CHCl <sub>3</sub> (6:4)	25-30	P11-7 <sub>3</sub> / 9.1
Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:1)		
Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:1)	31-36	P11-7 <sub>4</sub> / 3.2
Hex-CHCl <sub>3</sub> (4:6)	27-44	P11-7 <sub>5</sub> / 237.1
Hex-CHCl <sub>3</sub> (3:7)	45-49	P11-7 <sub>6</sub> / 2983.5
Hex-CHCl <sub>3</sub> (3:7)	50-55	P11-7 <sub>7</sub> / 4649.1
Hex-CHCl <sub>3</sub> (2:8)		
Hex-CHCl <sub>3</sub> (2:8)	56-67	P11-7 <sub>8</sub> / 442.4
CHCl <sub>3</sub>		
CHCl <sub>3</sub>	68-70	P11-7 <sub>9</sub> / 1190.2
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (9:1)		
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (9:1)	71-76	P11-7 <sub>10</sub> / 365.2
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (8:2)	71-76	P11-7 <sub>10</sub> / 365.2
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (8:2)	77-88	P11-7 <sub>11</sub> / 484.6
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (6:4)		
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (6:4)	89-104	P11-7 <sub>12</sub> / 335.8
MeOH		
CHCl <sub>3</sub> -MeOH (6:4)	89-104	P11-7 <sub>13</sub> (445.3)
MeOH		



**Figura 8.** Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico P11-7 (30×).

La resolución cromatográfica de la fracción P11-7<sub>5</sub> (237.1 mg), permitió identificar la presencia de un componente mayoritario. La purificación de éste producto se realizó mediante el escalamiento utilizando las mismas condiciones de análisis indicadas a nivel analítico en una columna preparativa Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 21.2 mm); fase móvil: ácido fórmico en agua (1%) (A) y MeCN (B); gradiente: 40% → 100% (B);

tiempo de corrida: 30 min; flujo: 21.24 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm: tiempo de recolección: 15 segundos (**Figura 9**). Este procedimiento permitió el aislamiento de un sólido cristalino blanco, identificado como la **5-metilmeleina (3)**;  $t_R$ : 9.94 min, 145.9 mg).



**Figura 9.** Fraccionamiento secundario de la fracción P11-7<sub>5</sub> mediante HPLC a nivel preparativo.

#### 4.10 Caracterización de los productos naturales

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de 300 MHz ( $^1\text{H}$ )/75 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) o 500 MHz ( $^1\text{H}$ )/125 MHz ( $^{13}\text{C}$ ) se registraron en los equipos Varian VNMRS o JEOL ECA 500, respectivamente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm con referencia al tetrametilsilano (TMS) utilizado como estándar interno. En todos los casos se utilizó  $\text{CDCl}_3$  como disolvente. Los espectros de masas por la técnica de ionización por electropray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI+ y ESI-, respectivamente) se registraron en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap XL. El registro de los espectros de RMN y EM se efectuó en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, así como en la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, NC, EEUU.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

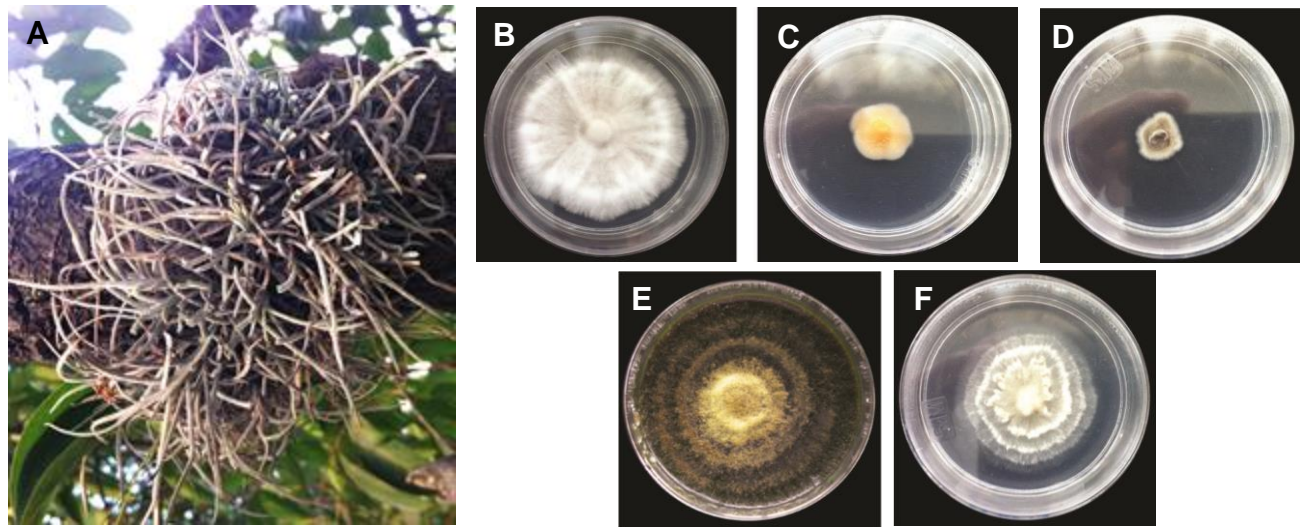
Los resultados presentados en ésta disertación se desarrollaron como parte de un proyecto enfocado en la búsqueda de metabolitos secundarios novedosos de origen fúngico, con actividad citotóxica importante. Así, con el desarrollo de esta investigación se pretende llevar a cabo el estudio químico y biológico de especies fúngicas aisladas a partir de diversos hábitats inexplorados de nuestro país, y para la realización del mismo, se planteó la siguiente estrategia experimental:

- 1.- Aislamiento de hongos microscópicos a partir de fuentes naturales de hábitats inexplorados.
- 2.- Obtención de los cultivos axénicos y preparación de los extractos orgánicos en pequeña escala de cada uno de los microorganismos aislados.
- 3.- Evaluación *in vitro* del potencial citotóxico de los extractos orgánicos sobre las líneas celulares humanas de adenocarcinoma colorrectal (HTC15) y cáncer cervicouterino (HeLA).
- 4.- Realización de los estudios de metabolómica con la finalidad de seleccionar a los candidatos adecuados para la obtención de metabolitos secundarios novedosos y/o no reportados en la base de datos utilizada.
- 5.- Realización del estudio químico de los extractos orgánicos (mediana escala 10× y 30×), de al menos una de las especies más activas utilizando procesos cromatográficos convencionales.
- 6.- Caracterización de la estructura molecular de los metabolitos aislados mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos.

A continuación se discutirá el seguimiento de la estrategia metodológica antes descrita en dos partes: en primer lugar se describe el aislamiento de los microorganismos fúngicos a partir de la fuente natural seleccionada y la evaluación del potencial citotóxico y estudios de derreplicación. En la segunda parte, se detallan todos los aspectos relacionados con la investigación química de la especie fúngica activa seleccionada.

## 5.1 Aislamiento de los organismos fúngicos a partir de la fuente vegetal

A partir de las muestras vegetales de la especie seleccionada e identificada como *Tillandsia* sp. (Bromeliaceae), colectada en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel (**Figura 10**) (19°19'24" N; 99°10'39" O), empleando las técnicas descritas con detalle en el inciso 4.1, se realizó el aislamiento axénico de 5 taxones fúngicos endófitos (**Tabla 2 y Figura 10**).



**Figura 10.** (A) *Tillandsia* sp. y (B-F) Especies fúngicas aisladas: códigos P11-2, P11-3, P11-6, P11-7 y P11-19, respectivamente.

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

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

Clave	Fuente de obtención	Rendimiento (mg)	Ensayo de citotoxicidad (% inhibición)				Estudio de derreplicación	Rendimiento 10× (mg)	Rendimiento 30× (g)
			HCT15		HeLA				
			2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL			
P11-2	<i>Tillandsia</i> sp.	98.5	109.4	108.8	107.9	106.9	-		
P11-3	<i>Tillandsia</i> sp.	42.1	108.2	106.8	131.6	121.9	-		
P11-6	<i>Tillandsia</i> sp.	85.3	111	102.4	116.5	109.9	-		
<b>P11-7</b>	<i>Tillandsia</i> sp.	63.2	123.4	<b>3.5</b>	120.3	<b>3.7</b>	Ácido secalónico G	329.7	9.382
P11-19	<i>Tillandsia</i> sp.	60.6	128.1	121.7	95.3	86.6	-		

Posteriormente, se realizaron los estudios de metabolómica utilizando UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, como se indica en el inciso **4.4** y siguiendo el procedimiento desarrollado por El-Elimat *et al.*, 2013 (**Tabla 2**). Finalmente, a partir del análisis detallado de los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de citotoxicidad y los estudios de derreplicación, se llevó a cabo la selección de la especie fúngica que presentó una actividad biológica significativa (porcentaje de inhibición del crecimiento celular mayor al 80% a la concentración de 20 µg/mL), y que no contenía a las micotoxinas reportadas en la base de datos utilizada con fines comparativos en los estudios de derreplicación (El-Elimat *et al.* 2013). Así, la especie endófito P11-7 fue la seleccionada para su estudio químico (**Tabla 2**), ya que fue capaz de abatir el crecimiento celular de HCT15 y HeLA con un porcentaje de inhibición mayor al 80% a la concentración de 20 µg/mL. Por otra parte, los estudios de metabolómica indicaron que esta especie produce el ácido secalónico G en muy baja concentración, por lo que éste organismo es un candidato idóneo para la búsqueda de nuevas moléculas con propiedades anticancerígenas.

Posteriormente, se realizó la identificación molecular del organismo P11-7 mediante el análisis del código de barras correspondiente a la región del ITS, encontrando una relación estrecha con las siguientes especies: *Biscogniauxia capnodes*, *B. cylindrospora*, *B. nummularia*, *B. latirima*, *B. philippinensis* var. *microspora* y *B. atropunctata*. El porcentaje de similitud entre las secuencias de P11-7 con las comparadas en el GenBank fue menor al 97% por lo que la especie se identificó como *Biscogniauxia* sp.



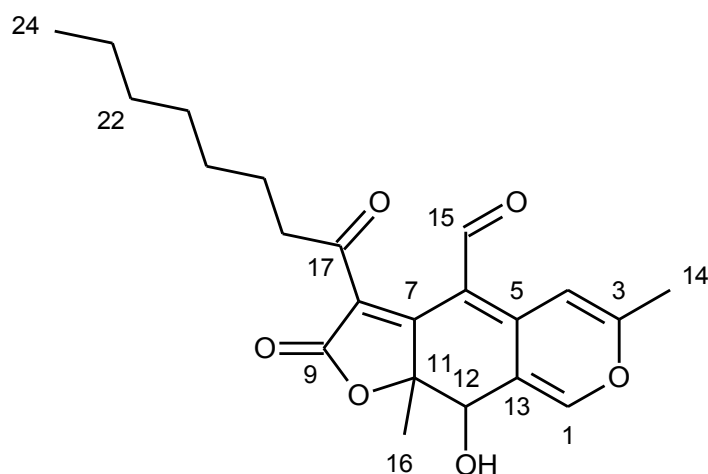
## 5.2 Estudio químico de la especie fúngica *Biscogniauxia* sp.

Con la finalidad de separar y purificar a los constituyentes presentes en la especie *Biscogniauxia* sp. (P11-7) seleccionada, se realizó el estudio químico de los extractos correspondientes en mediana escala (10× y 30×).

### 5.2.1 Estudio químico del extracto en mediana escala 10×

El fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala 10× (329.7 mg), empleando CCA y gel de sílice como fase estacionaria, como se indica en el punto 4.6, generó un conjunto de once fracciones primarias. A partir de los perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC de cada una de las fracciones primarias obtenidas (**Figura 5**), se seleccionó a la fracción P11-7<sub>8</sub> (215.8 mg) para la separación de sus componentes individuales debido a que es la fracción que presentó el mejor rendimiento y la menor complejidad cromatográfica. El fraccionamiento secundario se llevó a cabo mediante HPLC preparativo, en primer lugar para disminuir la complejidad de la muestra y, posteriormente, se llevó a cabo la purificación de los productos mayoritarios presentes en las fracciones P11-7<sub>8-5</sub> (58.9 mg) y P11-7<sub>8-9</sub> (19.2 mg) (inciso 4.7). Este procedimiento condujo al aislamiento del fitólido B (**1**) a partir de la fracción P11-7<sub>8-5</sub> y el derivado metilado de **1** designado como el 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopirán-4-carbaldehído (**2**) de la fracción P11-7<sub>8-9</sub>. De manera general, la elucidación de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales, y se describe brevemente a continuación.

### 5.2.1.1 Caracterización del fitólido B (1)



**Figura 11.** Fitólido B (1)

El producto **1** se aisló como un compuesto oleoso rojizo. Los análisis por LC-HRESIMS permitieron determinar la fórmula molecular del compuesto como  $C_{22}H_{26}O_6$  (386 uma) la cual permite 13 grados de insaturación (**Figura 11**). El análisis detallado de los espectros en el UV y de RMN (**Tabla 3**; **Figuras 12** y **13**) del compuesto **1** presentaron el perfil característico de un núcleo azafilona de tipo bulgarialactona, la cual se caracteriza por presentar una cadena alifática en C-8 y un anillo de  $\gamma$ -lactona lineal al núcleo de azafilona (Gao *et al.*, 2013), además de encontrarse sustituida en las posiciones 6, 12, 14 y 16 del núcleo base. Las evidencias más importantes observadas en los espectros de RMN se describen a continuación:

a) En  $\delta_H$  8.02 (s), 7.74 (s) y 4.46 (s) se observan tres señales asignables a los protones del núcleo de azafilona (H-1, H-4 y H-12, respectivamente), en donde los desplazamientos observados para H-1 y H-4 son típicos de protones aromáticos, y H-12 es una señal característica de un metino vecino a un heteroátomo (O). En el espectro de  $^{13}C$  RMN las señales para este núcleo aparecen en  $\delta_C$  153.1 (C-1), 164.5 (C-3), 107.8 (C-4), 144.4 (C-5), 107.1 (C-6), 167.0 (C-7), 117.4 (C-8), 171.0 (C-9), 83.1 (C-11), 68.6 (C-12) y 119.7 (C-13).

b) En  $\delta_H$  2.37(s) y 1.41 (s) se observan dos señales asignables a dos metilos (H-14 y H-16, respectivamente). En  $\delta_H$  9.72 (s) se observa una señal atribuida a un grupo funcional

aldehído, correspondiente a H-15. De la misma forma, las señales correspondientes en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN se observan en un  $\delta_{\text{C}}$  20.2 (C-14), 186.8 (C-15) y 22.3 (C-16).

c) Finalmente se observan las señales atribuidas a la cadena alifática presente en  $\delta_{\text{H}}$  2.97 (t,  $J=7.5$  Hz), 1.62 (m), 1.29 (m) y 0.87 (t,  $J=6.5$  Hz) que corresponden con H-18, H-19, H-20-23 y H-24, respectivamente. Este conjunto de señales se asignó con base en las correlaciones COSY observadas entre los protones vecinos (**Figura 14**). A su vez, se observan los conjuntos de señales asignados para la cadena alifática en el espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN en  $\delta_{\text{C}}$  198.8 (C-17), que es una señal diagnóstica para un carbono de carbonilo que puede tautomerizarse, además de las señales en 42.4 (C-18), 23.6 (C-19), 29.1 (C-20 y -21) 31.7 (C-22), 22.6 (C-23) y 14.1 (C-24).

El conjunto de señales recién descrito, aunado con el análisis detallado de los desplazamientos químicos reportados en la literatura para el compuesto **1**, se encuentran en perfecta armonía, permitiendo establecer y caracterizar a este producto con el nombre trivial de fitólido B (**1**). Éste compuesto fue descrito por primera vez como un metabolito secundario producido por un hongo del género *Pithomyces*, el cual fue aislado a partir del tunicado de mar *Oxycorynia fascicularis* (Wang *et al.*, 1997). Estos compuestos son clasificados como azafilonas, un conjunto interesante de metabolitos, los cuales se pueden encontrar clasificados como un pequeño grupo dentro de la amplia gama de policétidos producidos por hongos (Osmanova *et al.*, 2010). Las azafilonas por definición son una clase muy diversa estructuralmente de metabolitos secundarios, las cuales poseen esqueletos pirona-quinona generalmente designadas como isocromenos, que contienen un núcleo bicíclico poli-oxigenado y al menos un centro quiral cuaternario. Su nombre surgió como resultado de la afinidad de éstas estructuras por el amoniac; estos pigmentos reaccionan con los grupos amino de proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos para formar  $\gamma$ -piridonas vinílogas rojas o púrpuras debido al intercambio del oxígeno del pirano por un átomo de nitrógeno (Osmanova *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2013). En la última década se ha demostrado que las azafilonas poseen efectos no selectivos contra microorganismos y nematodos, así como actividades antifúngicas, antivirales, antioxidantes, citotóxicas y anti-inflamatorias (Osmanova *et al.*, 2010; Stadler *et al.*, 2007).

De acuerdo con la literatura, más de 170 diferentes tipos de azafilonas son producidos por 23 géneros de hongos (Gao *et al.*, 2013).

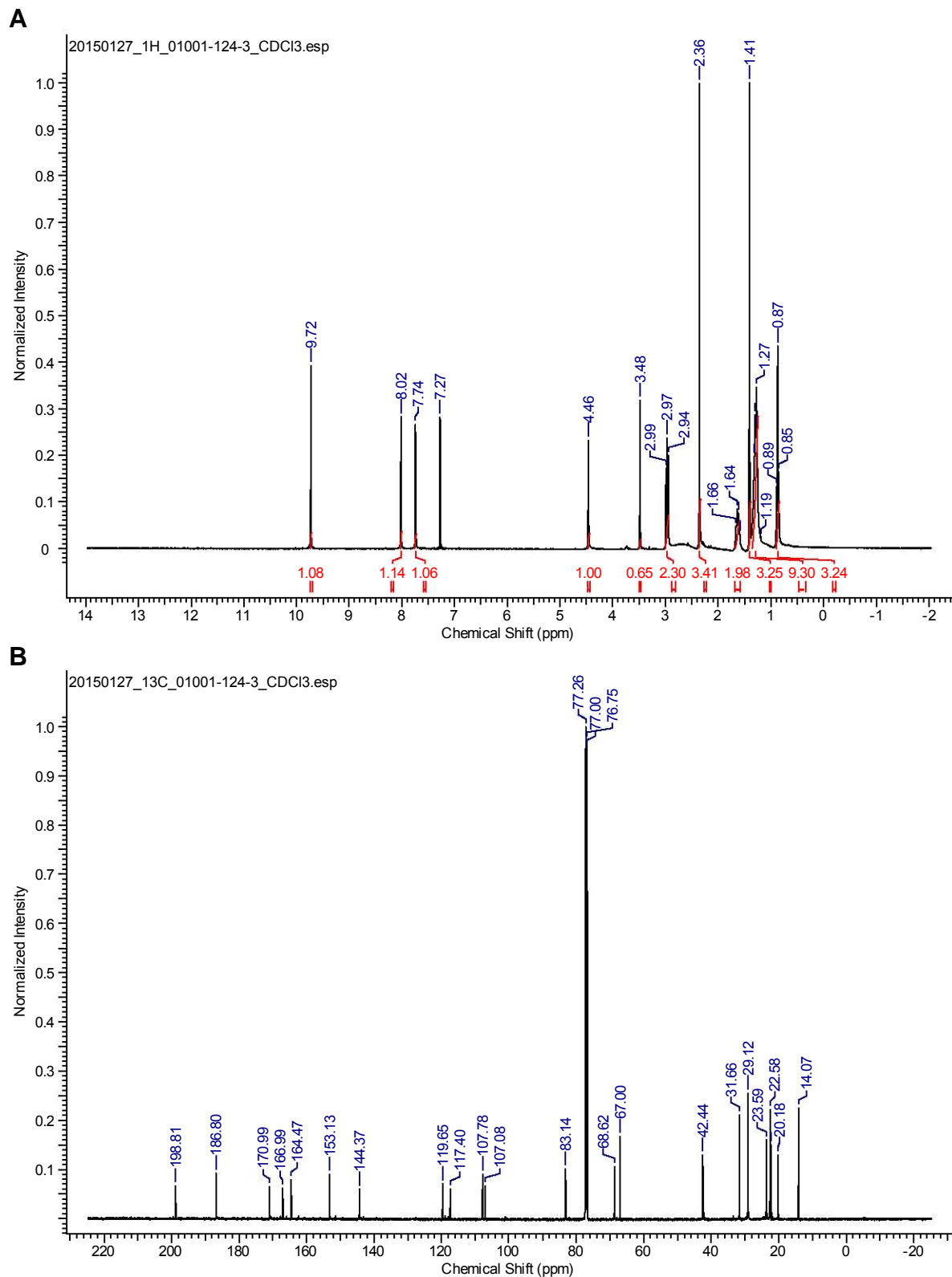
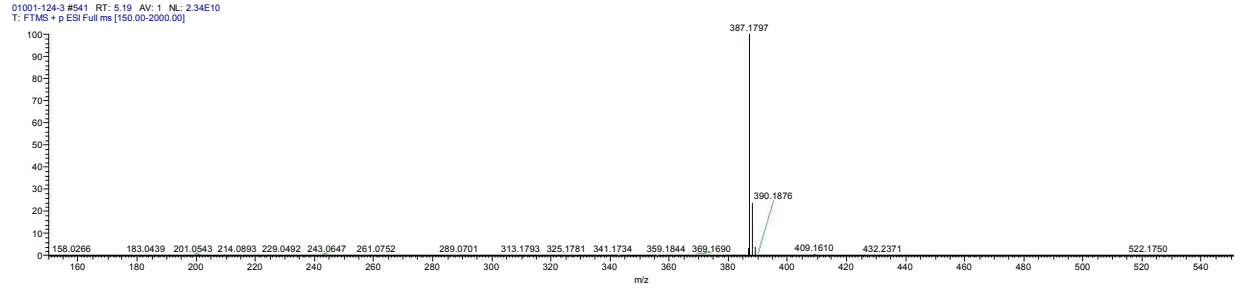
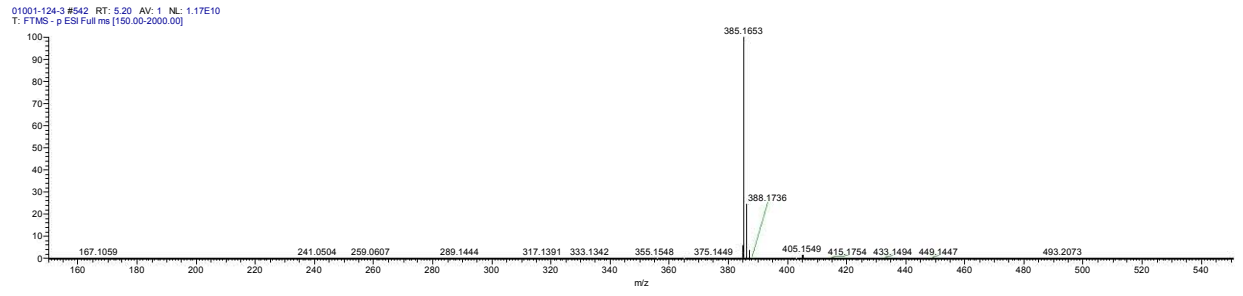
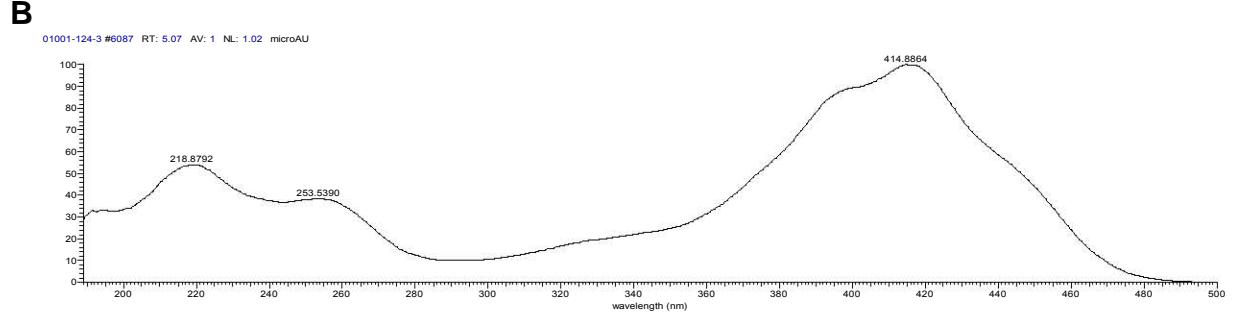
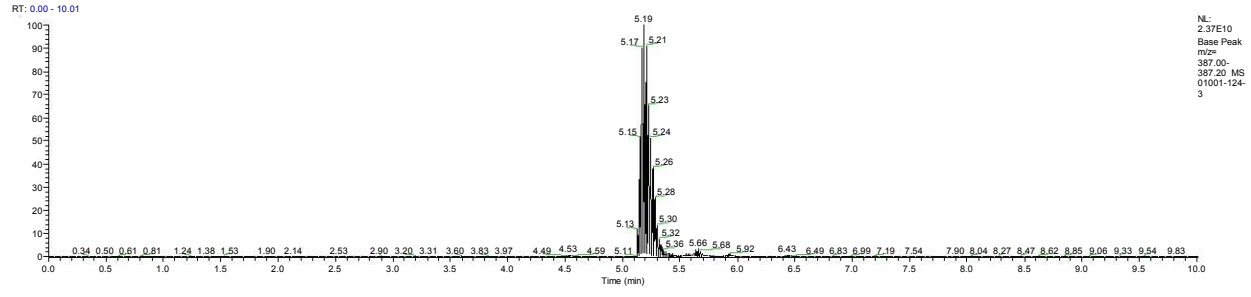
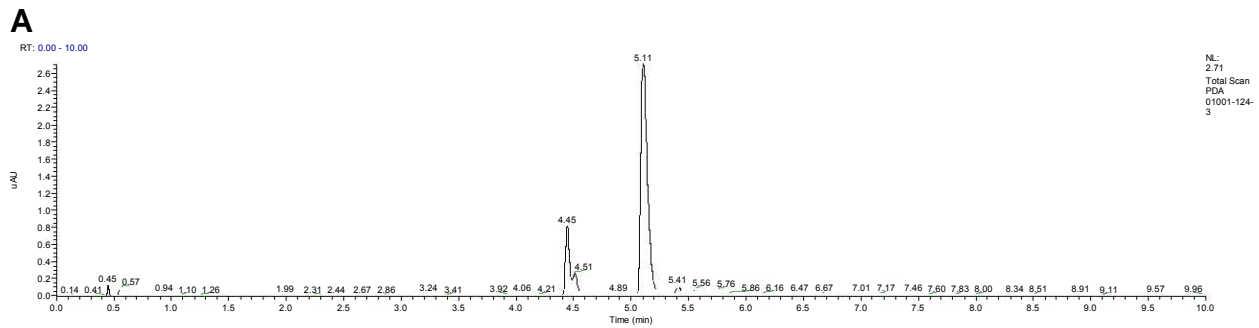


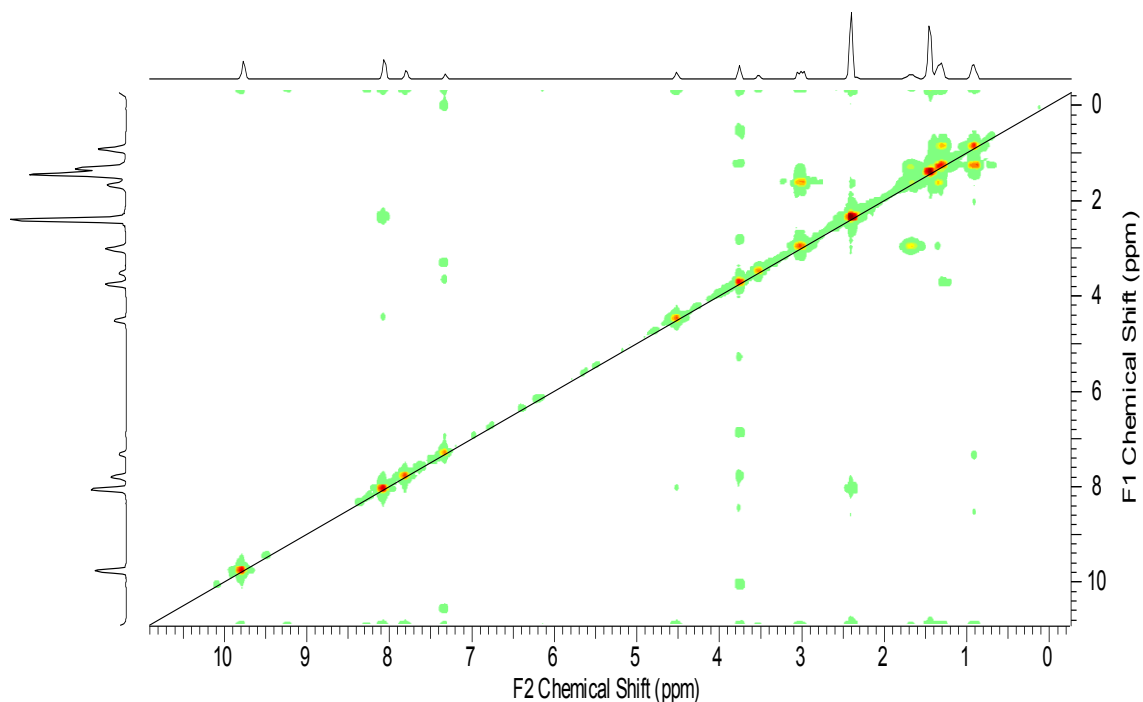
Figura 12. Espectros de (A)  $^1\text{H}$  RMN y (B)  $^{13}\text{C}$  RMN del fitólido B (1).



**Figura 13. (A)** Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) del fitólido B (1).

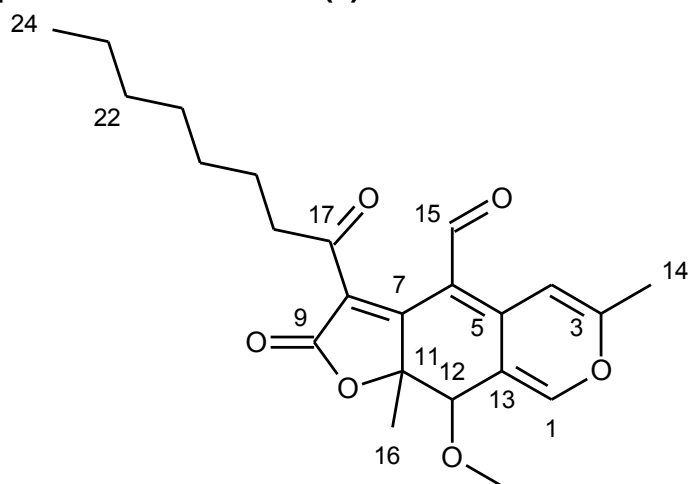
**Tabla 3.** Datos espectroscópicos de RMN ( $^1\text{H}$ , 300 MHz;  $^{13}\text{C}$  125 MHz;  $\delta$  en ppm;  $J$  en Hz) del fitólido B (**1**) y del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (**2**) en  $\text{CDCl}_3$ .

Posición	Fitólido B ( <b>1</b> )		9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído ( <b>2</b> )	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	8.02 (s)	153.1	8.08 (s)	150.6
3		164.5		163.8
4	7.74 (s)	107.8	7.57 (s)	108.2
5		144.4		142.9
6		107.1		108.1
7		167.0		167.2
8		117.4		117.6
9		171.0		170.5
11		83.1		81.8
12	4.46 (s)	68.6	3.34 (s)	67.1
13		119.7		110.8
14	2.37 (s)	20.2	2.34 (s)	20.1
15	9.72 (s)	186.8	9.75 (s)	187.4
16	1.41 (s)	22.3	1.43 (s)	22.5
17		198.8		198.3
18	2.97 (t, $J= 7.5$ Hz)	42.4	2.99 (m)	42.5
19	1.62 (m)	23.6	1.64 (m)	23.9
20	1.29 (m)	29.1	1.30 (m)	29.1
21		29.1		29.1
22		31.7		31.7
23		22.6		22.6
24	0.87 (t, $J= 6.5$ Hz)	14.1	0.87 (t, $J= 6\text{Hz}$ )	14.1
$\text{CH}_3\text{O-12}$			3.86 (s)	57.6



**Figura 14.** Espectro COSY del fitólido B (1).

### 5.2.1.2 Caracterización del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopirán-4-carbaldehído (2)



**Figura 15.** 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopirán-4-carbaldehído (2)

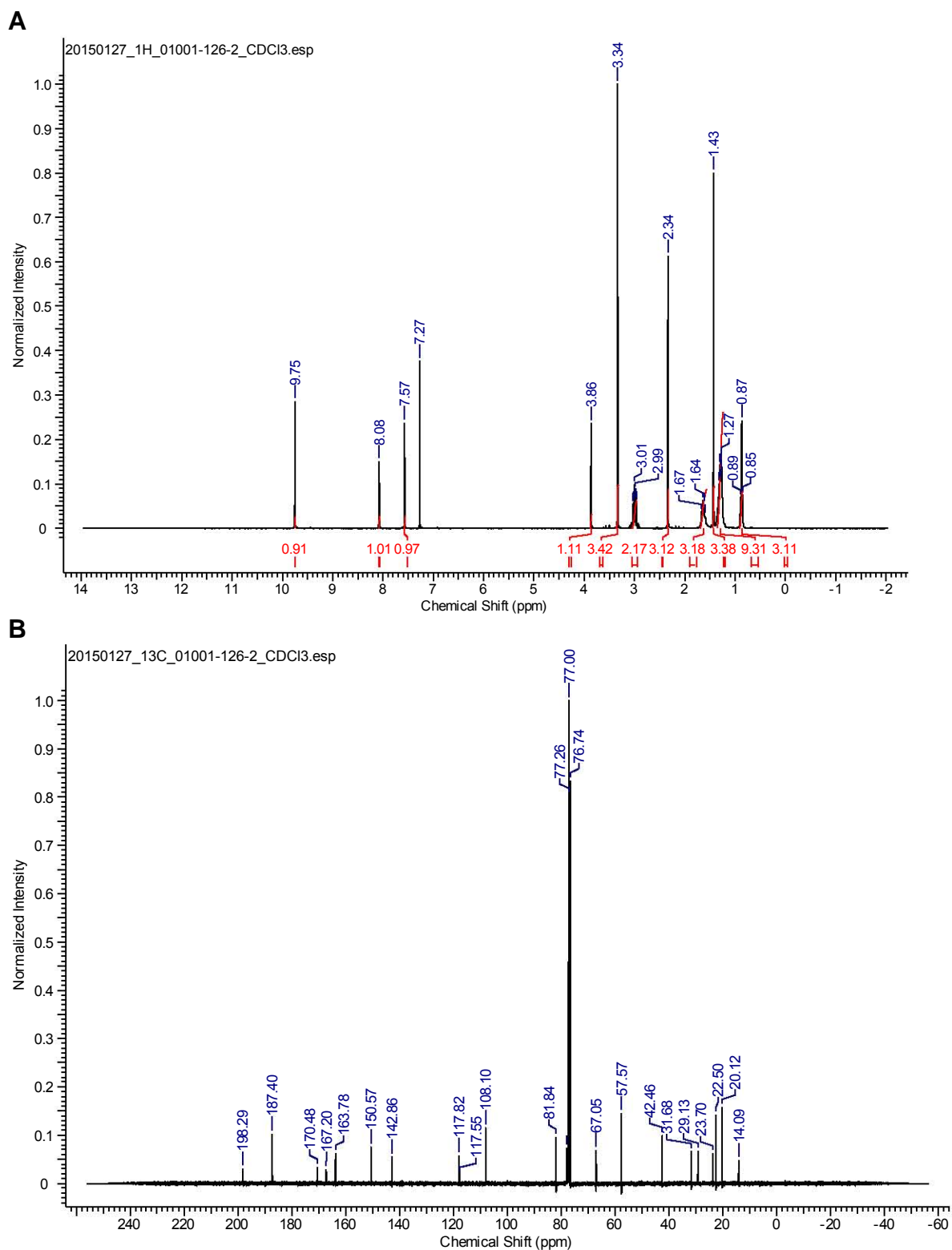
El ion molecular observado en el espectro de HRESIMS para el producto natural **2** corresponde con la fórmula  $C_{23}H_{28}O_6$  (400 uma) la cual permite 10 grados de insaturación, y fue aislado como un sólido amarillo (**Figura 15**). El análisis detallado de los espectros de RMN de los productos **1** y **2** (**Tabla 3**) permitió establecer que el producto **2** es el derivado

metilado del producto **1**, debido a la similitud en los desplazamientos químicos observados para ambos productos, y las principales diferencias observadas para el producto **2** se describen a continuación:

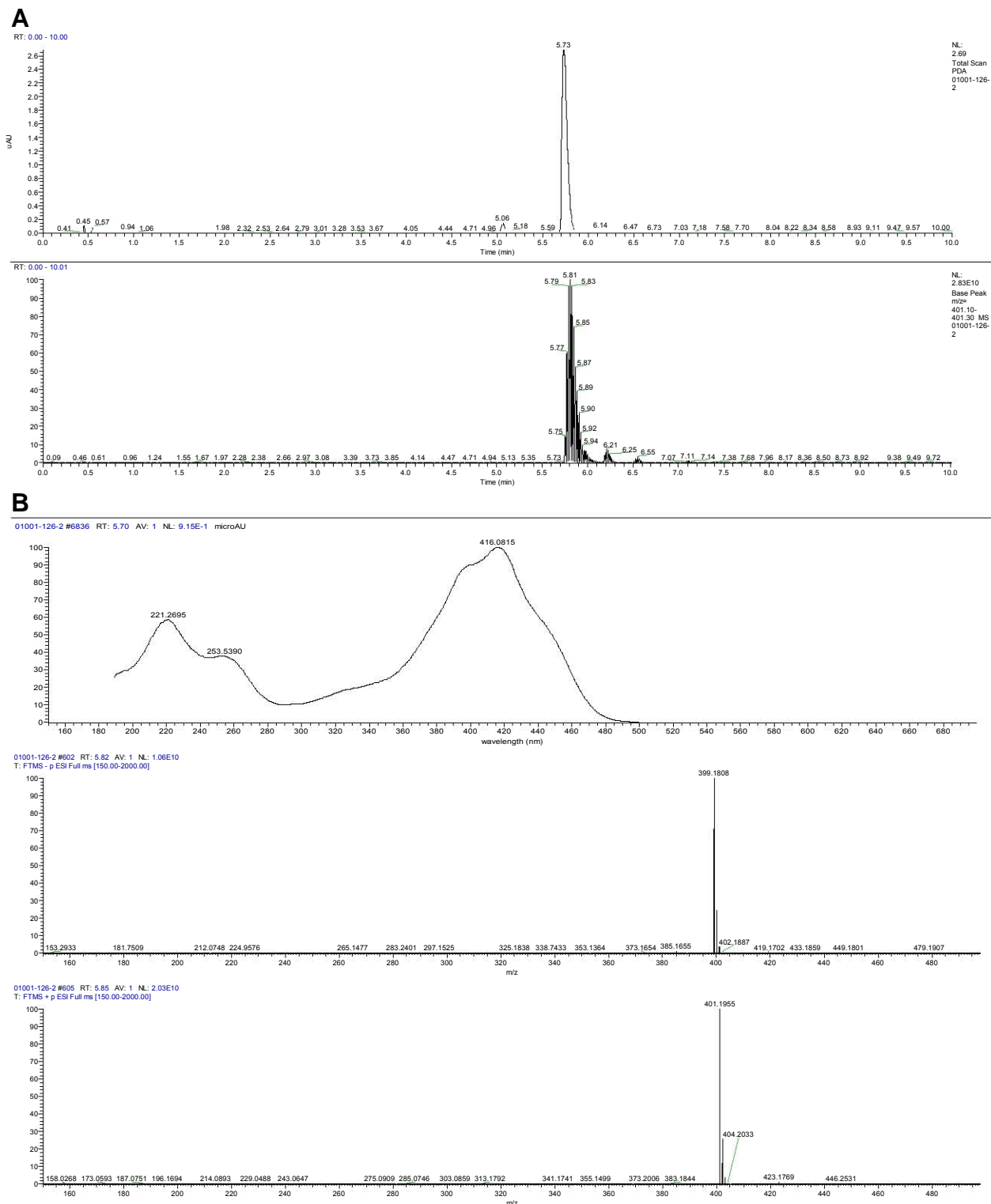
a) En  $\delta_H$  3.86 se observa un singulete diagnóstico con la presencia de un grupo metoxilo. De manera adicional, el desplazamiento químico en  $\delta_H$  3.34 a campos más altos observado para H-12, confirman que **2** es el producto metilado de **1** en C-12. En el espectro de  $^{13}C$  RMN las señales para este sistema aparecen en  $\delta_C$  150.6 (C-1), 163.8 (C-3), 108.2 (C-4), 142.9 (C-5), 108.1 (C-6), 167.2 (C-7), 117.6 (C-8), 170.5 (C-9), 81.8 (C-11), 67.1 (C-12) y 110.8 (C-13).

Con base en el análisis de los espectros de RMN uni y bidimensionales (**Figuras 16-18**), el producto **2** fue caracterizado como el 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído.

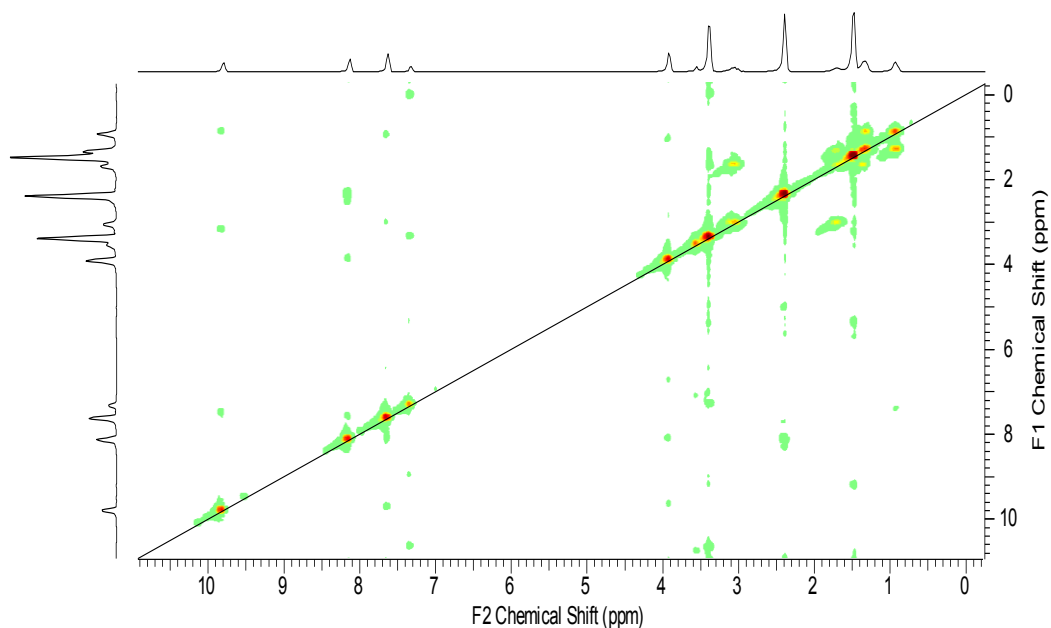




**Figura 16.** Espectros de (A)  $^1\text{H}$  RMN y (B)  $^{13}\text{C}$  RMN del del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (2).



**Figura 17. (A)** Cromatogramas en el UV-PDA (arriba) y de masas (TIC) (abajo); **(B)** Espectros en el UV (arriba) y de masas por la técnica de electrospray en los modos (-) (centro) y (+) (abajo) del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (**2**).

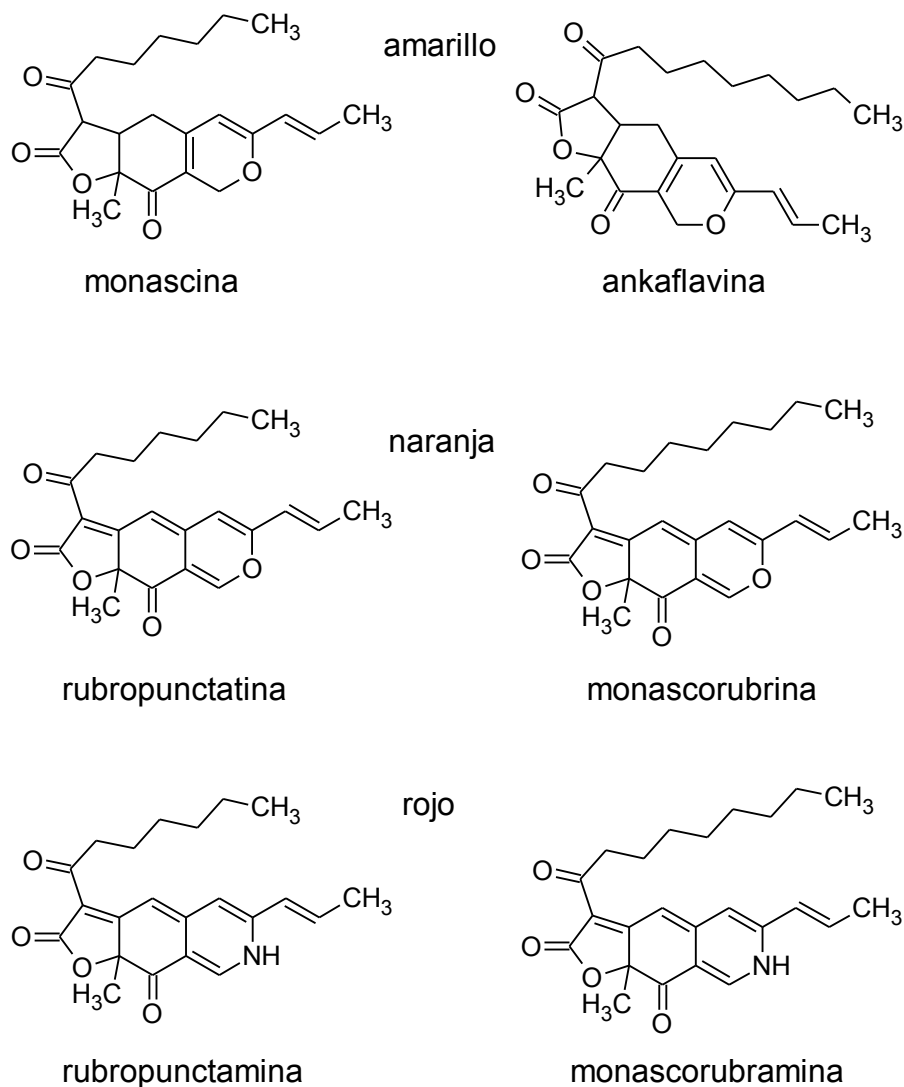


**Figura 18.** Espectro COSY del 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopiran-4-carbaldehído (**2**).

Este derivado es un producto natural sin precedentes en la literatura, el cual, junto con el fitólido B (**1**), poseen una similitud estructural con la monascorubrina y otros metabolitos relacionados aislados a partir de especies del género *Monascus*. Las especies mejor conocidas del género *Monascus* (*M. purpureus*, *M. ruber* y *M. pilosus*) son frecuentemente empleadas para la fermentación de arroz con el fin de producir “arroz de levadura roja” (red mold rice, en inglés), un producto que ha sido especialmente empleado como aditivo en alimentos y en la medicina tradicional china durante millones de años al cual se le atribuyen efectos benéficos para la salud (Hsu *et al.*, 2010, 2011; Patakova, 2013). Adicionalmente, a éste tipo de productos se le atribuyen un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo antimicrobianas, antifúngicas, inmunomoduladoras, antioxidantes y anticancerígenas (Hajjaj *et al.*, 2000; Akihisa *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 2010; Patakova, 2013). Cabe destacar que este tipo de pigmentos son sintetizados mediante una ruta mixta que involucra la vía de los policétidos, para generar la estructura del cromóforo, y la vía de síntesis de ácidos grasos, para producir un ácido graso de cadena mediana (ácido octanóico), el cual es incorporado al cromóforo por una reacción de esterificación. También se ha demostrado que el efecto de los ácidos grasos exógenos no promueve la

producción de pigmentos, ya que la formación de éste tipo de moléculas requiere la síntesis *de novo* del ácido graso de cadena mediana (Hajjaj *et al.*, 2000).

La mayor parte de este tipo de pigmentos son clasificados de acuerdo a la coloración que presentan en amarillo, naranja y rojo, y se han aislado alrededor de 20 moléculas diferentes (**Figura 19**) (Patakova, 2013). Se ha observado que algunos fermentados de *Monascus*, empleando dioscórea como sustrato, pueden inducir apoptosis en células de cáncer bucal humano, además de poseer un potencial antioxidante y antiinflamatorio contra heridas orales en hámster inducidas por 7,12-dimetil-1,2-benz[a]antraceno. Recientemente, derivados tipo azafilona de estos cultivos, mostraron una actividad antiinflamatoria y efectos antitumorales importantes en las líneas celulares de HEP-2 (carcinoma laringeal humano), WiDr (adenocarcinoma de colon humano) y A549 (carcinoma de pulmón), además de no poseer efectos tóxicos sobre las líneas celulares normales MRC-5 y WI-38 (Hsu *et al.*, 2010, 2011; Li *et al.*, 2010). La actividad antiinflamatoria encontrada fue dosis-dependiente para la producción de óxido nítrico inducida por lipopolisacárido (LPS) (Akihisa *et al.*, 2005).

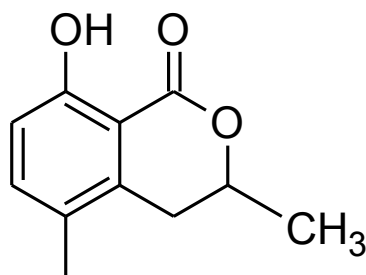


**Figura 19.** Productos mayoritarios de tipo azafilona producidos por *Monascus*.

### 5.2.2 Estudio químico del extracto en mediana escala 30×

El fraccionamiento preliminar de 9.382 g del extracto orgánico (30×) mediante CCA, permitió la obtención de un conjunto de trece fracciones primarias. El análisis cromatográfico por HPLC de las doce fracciones primarias restantes (**Figura 8**), permitió seleccionar a la fracción P11-7<sub>5</sub> (237.1 mg) debido a su menor complejidad y mejor rendimiento. La resolución por HPLC de esta fracción permitió el aislamiento de un sólido cristalino amarillo (145.9 mg, p. f. 128-131 °C) identificado como la 5-metilmeleína (**3**) (**Figura 20**).

### 5.2.2.1 Caracterización de la 5-metilmeleína

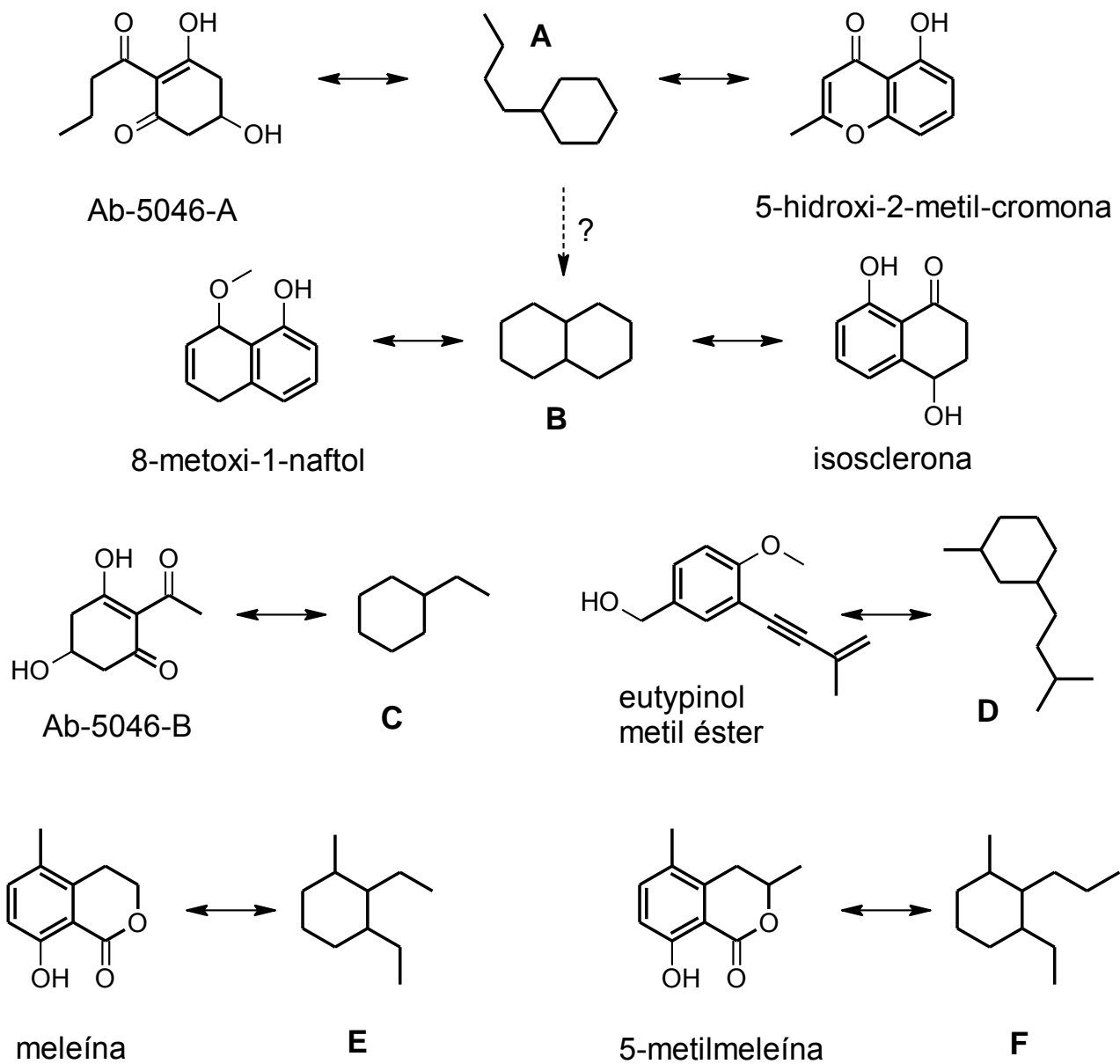


**Figura 20.** 5-metilmeleína (**3**)

La obtención del producto natural **3**, así como la caracterización mediante RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , se encuentra en armonía con los datos reportados en la tesis de licenciatura que le precede a esta investigación (Bautista-Lopez, 2014).

Estudios previos de metabolómica en material estromatal de *Biscogniauxia* sp. revelaron la presencia de la 5-metilmeleína (**3**) como el componente mayoritario en todas las especies estudiadas, el cual es un metabolito característico de *Hypoxylon* sp., otra especie perteneciente a la familia Xylariaceae (Stadler *et al.*, 2007). Éste metabolito ha sido identificado previamente como producto de las especies *B. marginata* (Whalley & Edwards, 1985), *B. mediterranea* (Evidente *et al.*, 2005) y *B. nummularia* (Amand *et al.*, 2012). En cualquier caso, el resultado de los estudios quimiotaxonómicos previos es concluyente si el material previo puede ser comparado con material colectado recientemente.

Éste metabolito pone en evidencia el tipo de moléculas que los organismos de ésta familia son capaces de producir. A pesar de que la búsqueda de metabolitos secundarios en material estromatal no ha sido muy productiva, se ha encontrado que algunas especies de *Biscogniauxia* pueden producir metabolitos de tipo dihidroisocumarinas (Whalley & Edwards, 1985; Stadler & Hellwig, 2005; Cheng *et al.*, 2011; Amand *et al.*, 2012), y también se ha demostrado que especies de *Biscogniauxia* muestran un metabolismo similar al de *Hypoxylon* (Stadler & Hellwig, 2005). Como se observa en la **Figura 21**, existe una gran variedad de esqueletos de carbono característicos de algunos compuestos que son producidos por algunas especies de la familia Xylariaceae.



**Figura 21.** Principales esqueletos de carbono de los policétidos observados, frecuentes en cultivos de los géneros *Daldinia*, *Entonaema*, *Phylacia* y *Thamnomyces* (A-D) y *Annulohyphoxylon*, *Biscogniauxia*, *Camillea*, *Hypoxylon* y *Pyrenomyxa* (E, F) (Stadler, 2011).

## 6. CONCLUSIONES

- Se realizó el aislamiento axénico de 5 taxones fúngicos endófitos a partir de una fuente natural vegetal proveniente de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de la UNAM.
- La evaluación biológica de los extractos orgánicos preparados a partir de los organismos aislados, utilizando como ensayo de monitoreo la actividad citotóxica contra dos líneas cancerígenas humanas, hizo posible la selección de una especie fúngica para el descubrimiento de moléculas biodinámicas.
- Los estudios de derreplicación realizados, con la finalidad de explorar el metabolismo secundario de las especies fúngicas de manera preliminar, permitió identificar a los metabolitos producidos por cada organismo, y así poder identificar a las micotoxinas producidas por cada especie y otros componentes que posiblemente poseen moléculas novedosas con actividad citotóxica.
- El fraccionamiento del extracto orgánico obtenido a partir de la especie endófito *Biscogniauxia* sp. permitió el aislamiento y caracterización de dos moléculas de tipo azafilona con propiedades fluorescentes interesantes: fitólido B (**1**) y el 9-metoxi-6,9a-dimetil-3-octanoil-2-oxo-9,9a-dihidro-2H-furo[3,2-g][2]benzopirán-4-carbaldehído (**2**); éste último representa un nuevo producto natural. Por otra parte, a partir del cultivo 30x, se logró el aislamiento de la 5-metilmeleína (**3**), el cual es un compuesto de importancia quimiotaxonómica como marcador para el género *Biscogniauxia* y para la familia Xylariaceae.



## 7. PERSPECTIVAS

- Continuar con el estudio químico de las fracciones restantes con la finalidad de obtener a los productos minoritarios.
- Realizar la evaluación del potencial citotóxico de los metabolitos aislados con el objetivo de identificar a los principios responsables de la actividad biológica mostrada por el extracto orgánico.
- Determinar la configuración absoluta de los centros quirales de los compuestos **1-3** mediante técnicas espectroscópicas (dicroísmo circular, rotación óptica) y métodos computacionales.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Acosta, E. et al., **2014**. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(SUPPL.), pp.76–81.
- Akihisa, T. et al., **2005**. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(3), pp.562–5.
- Amand, S. et al., **2012**. Guaiane sesquiterpenes from *Biscogniauxia nummularia* featuring potent antigerminative activity. *Journal of Natural Products*, 75(4), pp.798–801.
- Bailly, C., **2009**. Ready for a comeback of natural products in oncology. *Biochemical Pharmacology*, 77(9), pp.1447–1457.
- Basmadjian, C. et al., **2014**. Cancer wars: natural products strike back. *Frontiers in chemistry*, 2(May), p.20.
- Bass, D. & Richards, T. a., **2011**. Three reasons to re-evaluate fungal diversity “on Earth and in the ocean.” *Fungal Biology Reviews*, 25(4), pp.159–164.
- Bautista-Lopez, A., **2014**. *Aislamiento e identificación de metabolitos biodinámicos a partir de especies fúngicas de México - Tesis de Licenciatura para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo*. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Butler, M.S. & Buss, A.D., **2006**. Natural products - The future scaffolds for novel antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, 71(7), pp.919–929.
- Chaverri, P. & Gazis, R.O., **2011**. Linking ex planta fungi with their endophytic stages: Perisporiopsis, a common leaf litter and soil fungus, is a frequent endophyte of *Hevea* spp. and other plants. *Fungal Ecology*, 4(1), pp.94–102.
- Cheng, M.J. et al., **2012**. Secondary metabolites from the endophytic fungus *Biscogniauxia formosana* and their antimycobacterial activity. *Phytochemistry Letters*, 5(3), pp.467–472.

- Cheng, M.J. et al., **2011**. Secondary metabolites isolated from the fungus *Biscogniauxia cylindrospora* BCRC 33717. *Chemistry of Natural Compounds*, 47(4), pp.527–530.
- Cragg, G.M. & Newman, D.J., **2013**. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1830(6), pp.3670–3695.
- El-Elimat, T. et al., **2013**. High-resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of Natural Products*, 76(9), pp.1709–1716.
- Evidente, A. et al., **2005**. Biscopyrans, a phytotoxic hexasubstituted pyranopyran produced by *Biscogniauxia mediterranea*, a fungus pathogen of cork oak. *Journal of Natural Products*, 68(4), pp.568–571.
- Evidente, A. et al., **2014**. Fungal metabolites with anticancer activity. *Natural product reports*, 31(5), pp.617–27.
- Gao, J., Yang, S. & Qin, J., **2013**. Azaphilones: Chemistry and Biology. *Chemical Reviews*, 113(7), pp.4755–4811.
- Guzmán, G., **1998**. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 7(3), pp.369–384.
- Hajjaj, H. et al., **2000**. Medium-chain fatty acids affect citrinin production in the filamentous fungus *Monascus ruber*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(3), pp.1120–1125.
- Hsu, Y.W. et al., **2011**. New bioactive orange pigments with yellow fluorescence from *Monascus*-fermented *dioscorea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), pp.4512–4518.
- Hsu, Y.-W. et al., **2010**. New Anti-Inflammatory and Anti-Proliferative Constituents from Fermented Red Mold Rice *Monascus purpureus* NTU 568. *Molecules*, 15(11), pp.7815–7824.
- Huryn, D.M. & Wipf, P., **2014**. *Chapter 3 - Natural Product Chemistry and Cancer Drug Discovery* Second Edi., Elsevier.
- INEGI, **2015**. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. *Recuperado el 10 de agosto de 2015*, p.<http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?c=274>.

- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M., **2012**. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology*, 19(7), pp.792–798.
- Kusari, S., Singh, S. & Jayabaskaran, C., **2014**. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: Hope versus hype. *Trends in Biotechnology*, 32(6), pp.297–303.
- Lam, K.S., **2007**. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, 15(6), pp.279–289.
- Li, J.-J. et al., **2010**. New Cytotoxic Azaphilones from *Monascus purpureus*-Fermented Rice (Red Yeast Rice). *Molecules*, 15(3), pp.1958–1966.
- McAlpine, J.B. et al., **2005**. Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example. *Journal of Natural Products*, 68(4), pp.493–496.
- Mishra, B.B. & Tiwari, V.K., **2011**. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46(10), pp.4769–4807.
- Mishra, Y. & Singh, A., **2014**. Understanding the Biodiversity and Biological Applications of Endophytic Fungi: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, s8(01).
- Mueller, G.M. et al., **2004**. *Biodiversity of Fungi*, Elsevier.
- Nugent, L.K. et al., **2005**. *Biscogniauxia*: a genus of latent invaders. *Mycologist*, 19(1), pp.40–43.
- OMS, **2015**. Temas de salud - Cáncer. *Recuperado el 10 de agosto de 2015*, p.<http://www.who.int/topics/cancer/es/>.
- Osmanova, N., Schultze, W. & Ayoub, N., **2010**. Azaphilones: a class of fungal metabolites with diverse biological activities. *Phytochemistry Reviews*, pp.1–28.
- Pace, N.R., **1997**. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science (New York, N.Y.)*, 276(5313), pp.734–740.
- Patakova, P., **2013**. *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40(2), pp.169–181.
- Prado, S., Li, Y. & Nay, B., **2012**. *Bioactive Natural Products*, Elsevier.
- Rogers, J.D., **2000**. Thoughts and musings on tropical Xylariaceae. *Mycological Research*, 104(12), pp.1412–1420.

- Sette, L.D., Pagnocca, F.C. & Rodrigues, A., **2013**. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. *Fungal Genetics and Biology*, 60, pp.2–8.
- Stadler, M., **2011**. Importance of secondary metabolites in the Xylariaceae as parameters for. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 1(2), pp.75–133.
- Stadler, M. et al., **2007**. Metabolomic studies on the chemical ecology of the Xylariaceae (Ascomycota). *Natural Product Communications*, 2(3), pp.287–304.
- Stadler, M. & Hellwig, V., **2005**. Chemotaxonomy of the Xylariaceae and remarkable bioactive compounds from Xylariales and their associated asexual stages. *Recent Res. Devel. Phytochem.*, 9(JANUARY), pp.41–93.
- Suryanarayanan, T.S., **2013**. Endophyte research: Going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecology*, 6(6), pp.561–568.
- Torre, L. a et al., 2015. Global Cancer Statistics, 2012. *A Cancer Journal for Clinicians (2015)*, 65(02), pp.87–108.
- Vichai, V. & Kirtikara, K., **2006**. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protocols*, 1(3), pp.1112–1116.
- Wang, G.Y.S., Borgeson, B.M. & Crews, P., **1997**. Pitholides A-D, polyketides from a marine tunicate-derived culture of pithomyces sp. *Tetrahedron Letters*, 38(49), pp.8449–8452.
- Whalley, a. J.S., **1996**. The xylariaceous way of life. *Mycological Research*, 100(8), pp.897–922.
- Whalley, a. J.S. & Edwards, R.L., **1985**. Nummulariella Marginata: Its conidial state, secondary metabolites and taxonomic relationships. *Transactions of the British Mycological Society*, 85(3), pp.385–390.
- Wolfender, J.-L. et al., **2015**. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*, 1382, pp.136–164.