



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO QUÍMICO DE LAS ESPECIES FÚNGICAS *CHAETOMIUM* SP.
(P30-4) Y *PENICILLIUM* SP. (T2-1)**

TESIS

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

PRESENTA

RAUL ENRIQUE CAMIÑA BLANDO



Ciudad de México

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^{er} SUPLENTE:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2^{do} SUPLENTE:	Dr. Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

SUSTENTANTE:

Raul Enrique Camiña Blando

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

ÍNDICE

Lista de figuras	v
Lista de cuadros	vii
Lista de esquemas	vii
Lista de tablas	viii
Lista de abreviaturas	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de los productos naturales como fuente de nuevas entidades químicas	1
1.2 Los hongos como productores de metabolitos biodinámicos	2
1.3 Biodiversidad de los organismos fúngicos en México	4
1.4 Importancia de las colecciones fúngicas	7
1.5 Género <i>Chaetomium</i>	7
1.6 Género <i>Penicillium</i>	9
2. HIPÓTESIS	12
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	13
4. PARTE EXPERIMENTAL	14
4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio	14
4.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala	15
4.3 Preparación de los extractos orgánicos	16
4.4 Estudios de derreplicación	17
4.5 Ensayo de citotoxicidad	18
4.6 Fraccionamiento primario del extracto orgánico P30-4 y aislamiento de los metabolitos mayoritarios presentes	19
4.7 Fraccionamiento primario del extracto orgánico T2-1 y aislamiento de los metabolitos secundarios mayoritarios	21
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
5.1 Aislamiento y selección de los organismos fúngicos objeto de estudio	26

5.2 Estudio químico de las especies fúngicas <i>Chaetomium</i> sp. (P30-4) y <i>Penicillium</i> sp. (T2-1)	33
5.2.1 Estudio químico de la especie <i>Chaetomium</i> sp.	33
5.2.1.1 Caracterización estructural de la dihidrocoarctatina (1)	34
5.2.2 Estudio químico de la especie <i>Penicillium</i> sp.	38
6. CONCLUSIONES	41
7. PERSPECTIVAS	42
8. BIBLIOGRAFÍA	43

Lista de figuras

Figura		Página
1	Ejemplos selectos de fármacos obtenidos a partir de hongos.	2
2	Ejemplos selectos de compuestos bioactivos aislados de hongos endófitos.	6
3	Metabolitos selectos aislados a partir del género <i>Chaetomium</i> .	8
4	Metabolitos selectos aislados a partir del género <i>Penicillium</i> .	9
5	Ubicación geográfica de la región de Sayulita, en el estado de Nayarit (20° 51' 57" N; 105° 27' 16" O).	15
6	Ubicación geográfica del volcán de San Martín, en la localidad de San Andrés Tuxtla, en el estado de Veracruz (18° 30.421" N; -95° 12.538" O).	16
7	Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto P30-4 ($\lambda = 254$ nm).	22
8	Fraccionamiento secundario de la fracción F_P30-4₅ mediante cromatografía de líquidos a nivel preparativo en fase reversa ($\lambda = 254$ nm).	22
9	Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico T2-1 ($\lambda = 254$ nm).	24
10	Fraccionamiento secundario de la fracción F_T2-1₅ mediante HPLC a nivel preparativo en fase reversa ($\lambda = 254$ nm).	24
11	Ejemplos selectos de las especies endófitas y saprótrofes aisladas a partir de las fuentes naturales seleccionadas.	27
12	Diagrama de flujo que resume la estrategia metodológica de los estudios de derreplicación de los extractos orgánicos.	31
13	Ejemplo del análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la muestra P30-4 (a) Cromatograma TIC y (b) por UPLC-PDA ($\lambda = 254$ nm) de los metabolitos mayoritarios identificados; (c)	32

	Espectro de UV y (d) de HR-ESI-(+)-MS del pico observado en un t_R de 4.94 min	
14	Especies fúngicas <i>Chaetomium</i> sp. (P30-4) y <i>Penicillium</i> sp. (T2-1) [(A y C) cultivos axénicos en medio PDA y (B y D) cultivos sólidos].	33
15	UPLC-PDA-ESIMS del compuesto 1 : (a) Cromatograma por UPLC-PDA y (b) TIC en modo (+). (c) Espectro de UV ($\lambda = 254$ nm) y (d) de masas del pico en 2.85 min.	36
16	Espectro de ^1H RMN de la dihidrocoarctatina (1).	37
17	Espectro de ^{13}C RMN de la dihidrocoarctatina (1).	37
18	Cromatogramas TIC (a) y en el UV-PDA (b) del compuesto 2 . Espectro en el UV ($\lambda = 254$ nm) (c) y de masas por la técnica de electrospray en modo (-) (d) y (+) (e).	39
19	Cromatogramas en el UV-PDA (a), TIC-(+) (b) y TIC-(-) (c) del compuesto 3 . Espectro en el UV ($\lambda = 254$ nm) (c) y de masas por la técnica de electrospray en modo (-) (d) y (+) (e).	40

Lista de cuadros5

Cuadro		Página
1	Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto P30-4 .	20
2	Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto T2-1 .	23

Lista de esquemas

Esquema		Página
1	Resumen de la estrategia metodológica empleada en esta investigación.	26

Lista de tablas

Tabla		Página
1	Resultados del ensayo de citotoxicidad de los diferentes taxones aislados.	28
2	Datos espectroscópicos de RMN de la dihidrocoarctatina (1).	35

Lista de abreviaturas

Abs	Absorbancia	µm	Micrómetros
ADN	Ácido desoxirribonucleico	mg	Miligramos
ARN	Ácido ribonucleico		
°C	Grado centígrado	min	Minutos
CCA	Cromatografía en columna abierta	mL	Mililitro
CHCl ₃	Cloroformo		
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	mm	Milímetros
CO ₂	Dióxido de carbono	mm ²	Milímetros cuadrados
DMSO	Dimetilsulfóxido	mM	Milimolar
		MRP	Proteína asociada a MDR
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	MS	Espectrometría de masas
ESI	Técnica de Ionización por electrospray	NEQs	Nuevas Entidades Químicas
g	Gramos	RMN	Resonancia Magnética Nuclear
HeLA	Línea celular de cáncer cervical	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	PDA	Agar papa dextrosa
H ₂ O	Agua	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
kV	Kilovolts	rpm	Revoluciones por minuto
		TCA	Ácido tricloroacético
MCF7	Línea celular de cáncer de mama	t _R	Tiempo de retención
MDR	Gen de multiresistencia a fármacos	TRIS	tris(hidroximetil) aminometano
MEA	Agar extracto de malta	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
MeCN	Acetonitrilo		
MeOH	Metanol	V	Volts
µg	Microgramos	YESD	Extracto de levadura-peptona de soya-dextrosa
µL	Microlitros		

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de los productos naturales como fuente de nuevas entidades químicas

A lo largo del tiempo, los productos naturales, en especial aquellos obtenidos de plantas y microorganismos, han sido la fuente más importante para la obtención de nuevas entidades químicas (NEQs), fármacos y/o productos de utilidad en la industria farmacéutica, agroquímica y alimentaria (Newman y Cragg, 2012).

Cabe destacar que la medicina tradicional ha sido la base de los complejos sistemas de salud por cientos de años, además de que ésta ha logrado preservarse mediante la comunicación oral y por numerosos registros escritos (Cragg y Newman, 2013). En este sentido, el conocimiento etnobotánico de las plantas medicinales ha permitido el estudio fitoquímico de muchas especies y, en consecuencia, el aislamiento de una gran cantidad de compuestos biodinámicos. Debido a que en algunas ocasiones la disponibilidad de las especies vegetales es limitada, ya sea por su endemismo o la duración de su ciclo de vida, se han optado por el aislamiento y estudio químico de los microorganismos que residen dentro de los tejidos vegetales (endófitos), ya que han demostrado su capacidad para producir NEQs o moléculas similares a los compuestos bioactivos que producen las plantas hospedaderas (Alvin *et al.*, 2014).

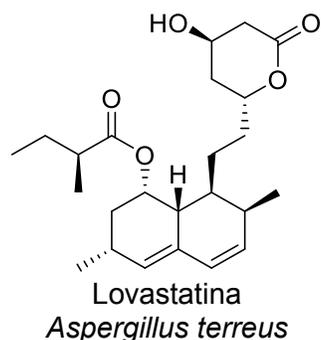
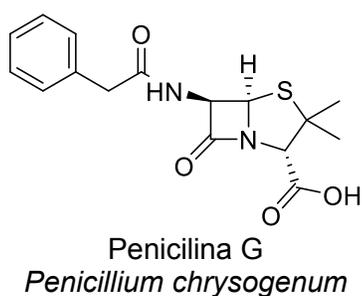
Por otra parte, los microorganismos (hongos o bacterias) han demostrado su extraordinaria capacidad como productores de moléculas bioactivas; y se ha establecido también que la exploración de ecosistemas o hábitats exóticos generalmente conlleva a la obtención de nuevas especies de microorganismos, los cuales, pueden biosintetizar moléculas únicas que sirvan de base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Du *et al.*, 2014).

En este contexto, tan sólo en el periodo comprendido entre los años 1981 a 2010, alrededor del 50% de las NEQs aprobadas por la FDA fueron productos naturales sin

modificaciones estructurales, análogos semisintéticos de productos naturales, o bien, productos de síntesis inspirados en productos naturales. De estos, alrededor del 75% fueron agentes terapéuticos para el tratamiento de infecciones de diversas etiologías (Newman y Cragg, 2012).

1.2 Los hongos como productores de metabolitos biodinámicos

Históricamente, el potencial biotecnológico de los microorganismos fue aprendido de manera empírica, como en el caso de la producción de bebidas alcohólicas o la levadura para la manufactura de pan (Sette *et al.*, 2013). No fue sino hasta el año de 1929 con el descubrimiento inesperado de la penicilina por parte de Alexander Fleming, y el uso de ésta como agente terapéutico durante la segunda guerra mundial, cuando se impulsara realmente la investigación de los productos naturales de origen microbiano para la obtención de nuevos metabolitos bioactivos. Así, muchos otros compuestos de origen fúngico también han demostrado su importancia terapéutica en el tratamiento de diversos padecimientos, como son los inmunosupresores de tipo ciclosporina, los hipocolesterolemiantes de tipo estatina, los inmunoestimulantes y antitumorales de tipo polisacárido, los antifúngicos de tipo lipopéptido, entre otros (**Figura 1**) (Cragg y Newman, 2013). A pesar de esto, del total de compuestos obtenidos a partir de fuentes naturales y que conforman la base de datos del Diccionario de Productos Naturales (aproximadamente 270,000 compuestos), solamente 15,000 compuestos han sido obtenidos de hongos (Dictionary of Natural Products, 2010).



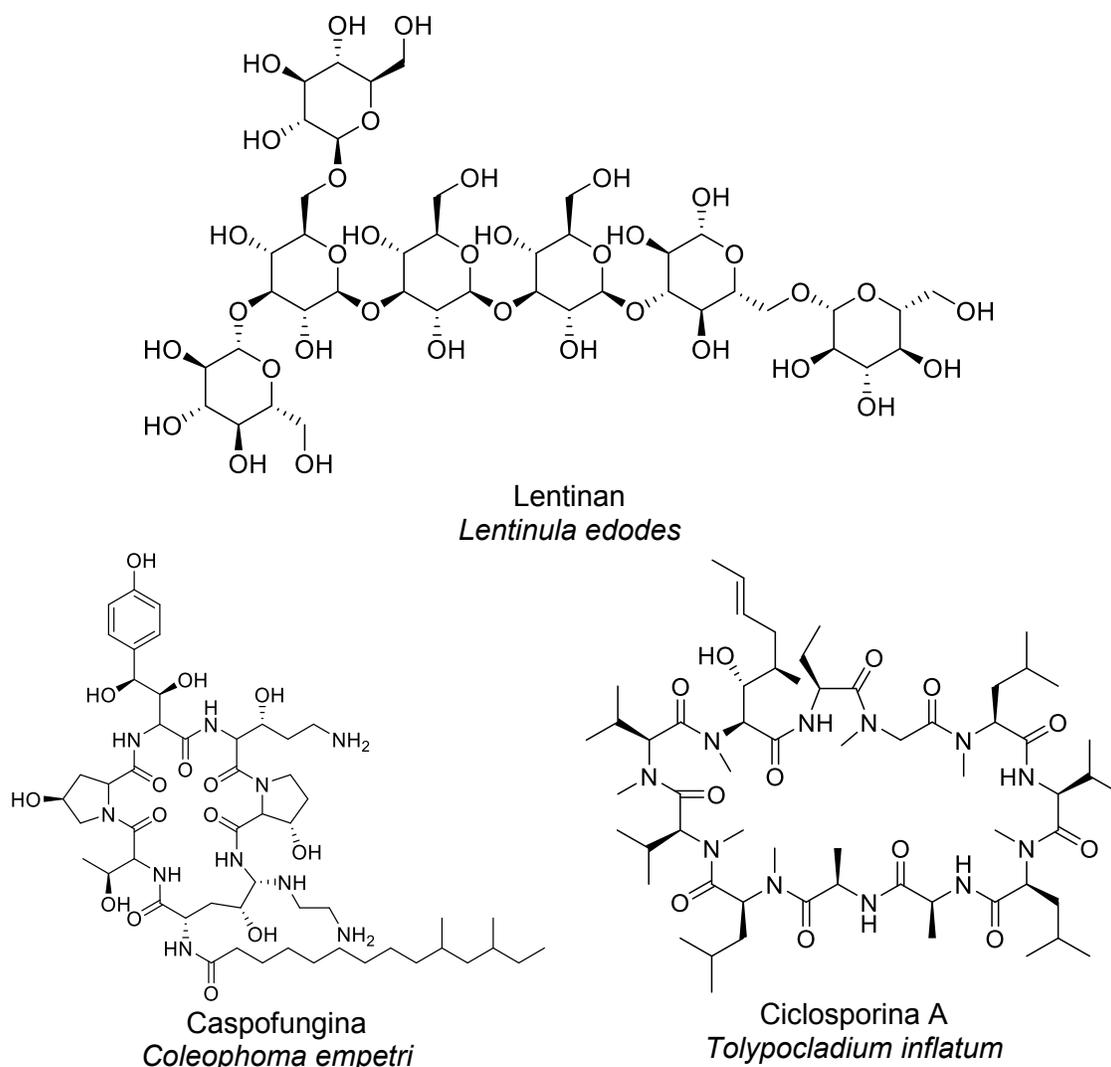


Figura 1. Ejemplos selectos de fármacos obtenidos a partir de hongos.

Debido a la aparición de nuevas enfermedades, así como a los fenómenos de resistencia que algunas presentan a los medicamentos de elección, existe una creciente necesidad por obtener NEQ's que sirvan de base para el desarrollo de nuevos fármacos. La resistencia a múltiples fármacos (MDR) es un desafío importante en el tratamiento de enfermedades infecciosas y del cáncer. En el caso de esta última enfermedad, los tratamientos con antitumorales a menudo fallan en alguna etapa del padecimiento. De manera general, los tumores están compuestos de células heterogéneas con diferencias estructurales y bioquímicas: las células sensibles y resistentes a los fármacos a menudo coexisten en el mismo microambiente tumoral. En la terapia antitumoral, los fármacos atacan a las células sensibles a los medicamentos; sin embargo, en la mayoría de los

casos, la comunidad de células resistentes prevalece, llevando consigo a la aparición del fenómeno de resistencia (Andrade *et al.*, 2013).

En el caso de la MDR a los agentes antimicrobianos, esta representa consecuencias graves tanto a nivel intrahospitalario como extrahospitalario. Los principales padecimientos de MDR y que han tenido una mayor repercusión para su tratamiento son la gonorrea, algunas infecciones de vías urinarias, la tuberculosis, el paludismo, así como también las infecciones oportunistas por patógenos como *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* en pacientes con algún grado de inmunosupresión (Andrade *et al.*, 2013; OMS, 2015).

Así, el universo microbiano inexplorado representa una fuente invaluable para el descubrimiento de estas nuevas moléculas y el desarrollo de fármacos novedosos para la terapéutica de diversos padecimientos, incluyendo las enfermedades asociadas a MDR (Cragg y Newman, 2013). Es importante mencionar que los compuestos de origen natural siguen siendo la fuente más importante de inspiración para los químicos medicinales y en síntesis orgánica, además de que, sin lugar a duda, existe una gran cantidad de esqueletos novedosos por descubrir (Newman y Cragg, 2012).

1.3 Biodiversidad de los organismos fúngicos en México

México ocupa el quinto lugar a nivel mundial en biodiversidad gracias a su amplia variedad de ecosistemas, en donde los factores como la situación geográfica, la topografía, altitud y humedad convergen para formar un amplio mosaico de regiones ambientales, los cuales son hábitats de un gran número de especies y endemismos. Se estima que dichas especies de flora, fauna y microbioma representan el 10% de la diversidad mundial (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014). Las primeras observaciones y registros de los organismos fúngicos mexicanos fueron hechas por nativos indígenas hace más de 500 años, las cuales fueron plasmadas en sus códices, alfarería y parafernalia ritual, con el fin de poder identificar de manera práctica las diversas propiedades de los hongos sagrados, medicinales, venenosos y comestibles que formaban parte de la vida diaria de

los nativos (Guzmán, 1998). En la actualidad, se estima que en el territorio nacional existen unas 200,000 especies fúngicas macro y microscópicas, las cuales representan entre un 4 y 13% de las que se cree existen en el planeta (entre 1.5 y 5 millones de especies). De este total, se han descrito taxonómicamente aproximadamente 100,000 especies, y un número aún menor ha sido estudiado químicamente (Aguirre-Acosta *et al.*, 2014).

De los diferentes Filos de hongos, las especies pertenecientes al Ascomycota (la división más grande de este reino con aproximadamente 64,000 especies), han sido los más prolíficos en la producción de metabolitos secundarios bioactivos. Así, los ascomycetos saprófitos del suelo más estudiados pertenecen a los géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, los cuales han demostrado la capacidad de síntesis de una amplia gama de compuestos bioactivos (más de 30% de los compuestos bioactivos de estos géneros) (Mishra *et al.*, 2014). Debido a su capacidad de crecer sobre sustratos inespecíficos y económicos, estos microorganismos son utilizados también en la producción de una amplia gama de productos de interés comercial, como son enzimas proteolíticas, pigmentos, vitaminas, alcoholes y ácidos orgánicos, además de que poseen un gran potencial como agentes plaguicidas en los campos de cultivo (Guzmán, 1998; Sette *et al.*, 2013).

Otro grupo de ascomicetos de gran interés para la obtención de moléculas bioactivas son los organismos endófitos. Estos organismos tienen su ciclo vital dentro de los tejidos de las plantas, sin tener una manifestación patológica visible en el hospedero. Durante esta asociación, los beneficios individuales de cada uno estarán en función de las especies involucradas en dicha interacción. Dichos organismos endófitos se han aislados de diversas especies de plantas, musgos, líquenes, helechos, crasuláceas, y organismos marinos que habitan una amplia variedad de climas (desde tropicales hasta los círculos polares y las profundidades del océano) (Kusari *et al.*, 2012). La mayor parte de los metabolitos secundarios provenientes de estos microorganismos tienen una gran diversidad estructural y poseen actividades biológicas diversas (**Figura 2**).

Adicionalmente, estos organismos también pueden sintetizar compuestos que se creía sólo provenían del metabolismo secundario de sus hospederos.

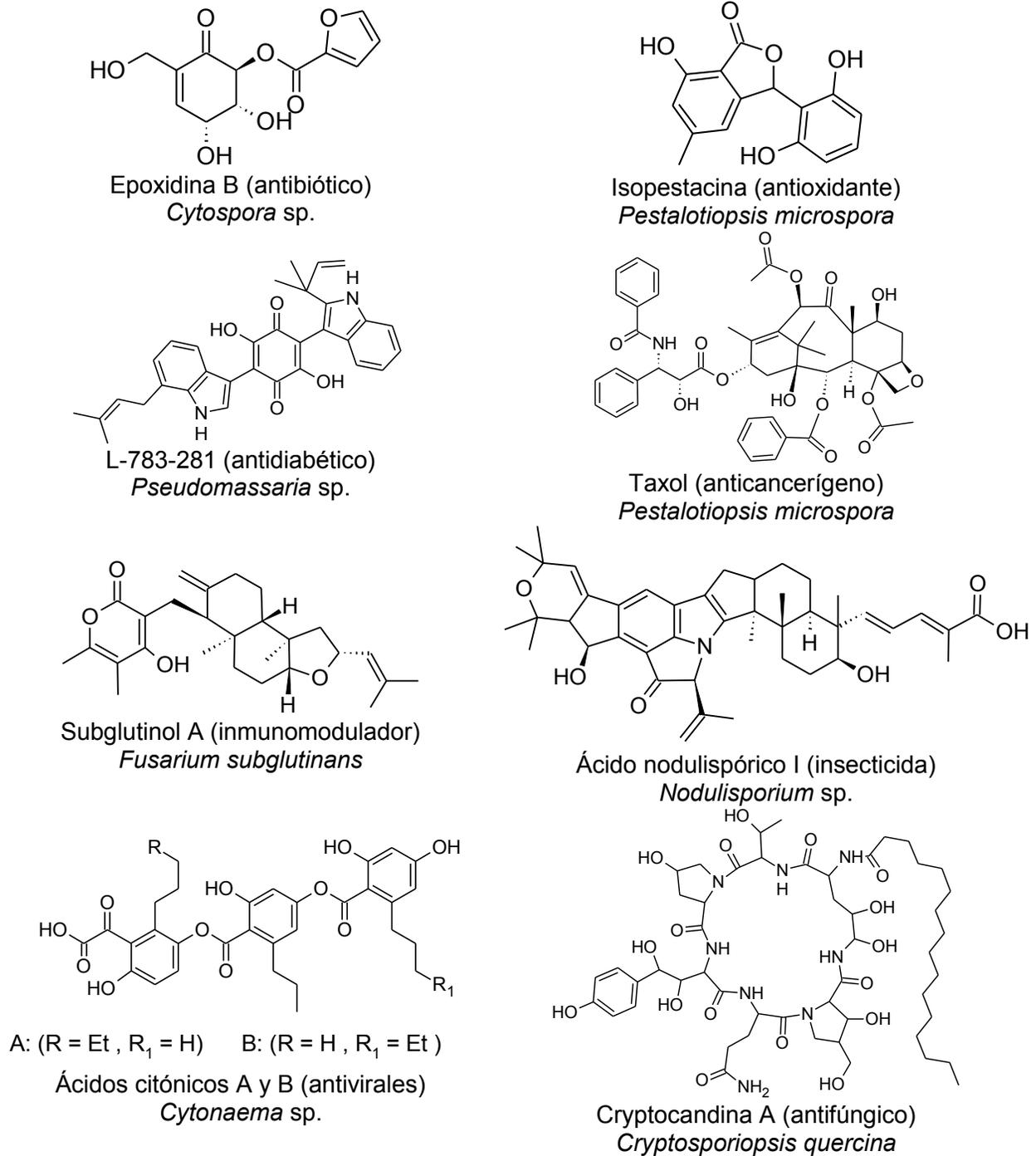


Figura 2. Ejemplos selectos de compuestos biactivos aislados de hongos endófitos.

1.4 Importancia de las colecciones fúngicas

Un aspecto muy importante a considerar para la obtención sustentable de moléculas novedosas bioactivas es la creación de una colección de microorganismos que represente un punto de partida fundamental para el desarrollo futuro de procesos biotecnológicos (Ireland *et al.*, 2003; Harvey, 2008; Kingston, 2011; Takagi y Shin-Ya, 2012). En este contexto, los Estados Unidos de América mantiene una de las colecciones de microorganismos más grandes del mundo, con alrededor de 96,000 especies tipo entre actinomicetos, bacterias y hongos (USDA-ARS-NRRL). En contraste, según la Federación Mundial de Colecciones de Cultivos (World Federation for Culture Collections, WFCC), nuestro país cuenta con solo 15 colecciones de cultivos de microorganismos que contienen principalmente organismos patógenos aislados de plantas y humanos. La importancia de la creación de colecciones nuevas de organismos fúngicos aislados a partir de localidades inexploradas de nuestro país (cuevas, volcanes, sedimentos marinos, etc.), así como de plantas y líquenes que no hayan sido estudiados para el aislamiento de este tipo de microorganismos, radica en que éstas fuentes son invaluable para la obtención de moléculas con una diversidad química y actividad biológica únicas. Cabe destacar que una parte importante en el aislamiento de taxones para la elaboración de estas colecciones es realizar la identificación inequívoca de éstas a niveles taxonómicos de género y especie mediante la realización de los análisis morfológicos y genéticos de la subunidad 16s y del espaciador de transcripción interno (ITS) del ADN ribosomal (Cook y Meyers, 2003; Schoch *et al.* 2012). Además de los estudios filogenéticos, para obtener los análisis genealógicos de las especies en estudio, mismos que son de gran importancia para explicar algunos aspectos ecológicos y de biodiversidad relevantes.

1.5 Género *Chaetomium*

El género *Chaetomium* pertenece a la familia Chaetomiaceae, División Ascomycota. Las especies de este género son de distribución cosmopolita y han sido aisladas de diversas fuentes como tejidos vegetales, suelo, aire, forraje, estiércol, plumas

de aves, entre otros. A la fecha, se han caracterizado taxonómicamente 35 de las 104 especies clasificadas (Zhang *et al.*, 2013). Se sabe que diversas especies del género *Chaetomium* producen metabolitos secundarios bioactivos que poseen núcleos estructurales inusuales como las chaetoglobosinas, epipolythiodioxopiperazinas y depsidonas, además de compuestos de tipo azafilonas, xantonas, antraquinonas, cromonas, terpenoides y esteroides (**Figura 3**). Por otra parte, se han reportado cepas de *Chaetomium* endófitas con importante actividad antimicrobiana (Samaga *et al.*, 2014).

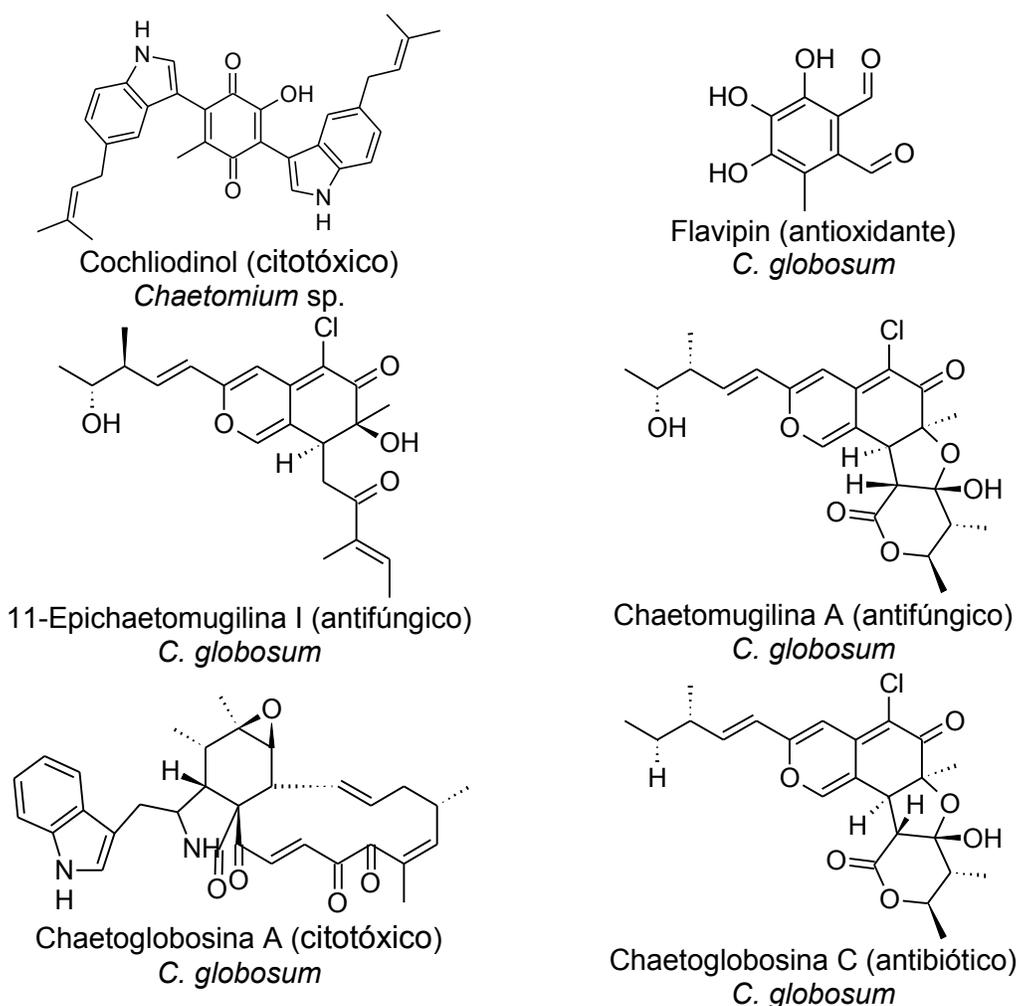
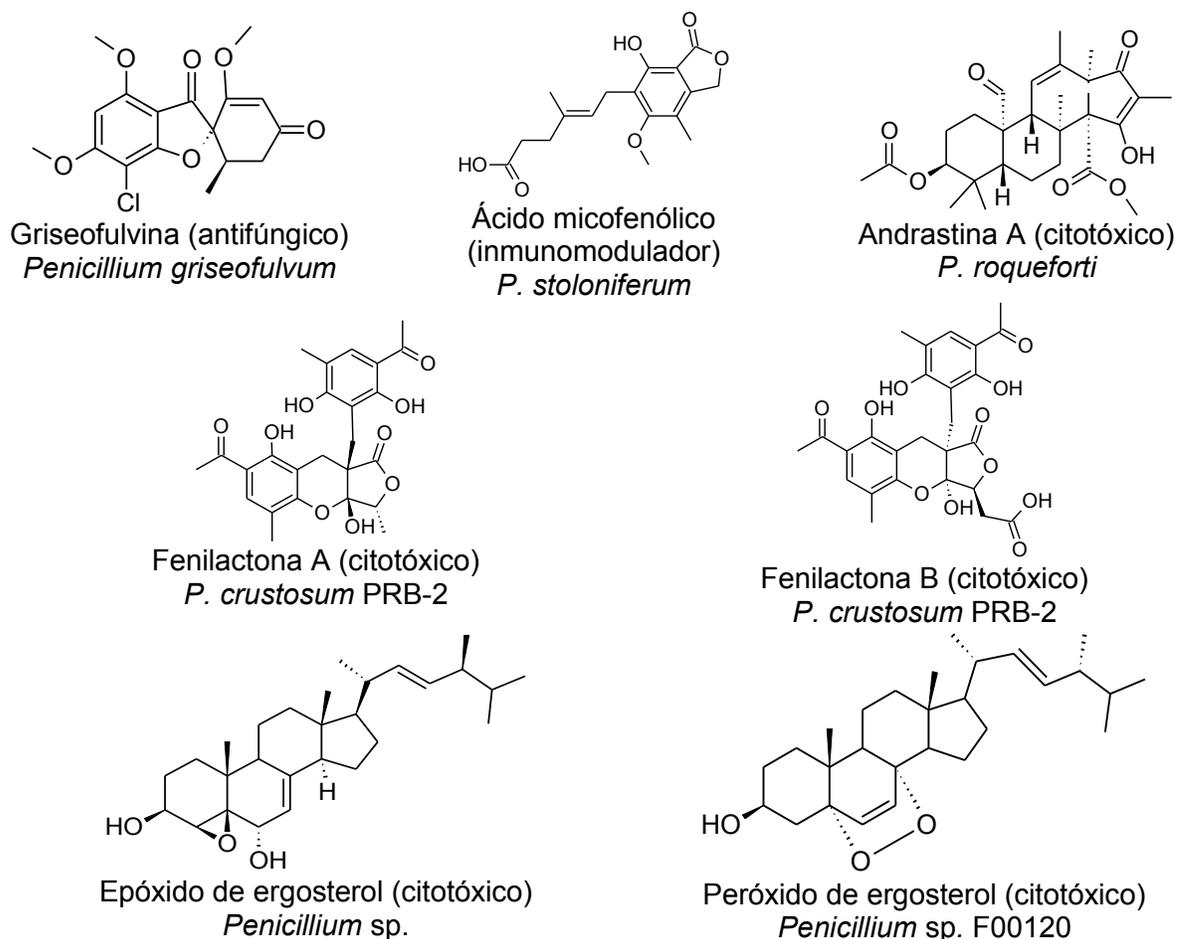
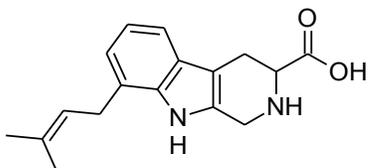


Figura 3. Metabolitos selectos aislados a partir del género *Chaetomium*.

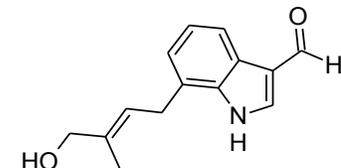
1.6 Género *Penicillium*

Los hongos del género *Penicillium* siguen siendo una de las fuentes más prometedora de moléculas bioactivas. Diversas especies de este género han sido aisladas a partir de nichos ecológicos variados, como son suelos, sedimentos marinos, plantas, etc; ya que en estos hábitats convergen diversos factores estresantes que conllevan a la activación de genes involucrados en la producción de metabolitos secundarios diversos (Wang *et al.*, 2015). Para una adecuada identificación de las especies de este género, se recomienda además de la caracterización morfológica y molecular, realizar el análisis de metabolómica para esclarecer de manera preliminar el tipo de metabolitos producidos por la especie de interés. De este género, se han aislado cientos de metabolitos bioactivos y de gran diversidad estructural (**Figura 4**) (Bladt *et al.*, 2013; Mioso *et al.*, 2014).

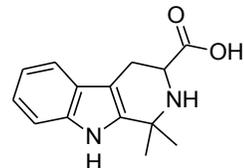




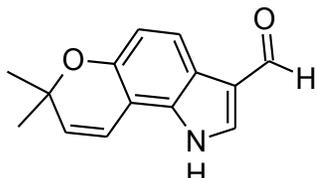
Penipalina A (citotóxico)
P. paneum SD-44



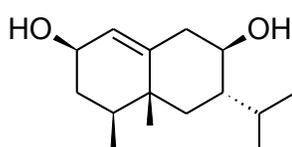
Penilpalina C (citotóxico)
P. paneum SD-44



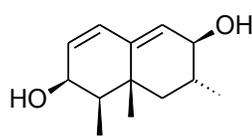
Derivado carbaldehídico I
(citotóxico)
P. paneum SD-44



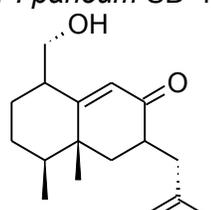
Derivado carbaldehídico II
(citotóxico)
P. paneum SD-44



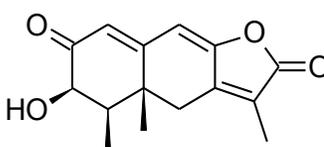
Sesquiterpenoide
eremofilánico I (citotóxico)
Penicillium sp. PR19 N-1



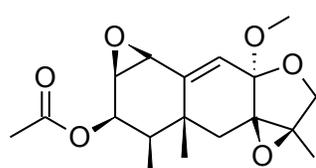
Sesquiterpenoide
eremofilánico II (citotóxico)
Penicillium sp. PR19 N-1



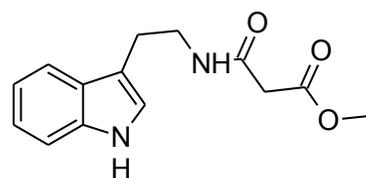
Sesquiterpenoide
eremofilánico III (citotóxico)
Penicillium sp. PR19 N-1



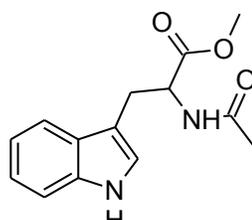
Sesquiterpenoide
eremofilánico IV
(citotóxico)
Penicillium sp. PR19 N-1



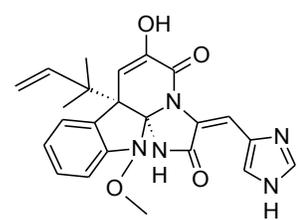
Sesquiterpenoide
eremofilánico V (citotóxico)
Penicillium sp. PR19 N-1



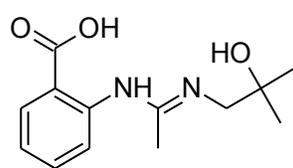
Alcaloide indólico (citotóxico)
P. commune SD-118



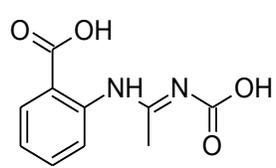
Alcaloide indólico
(citotóxico)
P. commune SD-118



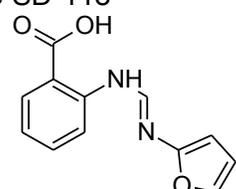
Alcaloide indólico (citotóxico)
P. commune SD-118



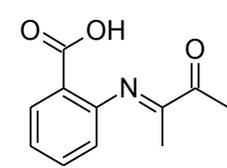
Penipacida A
(citotóxico)
P. paneum SD-44



Penipacida C
(citotóxico)
P. paneum SD-44



Penipacida E
(citotóxico)
P. paneum SD-44



Penipacida E
derivado (citotóxico)
P. paneum SD-44

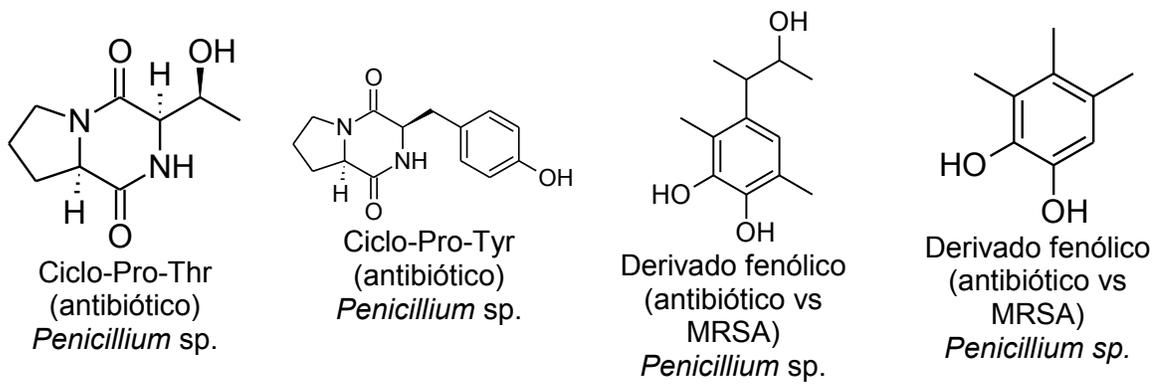


Figura 4. Metabolitos selectos aislados a partir del género *Penicillium*.

2. HIPÓTESIS

2.1. Los hongos microscópicos aislados a partir de fuentes naturales varias (suelo, agua, líquenes, plantas, entre otros) procedentes de diversos hábitats inexplorados, representan a los candidatos idóneos para la obtención de NEQs.

2.2. La selección de especies fúngicas con base en los resultados obtenidos a partir de ensayos de citotoxicidad y estudios de derreplicación, constituye un punto de partida para la obtención de metabolitos secundarios con posible aplicación en la terapéutica como agentes anticancerígenos.

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo como parte de una línea de investigación enfocada en la búsqueda de nuevas especies fúngicas a partir de hábitats inexplorados de nuestro país, con el objetivo de realizar el aislamiento de metabolitos biodinámicos novedosos a partir de éstas especies y contribuir con ello al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, y también generar nuevos conocimientos sobre la biodiversidad microbiana de nuestro país.

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

- 1.- Realizar el aislamiento del mayor número de especies de hongos microscópicos presentes en muestras de suelo y fuentes vegetales procedentes de hábitats inexplorados de México, mediante técnicas microbiológicas convencionales.
- 2.- Obtener los cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos aislados a partir de las muestras de suelo y/o plantas seleccionadas.
- 3.- Realizar la preparación de los cultivos fúngicos en pequeña escala de las especies aisladas con la finalidad de obtener los extractos orgánicos correspondientes mediante el empleo de técnicas de maceración y de reparto.
- 4.- Realizar la evaluación de la actividad citotóxica y los estudios de derreplicación de cada uno de los extractos orgánicos preparados.
- 5.- Preparar los cultivos en mediana escala de al menos dos de las especies fúngicas más activas, con base en los resultados obtenidos de las evaluaciones biológicas y análisis de derreplicación.
- 6.- Realizar el fraccionamiento primario de los extractos orgánicos de las especies fúngicas seleccionadas mediante el uso de técnicas cromatográficas convencionales.
- 7.- Realizar el aislamiento, la purificación y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las especies fúngicas objeto de estudio.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio

El aislamiento de las especies fúngicas endófitas se realizó a partir de frutos asintomáticos de una palma perteneciente al género *Attalea*, colectados en la localidad de Sayulita, Nayarit (20° 51' 57" N; 105° 27' 16" O; **Figura 5**). Para cada muestra recolectada se realizó un proceso de limpieza con agua con el objetivo de retirar residuos de tierra, sustancias extrañas y/o microorganismos que pudieran alterar la integridad del material recolectado. Posteriormente, la muestra se cortó en fragmentos pequeños (1–2 mm²), los cuales fueron esterilizados superficialmente mediante lavados sucesivos con una solución de EtOH (95%; 10 segundos), una de NaClO (70%; 2 min) y finalmente con una solución de EtOH (70%; 2 min). Todos los fragmentos se mantuvieron en condiciones de esterilidad hasta su posterior inoculación en los medios de crecimiento adecuados. El crecimiento de los microorganismos se realizó en tubos de reacción Eppendorf con capacidad de 1.5 mL conteniendo medio de agar papa dextrosa (PDA) o medio de extracto de malta (MEA), colocando un fragmento de la muestra en cada tubo (10 tubos por cada medio de cultivo PDA y MEA). Una vez detectado algún crecimiento, proceso que tardó entre 7 y 30 días, el micelio de las diferentes colonias se transfirió en condiciones estériles a cajas de Petri con medio PDA y se verificó su pureza mediante el análisis morfológico a nivel macroscópico.

El aislamiento de los hongos saprófitos se llevó a cabo a partir de una muestra de suelo colectada en las faldas del volcán de San Martín Tuxtla, Veracruz (18° 30.421" N; -95° 12.538" O; **Figura 6**). El aislamiento de los microorganismos a partir de esta muestra se realizó utilizando el método de dilución. Brevemente, 500 mg de la muestra libre de material extraño (restos de raíces, piedras, etc.) fue diluida con agua estéril hasta obtener las concentraciones finales de 1:100, 1:1000 y 1:10000 p/v. Todas las diluciones se realizaron por triplicado.



Figura 5. Ubicación geográfica de la región de Sayulita, en el estado de Nayarit ($20^{\circ} 51' 57''$ N; $105^{\circ} 27' 16''$ O).

A continuación, 1 mL de cada dilución fue vertido en cajas de Petri estériles, y enseguida se adicionaron 10 mL de medio de cultivo PDA que contenía estreptomicina (30 mg/L) y el colorante rosa de bengala (50 mg/L). Todas las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 2–5 días con fotoperiodos de luz-obscuridad 12/12 horas hasta detectar crecimiento microbiano (micelio). Una vez detectada la formación de micelio, cada colonia fue transferida a tubos de reacción (50 tubos con cada medio de cultivo PDA y MEA) para su crecimiento y purificación.

4.2 Preparación de los cultivos en pequeña y mediana escala

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de las muestras seleccionadas (inciso 4.1 de esta sección experimental), se realizó la preparación de los cultivos en pequeña escala en medio sólido. Para ello se llevó a cabo la preparación de los correspondientes inóculos en 15 mL de medio líquido de extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%) y dextrosa (2%) (YESD), en agitación constante (100 rpm) por 5 días, con el propósito de favorecer el crecimiento de los organismos mediante el incremento de la biomasa. Al cabo de este período de fermentación, cada cultivo líquido fue vertido sobre la superficie

de un sustrato sólido (15 g de arroz/30 mL agua), en matraces Erlenmeyer de 125 mL. Este proceso de fermentación se llevó a cabo durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-obscuridad 12/12 horas.

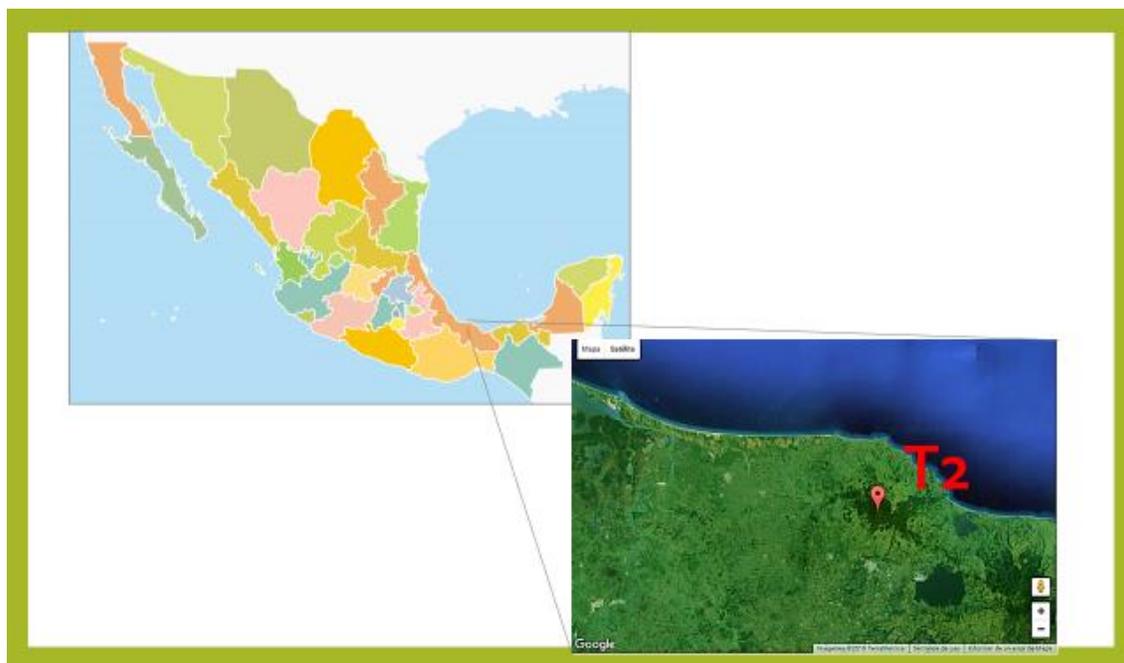


Figura 6. Ubicación geográfica del volcán de San Martín, en la localidad de San Andrés Tuxtla, en el estado de Veracruz ($18^{\circ} 30.421''$ N; $-95^{\circ} 12.538''$ O).

Por otra parte, los cultivos en mediana escala fueron realizados siguiendo la misma estrategia metodológica descrita en el párrafo anterior, utilizando 75 g de arroz/150 mL agua ($10\times$) y las mismas condiciones de fermentación.

4.3 Preparación de extractos orgánicos

La preparación de los extractos orgánicos en pequeña y/o mediana escala se realizó a partir de los fermentados preparados en el inciso 4.2. Así, una vez transcurrido el tiempo de crecimiento de los organismos fúngicos en el sustrato sólido, a cada cultivo se le adicionaron entre 5–10 mL de MeOH, la suspensión anterior se mantuvo en reposo durante 15 min a temperatura ambiente, con la finalidad de realizar el registro digital

correspondiente (fotografía de la superficie y base del matraz con el cultivo sólido). Posteriormente, se realizó el proceso de extracción mediante la técnica de maceración a temperatura ambiente y con agitación constante (100 rpm) durante 24 horas, empleando como disolvente de extracción una mezcla de CHCl_3 -MeOH (1:1) [utilizando 90 mL de mezcla para los cultivos en pequeña escala y 150 mL de mezcla para los cultivos en mediana escala]. Transcurrido este periodo de extracción, el extracto orgánico resultante se separó del medio de cultivo mediante un proceso de filtración utilizando un embudo Büchner. Enseguida, al extracto orgánico obtenido se le adicionó una mezcla [6:4 H_2O - CHCl_3] a los cultivos en pequeña escala y [9:6 H_2O - CHCl_3] para los cultivos en mediana escala, la solución anterior se mantuvo en agitación constante durante 20 minutos. A continuación se realizó la separación de las fases orgánica y acuosa, utilizando un embudo de separación, la fase acuosa resultante se sometió a un proceso de reparto utilizando CHCl_3 (100 y 150 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente). La fase de cloroformo obtenida de esta última extracción se llevó a sequedad a presión reducida, y posteriormente, fue resuspendida en una mezcla de MeCN-MeOH (1:1) [60 mL y 120 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente] y se sometió a un segundo proceso de reparto utilizando hexano con la finalidad de eliminar las grasas y derivados de ácidos grasos presentes (60 mL y 120 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente). La fracción de hexano se desechó y la fracción orgánica resultante después del desgrase se evaporó a sequedad a presión reducida.

4.4 Estudios de derreplicación

Los estudios de derreplicación para establecer de manera preliminar el contenido metabólico de los extractos orgánicos preparados (**inciso 4.3**) se realizaron siguiendo la metodología descrita por El-Elimat y colaboradores (2013) utilizando a la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS). Todos los análisis se realizaron en un cromatógrafo de líquidos marca Waters (Waters Corp., MA, EUA) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA), empleando una columna Acquity BEH C_{18} [1.7 μm , 2.1 \times 100 mm]. La

elución se realizó con una mezcla binaria constituida por MeCN (**A**)–H₂O (0.1% ácido fórmico; **B**), utilizando un gradiente de elución lineal con una composición inicial del 15% **A** e incrementando la composición hasta 100% **A** en 8 minutos, y manteniendo esta última mezcla de elución isocrática por 1.5 min, y regresando finalmente a las condiciones iniciales en 0.5 minutos. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se efectuaron utilizando el programa Empower versión 2.0 (Waters). Todas las muestras se analizaron a una temperatura de 40°C a una concentración de 2 mg/mL.

Los análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HRESIMS) se realizaron por la técnica de ionización por electrospray (ESI) en los modos positivo y negativo (ESI⁺ y ESI⁻, respectivamente) en un espectrómetro de masas Thermo LTQ Orbitrap XL (ThermoFisher Inc., MA, EUA). Las condiciones de análisis del equipo en el modo de ionización positivo fueron las siguientes: temperatura del capilar: 275°C, 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 empleadas fueron: temperatura del capilar: 275°C, 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 a 25 y 20 (unidades arbitrarias) para el modo positivo y negativo, respectivamente. El control del instrumento y el análisis de los datos se realizaron utilizando el programa Xcalibur 2.1 (Thermo).

4.5 Ensayo de citotoxicidad

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos se realizó utilizando el método de microdilución con el colorante sulforodamida B contra dos líneas celulares [HeLA (cáncer cervical) y MCF7 (cáncer de mama)]. Las líneas celulares fueron conservadas en medio RMPI 1640 enriquecido con suero fetal bovino (10%), y se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y 100% de humedad relativa, hasta obtener células en fase logarítmica de crecimiento (aproximadamente 10⁴ células).

Brevemente, los ensayos correspondientes se realizaron en placas de Elisa de 96 pozos. Cada pozo contenía 190 μL de la suspensión de células ($\text{células} \times 10^4$) y 40 μL de las muestras a evaluar a las concentraciones de 2 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ disueltas en DMSO (10%). Las cajas se incubaron por 72 horas a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% y 100% de humedad relativa. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. Como control positivo se utilizó vinblastina (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Al cabo del período de incubación, se realizó la fijación celular utilizando 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) e incubando la placa por 30 min a 4°C . Al término del período de incubación, se realizaron lavados sucesivos con agua y la placa se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente a cada pozo, se le adicionaron 100 μL del colorante sulforodamida B al 0.4% en una solución de ácido acético al 1%; a continuación la placa se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Transcurrido este tiempo, el exceso de colorante se eliminó mediante lavados sucesivos con una solución de ácido acético al 1%, enseguida se determinó la absorbancia de las muestras, utilizando un lector de placas de ELISA, marca BIO-RAD modelo 680 a 564 nm adicionando 200 μL de una solución de tris-hidroximetil-aminoetano (TRIS) (10 mM). El porcentaje de inhibición del crecimiento se determinó utilizando la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ inhibición del Crecimiento} = \frac{Abs_{\text{Células+muestras}} - Abs_{\text{blanco}}}{Abs_{\text{Células+DMSO al 10\%}} - Abs_{\text{blanco}}} * 100$$

Las muestras con valores de porcentaje de inhibición mayores al 80% a la concentración más alta evaluada (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) fueron consideradas como activas para este ensayo.

4.6 Fraccionamiento del extracto orgánico P30-4 y aislamiento de los metabolitos mayoritarios presentes

El fraccionamiento primario del extracto orgánico en mediana escala identificado con la clave **P30-4** (1.5 g) se llevó a cabo mediante una cromatografía en columna abierta (CCA) empacada con gel de sílice (375 g). Como fase móvil se emplearon hexano, mezclas de Hex- CHCl_3 y CHCl_3 -MeOH, en orden creciente de polaridad

(Cuadro 1). Este proceso cromatográfico generó un total de 16 fracciones, las cuales fueron reunidas de acuerdo a su similitud cromatográfica en un conjunto de 8 fracciones primarias (F_P30-4₁-F_P30-4₈).

Cuadro 1. Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto orgánico P30-4.

Sistema de elución	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave/Peso (mg)
Hexano	1		
Hex-CHCl ₃ (9:1)	2	1-3	F_P30-4 ₁ (8.4)
Hex-CHCl ₃ (8:2)	3		
Hex-CHCl ₃ (7:3)	4	4	F_P30-4 ₂ (30.0)
Hex-CHCl ₃ (6:4)	5		
Hex-CHCl ₃ (1:1)	6	5-6	F_P30-4 ₃ (63.9)
Hex-CHCl ₃ (4:6)	7		
Hex-CHCl ₃ (3:7)	8	7-8	F_P30-4 ₄ (231.7)
Hex-CHCl ₃ (2:8)	9		
Hex-CHCl ₃ (1:9)	10	9-10	F_P30-4 ₅ (93.2)
CHCl ₃	11	11	F_P30-4 ₆ (78.5)
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	12	12	F_P30-4 ₇ (857.6)
CHCl ₃ -MeOH (8:2)	13		
CHCl ₃ -MeOH (7:3)	14		
CHCl ₃ -MeOH (6:4)	15	13-16	F_P30-4 ₈ (326.4)
MeOH	16		

Enseguida, con la finalidad de analizar la complejidad de cada una de las fracciones primarias obtenidas (**cuadro 1**), se realizó una análisis de las mismas mediante una cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Waters, equipado con dos detectores uno de PDA y otro de dispersión de luz evaporativo (ELSD); este último empleando las siguientes condiciones de análisis: ganancia 100; presión de gas (N₂) 40 psi, nebulizador en modo de calentamiento y temperatura del tubo: 50°C ± 25°C. El control del equipo, el procesamiento y manipulación de los datos se realizó utilizando el programa Empower versión 3.0 (Waters). Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo utilizando una columna Phenomenex Gemini C₁₈ (5 µm, 4.6 × 250 mm); fase móvil: MeCN (**A**) y agua (0.1% ácido fórmico; **B**); gradiente de elución: 40% → 100% (**A**); tiempo de corrida: 30 min; flujo: 1 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir del análisis cromatográfico realizado (**Figura 7**), se seleccionó a la fracción **F_P30-4₅** (93.2 mg), con base en su rendimiento y en la complejidad mostrada en el perfil cromatográfico obtenido, para realizar la separación y purificación del componente mayoritario presente. Esta separación se realizó mediante el escalamiento de las condiciones de análisis utilizadas a nivel analítico en una columna preparativa Phenomenex Gemini C₁₈ (5 μm, 21.2 × 250 mm); fase móvil: MeCN (**A**) y agua (1% ácido fórmico) (**B**): gradiente de elución: 20% → 100% (**A**); tiempo de corrida: 25 min; flujo: 21.24 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm; tiempo de recolección: 13 segundos (**Figura 8**). Este procedimiento permitió el aislamiento del compuesto **1** (5.1 mg, *t_R* 11.0 min) identificado como la dihidrocoarctatina (Burrows *et al.*, 1975; Nakazawa *et al.*, 2013).

4.7 Fraccionamiento primario del extracto T2-1 y aislamiento de los metabolitos secundarios mayoritarios

El extracto orgánico **T2-1** (3.2 g) fue fraccionado de manera preliminar mediante una CCA empacada con 375 g de gel de sílice como fase estacionaria. Como sistemas de elución se utilizaron hexano, mezclas entre Hex-CHCl₃ y CHCl₃-MeOH, en orden creciente de polaridad (**Cuadro 2**), este procedimiento permitió la obtención de 16 eluatos que fueron reunidos con base en su similitud cromatográfica en un conjunto de 8 fracciones primarias (**F_T2-1₁-F_T2-1₈**).

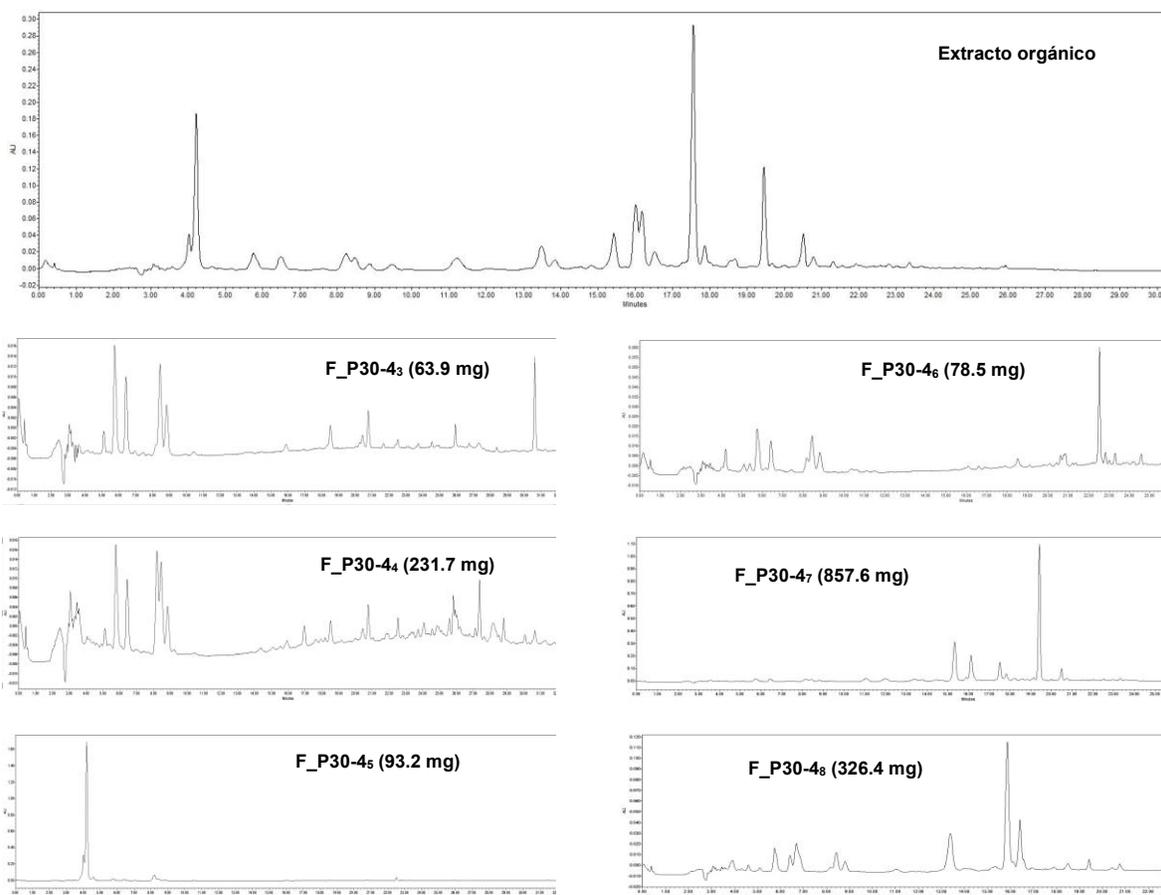


Figura 7. Análisis cromatográfico por HPLC a nivel analítico de las fracciones primarias del extracto orgánico **P30-4** ($\lambda=254$ nm).

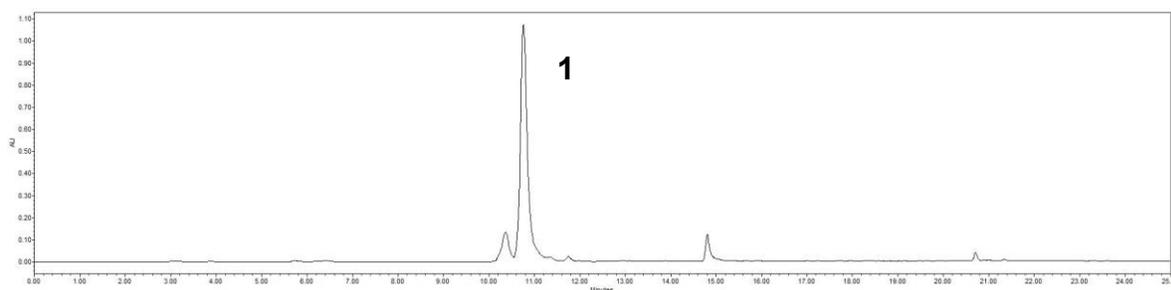


Figura 8. Fraccionamiento secundario de la fracción **F_30-4₅** por HPLC a nivel preparativo en fase reversa ($\lambda = 254$ nm).

El análisis cromatográfico de estas ocho fracciones primarias (**Cuadro 2**), mediante HPLC a nivel analítico utilizando las mismas condiciones de análisis indicadas en el inciso 4.7 de esta sección experimental (**Figura 9**) permitió seleccionar a las fracciones **F_T2-1₃** (225.5 mg) y **F_T2-1₅** (939.3 mg) con base en su rendimiento y en la

complejidad cromatográfica presentada. El cromatograma resultante del análisis de la **F_T2-1₃** se ilustra en la **Figura 7** y como se puede observar, la fracción contiene un pico mayoritario, la resolución cromatográfica de esta fracción permitió la obtención de 225 mg del compuesto (**2**). El aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en la fracción **F_T2-1₅** se realizó mediante HPLC a nivel preparativo [Phenomenex Gemini C₁₈ (5 μm, 21.2 × 250 mm); fase móvil: MeCN (**A**) y agua (1% ácido fórmico) (**B**); gradiente de elución: 40% → 100% (A); tiempo de corrida: 25 min; flujo: 21.24 mL/min; longitud de onda de detección: 254 nm]. La resolución de la fracción **F_T2-1₅** (**Figura 10**) también permitió el aislamiento de un componente mayoritario (**3**; 4.5 mg; t_R 15.9 min).

Cuadro 2. Fraccionamiento primario mediante CCA del extracto **T2-1**.

Sistema de elución	Fracciones	Fracciones reunidas	Clave/Peso (mg)
Hexano	1		
Hex-CHCl ₃ (9:1)	2	1-3	F_T2-1 ₁ (134.5)
Hex-CHCl ₃ (8:2)	3		
Hex-CHCl ₃ (7:3)	4		
Hex-CHCl ₃ (6:4)	5	4-5	F_T2-1 ₂ (91.8)
Hex-CHCl ₃ (1:1)	6		
Hex-CHCl ₃ (4:6)	7	6-7	F_T2-1 ₃ (225.5)
Hex-CHCl ₃ (3:7)	8	7 (banda)	F_T2-1 ₄ (83.1)
Hex-CHCl ₃ (2:8)	9		
Hex-CHCl ₃ (1:9)	10	8-11	F_T2-1 ₅ (939.3)
CHCl ₃	11		
CHCl ₃ -MeOH (9:1)	12	12	F_T2-1 ₆ (679.7)
		12 (banda)	F_T2-1 ₇ (275.2)
CHCl ₃ -MeOH (8:2)	13		
CHCl ₃ -MeOH (7:3)	14	13-16	F_T2-1 ₈ (919.7)
CHCl ₃ -MeOH (6:4)	15		
MeOH	16		

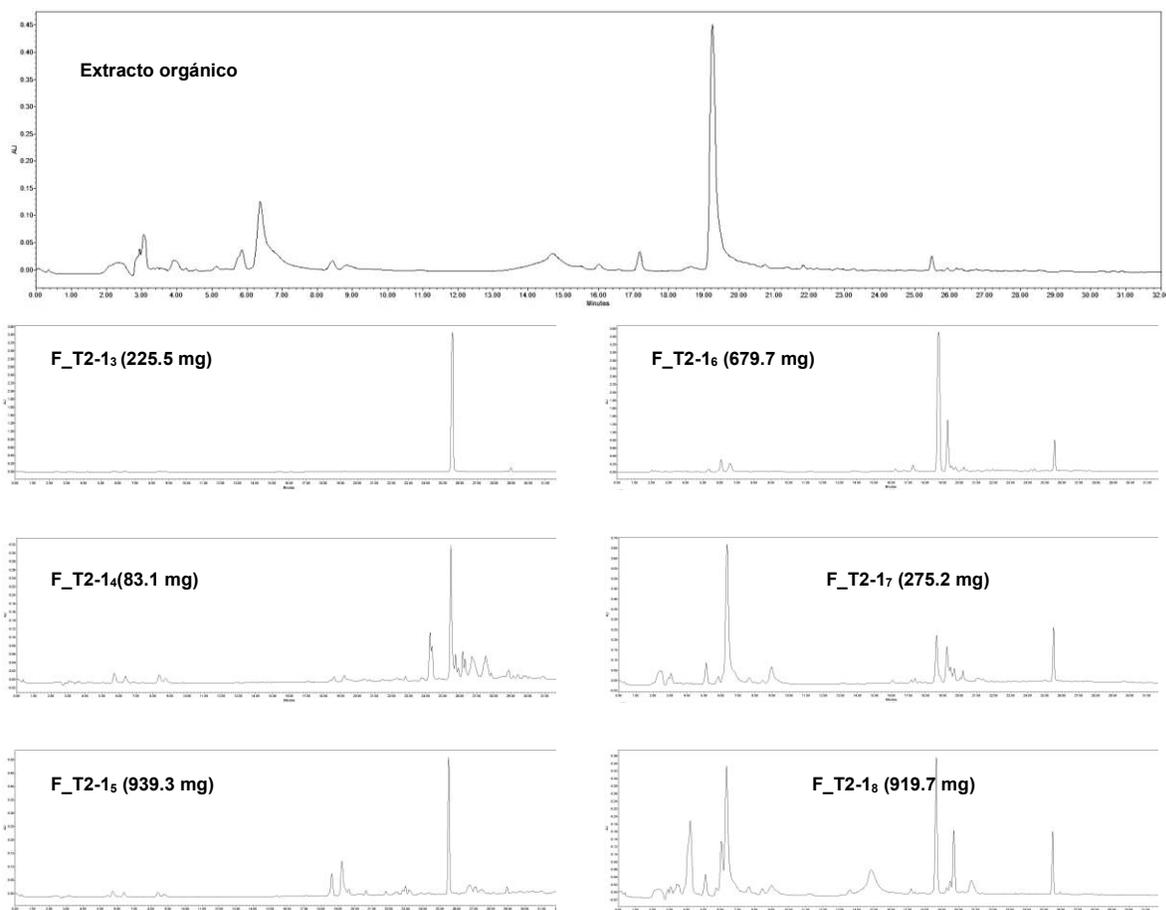


Figura 9. Análisis cromatográfico por HPLC analítico de las fracciones primarias del extracto T2-1 ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

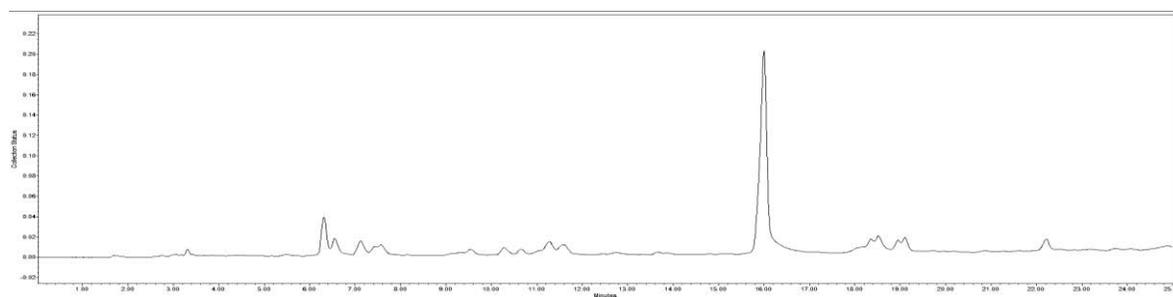


Figura 10. Fraccionamiento secundario de la fracción F_T2-1₅ mediante HPLC a nivel preparativo en fase reversa ($\lambda = 254 \text{ nm}$).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el desarrollo del presente proyecto se pretende, por una parte continuar con la búsqueda de metabolitos bioactivos novedosos con actividad citotóxica aislados a partir de organismos fúngicos selectos, y por otra parte, establecer la información que permita justificar el potencial de la gran biodiversidad microbiana inexplorada de nuestro país, en el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diversos tipos de cáncer.

La estrategia metodológica general utilizada para la realización de este trabajo se resume a continuación (**Esquema 1**). En primer lugar, se efectuaron los aislamientos de los organismos fúngicos a partir de muestras vegetales y de suelo volcánico, para obtener a los cultivos axénicos, una vez obtenidos estos cultivos se realizó la preparación de los extractos orgánicos en pequeña escala, con la finalidad de efectuar las evaluaciones preliminares de actividad biológica y estudios de derreplicación, que permitan realizar la selección de los candidatos idóneos para la obtención de metabolitos secundarios novedosos y bioactivos.

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos orgánicos se realizó utilizando el método de microdilución con el colorante sulforodamida B contra dos líneas celulares [HeLA (cáncer cervical) y MCF7 (cáncer de mama)]. Por otra parte, los estudios de derreplicación utilizando a la cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS), se efectuaron con el objetivo de explorar el contenido metabólico de los extractos, para así poder establecer si las especies aisladas producen micotoxinas y/o metabolitos de interés. A continuación se realizó el estudio químico de dos de las especies más activas seleccionadas, mediante diversas técnicas cromatográficas convencionales, que permitieron la separación y purificación de los metabolitos secundarios de interés.

Los resultados generados a través de la aplicación de esta estrategia metodológica se discutirán en dos partes. La primera abarca los aspectos más importantes del aislamiento

de los microorganismos fúngicos a partir de sus fuentes naturales, así como la evaluación biológica y los estudios de derreplicación de todos los organismos fúngicos endófitos y/o saprótrofos aislados. En la segunda parte, se describen los aspectos relacionados con la investigación química de las dos especies más activas seleccionadas.



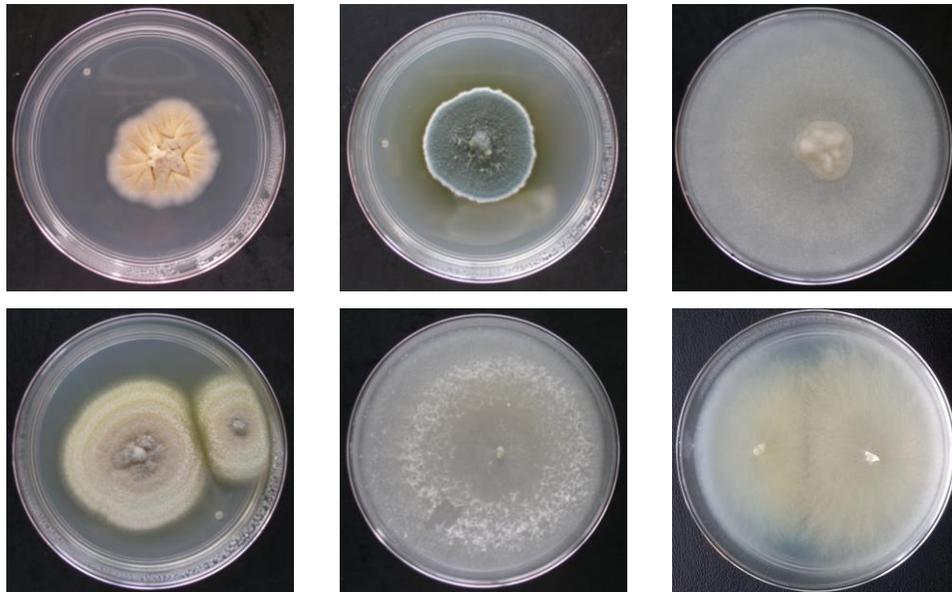
Esquema 1. Resumen de la estrategia metodológica empleada en esta investigación.

5.1 Aislamiento y selección de los organismos fúngicos objeto de estudio

Las muestras seleccionadas para realizar el aislamiento de los taxones de interés fueron de dos tipos una proveniente de material vegetal (frutos) y la otra de suelo volcánico, ya que la diversidad estructural de los metabolitos secundarios depende en gran medida de la influencia del medio ambiente, y en el caso particular del suelo volcánico, la posibilidad que proporciona este hábitat para aislar organismos adaptados a condiciones adversas con una capacidad metabólica desarrollada para sobrevivir en estas condiciones es indudable. El aislamiento de los microorganismos a partir de las fuentes naturales se realizó utilizando diversas técnicas microbiológicas descritas con

detalle en el inciso 4.1 de la sección experimental, obteniéndose los aislamientos axénicos de 67 organismos fúngicos de los cuales, 9 son organismos endófitos y 58 son organismos saprótrofos. En la **Figura 11** se ilustran a manera de ejemplo los archivos digitales de algunas de las especies aisladas.

Saprótrofos



Endófitos

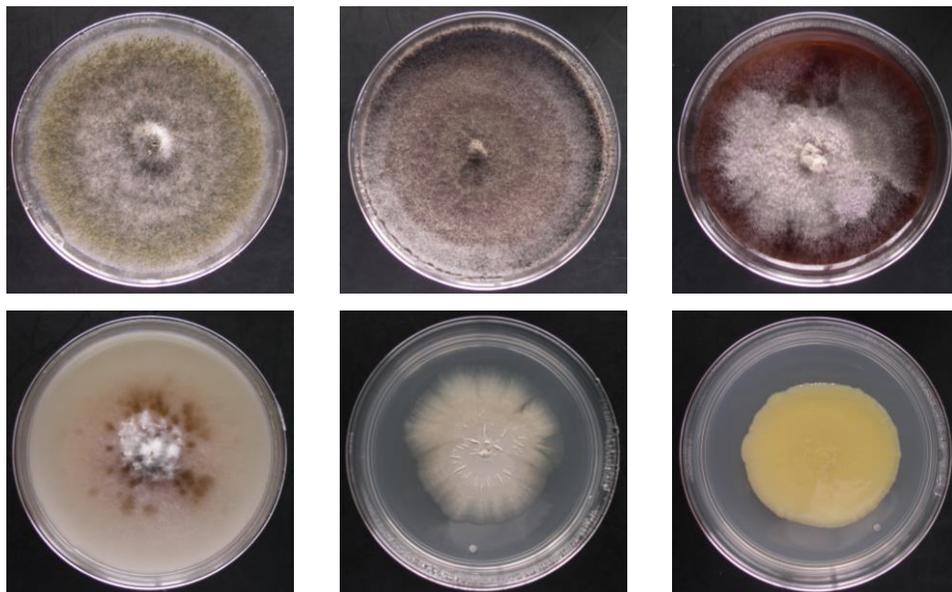


Figura 11. Ejemplos selectos de las especies endófitas y saprótrofas aisladas a partir de las fuentes naturales seleccionadas.

A continuación, se realizó la fermentación de todas las especies fúngicas aisladas en pequeña escala. Para este propósito, se prepararon los cultivos en sustrato sólido (arroz). Una vez transcurrido el período de fermentación, se obtuvieron los extractos orgánicos correspondientes utilizando las técnicas de maceración y de reparto (inciso 4.3). Posteriormente, la selección de las especies objeto de estudio se efectuó en dos etapas. En la primera todos los extractos orgánicos fueron evaluados para determinar su potencial citotóxico, utilizando las líneas celulares HeLA y MCF7 de carcinoma humano, a las concentraciones de 2 y 20 µg/mL. Esta evaluación se realizó con la finalidad de obtener información acerca del potencial citotóxico de las especies aisladas y con base en los resultados obtenidos realizar la selección de los candidatos idóneos para la obtención de compuestos bioactivos. Los resultados obtenidos en esta evaluación biológica se resumen en la **Tabla 1**.

Como se desprende de estos resultados, esta evaluación permitió establecer que de los ocho extractos orgánicos obtenidos a partir de los organismos endófitos aislados de una palma del género *Attalea*, en la localidad de Sayulita, Nayarit, cinco presentaron una actividad significativa inhibitoria del crecimiento celular de las líneas ensayadas con un porcentaje de inhibición del 80% a la concentración de 20 µg/mL, esta actividad fue selectiva contra la línea celular de HeLA, siendo la especie endófito identificada con la clave **P30-4** la única que presentó actividad contra las dos líneas celulares utilizadas en el ensayo. Por otra parte, en el caso de los organismos saprotrófos aislados a partir de la muestra de suelo recolectada sobre coladas de lava del volcán de San Martín, San Andrés Tuxtla, Veracruz, su evaluación permitió establecer que de los 58 taxones ensayados, solo ocho presentaron una actividad significativa, y de nueva cuenta la mejor actividad biológica se presentó a la dosis más alta ensayada contra las dos líneas celulares.

Tabla 1. Resultados del ensayo de citotoxicidad de los diferentes taxones aislados.						
Clave	Fuente de obtención	Ensayo de Citotoxicidad				Rendimiento (mg)
		HeLA		MCF7		
		2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	

ENDÓFITOS						
P30-20	<i>Attalea sp.</i>	195.57	108.62	142.21	115.61	365.5
P30-19	<i>Attalea sp.</i>	89.81	21.88	107.05	78	127.0
P30-18	<i>Attalea sp.</i>	98.72	83.57	100.45	66.51	40.8
P30-15	<i>Attalea sp.</i>	141.33	154.12	124.32	104.41	139.0
P30-10	<i>Attalea sp.</i>	79.18	-20.98	98.61	63.03	280.0
P30-8	<i>Attalea sp.</i>	72.96	50.63	157.44	129.4	64.6
P30-6	<i>Attalea sp.</i>	111.64	128.8	176.2	102.97	142.1
P30-4	<i>Attalea sp.</i>	72.42	-60.63	79.43	-5.87	73.3
SAPRÓTROFOS						
T2-1	Suelo	90.17	-5.26	102.78	66.01	64.3
T2-2	Suelo					
T2-3	Suelo					
T2-4	Suelo	107.6	45.79	75.8	53.44	47.1
T2-5	Suelo					
T2-6	Suelo					
T2-7	Suelo					
T2-8	Suelo					
T2-9	Suelo					
T2-10	Suelo					
T2-11	Suelo					
T2-12	Suelo					
T2-13	Suelo					
T2-14	Suelo	131.04	58.99	71.95	45.31	37.0
T2-15	Suelo					
T2-16	Suelo					
T2-17	Suelo					
T2-18	Suelo					
T2-19	Suelo					
T2-20	Suelo					
T2-21	Suelo					
T2-22	Suelo					
T2-23	Suelo					
T2-24	Suelo					
T2-25	Suelo	97.19	31.98	102.26	40.68	82.3
T2-26	Suelo	105.86	69.83	205.51	86.95	37.7
T2-27	Suelo					
T2-28	Suelo					
T2-29	Suelo	207.45	173.51	75.43	79.51	46.8
T2-30	Suelo					
T2-31	Suelo					
T2-32	Suelo					
T2-33	Suelo					
T2-34	Suelo					
T2-35	Suelo					
T2-36	Suelo					
T2-37	Suelo					
T2-38	Suelo					
T2-39	Suelo					
T2-40	Suelo	148.42	53.72	78.42	19.35	139.4
T2-41	Suelo					
T2-42	Suelo					
T2-43	Suelo					

T2-44	Suelo					
T2-45	Suelo	259.99	109.99	75.81	38.71	34.4
T2-46	Suelo	124.1	60.27	146.1	65.7	240.7
T2-47	Suelo					
T2-48	Suelo					
T2-49	Suelo					
T2-50	Suelo					
T2-51	Suelo					
T2-52	Suelo	215.91	-19.18	96.2	7.34	21.1
T2-53	Suelo	227.96	154.06	90.29	62.72	141.3
T2-54	Suelo	198.2	37.69	77.78	43.41	143.8
T2-55	Suelo	28.1	27.29	72.42	59.63	21.5
T2-56	Suelo	33.31	-24.26	82.32	80.56	309.7
T2-57	Suelo	87.29	62.07	105.47	82.45	54.7
T2-58	Suelo					
T2-59	Suelo	209.13	181.42	98.3	84.29	17.0
T2-60	Suelo	194.52	151.81	89.69	48.48	61.6

Como se observa en la **Tabla 1**, las cepas saprótroficas identificadas con las claves **T2-55** y **T2-56** mostraron la mejor actividad contra la línea celular HeLA a las dos concentraciones evaluadas. Así, con base en el análisis de estos resultados las cepas con las claves **P30-4**, **P30-8**, **P30-10**, **P30-19**, **T2-1**, **T2-4**, **T2-14**, **T2-25**, **T2-40**, **T2-52** y **T2-54-T2-56** se consideraron como posibles candidatos para su estudio químico considerando su actividad biológica, pudiendo establecer de manera preliminar que estas cepas contienen principios citotóxicos que apoyan la obtención de metabolitos biodinámicos.

En la segunda etapa de selección, se realizaron los estudios de derreplicación utilizando la técnica de UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, como se indica en el inciso **4.4** siguiendo el procedimiento desarrollado por El-Elimat *et al.*, 2013 (**Figura 12**). Estos estudios se realizaron con la finalidad de establecer si las muestras de análisis contenían micotoxinas; los hongos microscópicos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios estructuralmente diversos y con una amplia gama de actividades biológicas, no obstante, estos organismos también son una fuente importante para la producción de micotoxinas, las cuales son de gran interés debido a la elevada toxicidad que presentan (El-Elimat *et al.*, 2013).

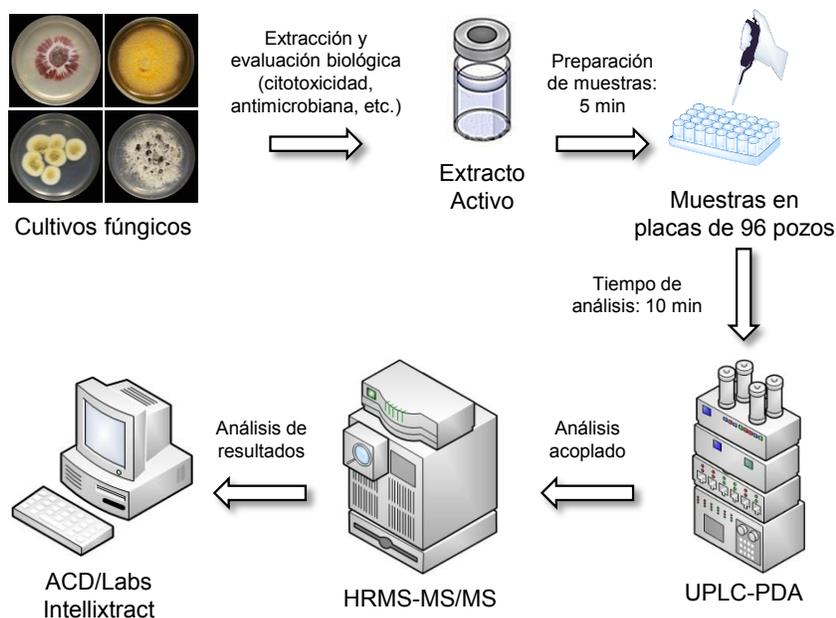


Figura 12. Diagrama de flujo que resume la estrategia metodológica de los estudios de derreplicación de los extractos orgánicos (adaptado de El-Elimat *et al.*, 2013).

Los análisis comparativos de los espectros de masas generados y tiempos de retención de cada una de las muestras analizadas con aquellos reportados en la base de datos del equipo permitieron establecer que en ninguno de los 67 extractos analizados se detectó la presencia de micotoxinas (**Figura 13**).

Con base en los resultados derivados de la evaluación la actividad biológica, estudios de derreplicación, rendimiento y complejidad cromatográfica, se seleccionaron a las cepas endófitas y saprófitas con las claves **P30-4** y **T2-1**, respectivamente, como candidatas para su estudio químico.

Posterior a la selección de los taxones de interés, se realizó la identificación de los microorganismos seleccionados a partir del análisis del ADN genómico; mediante la amplificación por la técnica de PCR del marcador molecular ITS-4 (espaciador de transcripción interno 4) y su secuenciación; para realizar el análisis filogenético de las secuencias obtenidas mediante el alineamiento local (BLAST) y la comparación con aquellos datos moleculares reportados para especies relacionadas. Con base en los

resultados obtenidos a partir de estos análisis las cepas fúngicas objeto de estudio fueron identificadas, en colaboración con el Dr. Huzefa Raja de la Universidad de Carolina del Norte, en Greensboro (UNCG) como pertenecientes a los géneros *Chaetomium* sp. (**P30-4**) y *Penicillium* sp. (**T2-1**)

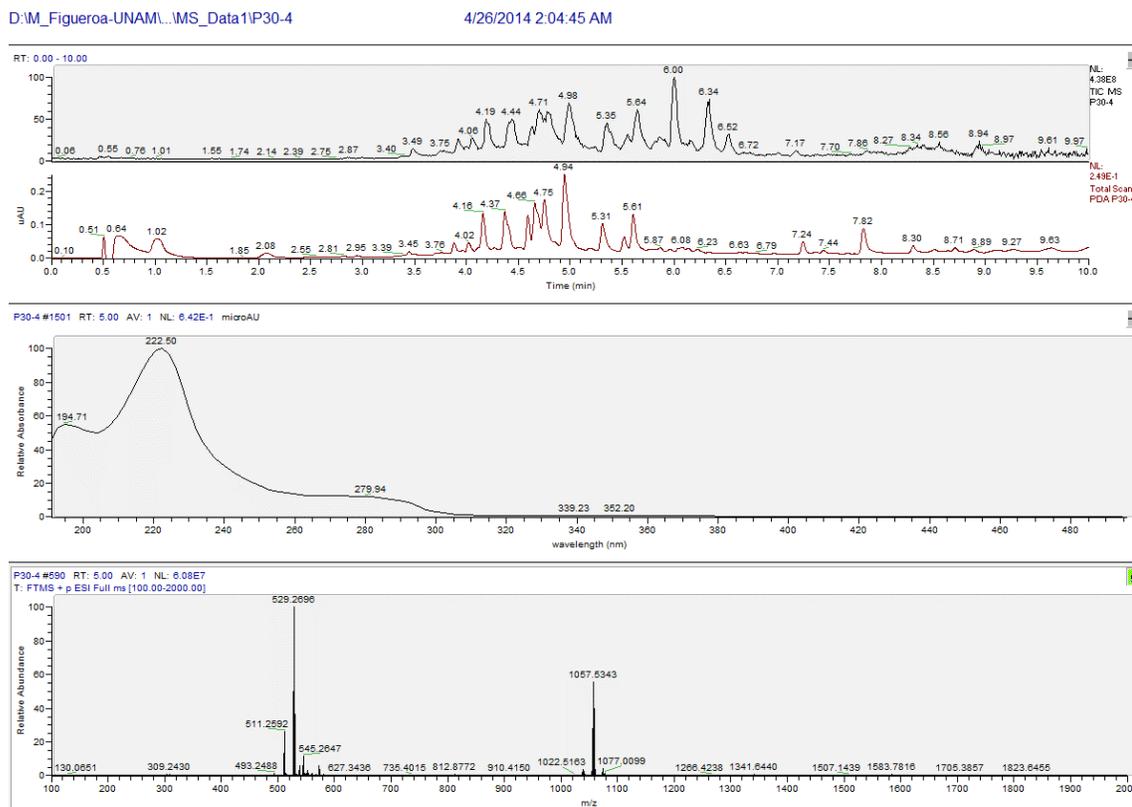


Figura 13. Ejemplo del análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS de la muestra **P30-4** (a) Cromatograma TIC y (b) por UPLC-PDA ($\lambda = 254$ nm) de los metabolitos mayoritarios identificados; (c) Espectro de UV y (d) de HR-ESI(+)-MS del pico observado en un t_R de 4.94 min

5.2 Estudio químico de las especies fúngicas *Chaetomium* sp. (P30-4) y *Penicillium* sp. (T2-1)

Con la finalidad de aislar a los metabolitos responsables de la actividad biológica que presentaron los cultivos en pequeña escala de las cepas identificadas como *Chaetomium* sp. y *Penicillium* sp. (**Figura 14**) se realizó la fermentación de ambos microorganismos en mediana escala. Los cultivos en mediana escala se prepararon

como se indica en la sección 4.2 de la parte experimental. La preparación de los extractos orgánicos a partir de los cultivos en mediana escala se prepararon utilizando el mismo procedimiento descrito para los cultivos en pequeña escala.

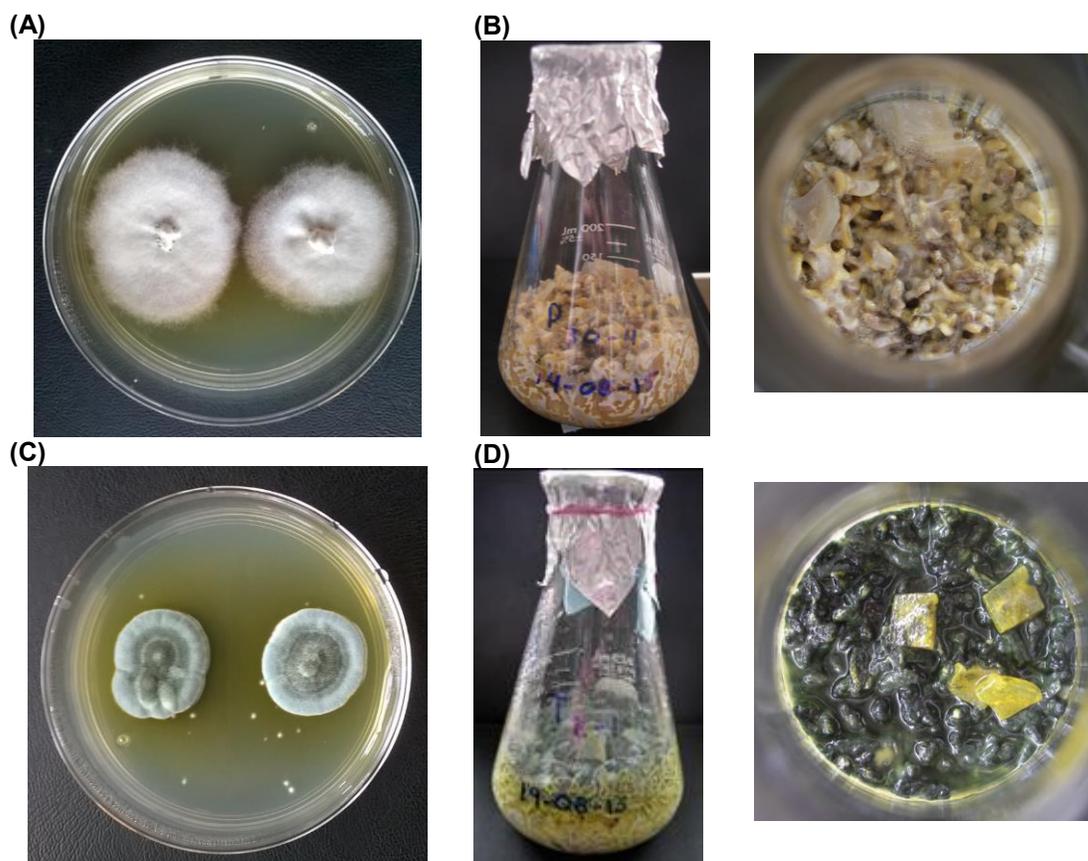


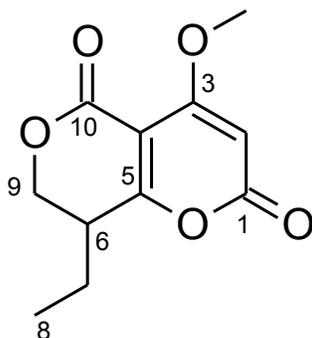
Figura 14. Especies fúngicas *Chaetomium* sp. (P30-4) y *Penicillium* sp. (T2-1) [(A y C) cultivos axénicos en medio PDA y (B y D) cultivos sólidos].

5.2.1 Estudio químico de la especie *Chaetomium* sp.

El extracto crudo derivado del cultivo de la especie *Chaetomium* sp. (1.5 g) se sometió a una CCA utilizando gel de sílice como fase estacionaria, este proceso condujo a la obtención de ocho fracciones primarias (F_P30-4₁-F_P30-4₈). La purificación por HPLC de la fracción F_P30-4₅ (93.2 mg) condujo al aislamiento de 5.1 mg de la dihidrocoarctatina (1).

5.2.1.1 Caracterización estructural de la dihidrocoarctatina (1)

La elucidación estructural del compuesto **1** se realizó mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. El espectro de masas generado por la técnica de electrospray (ESIEM) del compuesto **1** presenta un ión molecular en una relación masa carga (m/z) de 225.69 $[M+H]^+$ (**Figura 15**). Este ion molecular corresponde con la fórmula $C_{11}H_{12}O_5$. Los espectros de RMN (**Cuadro 3**, **Figuras 16 y 17**) del producto presentan un perfil policétido de tipo pirano-pirano-diona (Burrows *et al.*, 1975; Seto *et al.*, 1978; Nakazawa *et al.*, 2013). Las características más importantes de los espectros de RMN se resumen a continuación:



Dihidrocoarctatina (**1**).

- En δ_H 5.53 se observa un singulete asignable a un protón vinílico vecino a un grupo carbonilo del núcleo base. En el espectro de ^{13}C RMN las señales para este anillo pirano aparecen δ_C 160.7 (C-1), 88.8 (C-2), 167.3 (C-3), 101.6 (C-4) y 173.6 (C-5). El conjunto de señales recién descrito sugiere la presencia de un anillo piran-1-ona trisustituido, así mismo el desplazamiento de las señales en δ_C 101.6 y 173.6, indica que dos de los sustituyentes del anillo pirano son de carácter vinílico y cuaternarios.
- En δ_H 4.46 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, H-9a) y 4.31 (dd, $J = 9.0, 3.0$ Hz, H-9b) se observan dos dobletes asignables a los protones de un grupo metileno vecino a un heteroátomo, en el espectro de ^{13}C RMN esta señal se observa en δ_C 66.8 (C-9).

- c) En δ_H 3.93 se aprecia un singulete correspondiente a un grupo metoxilo unido a una doble ligadura. Esta señal correlaciona con la absorción en δ_C 56.9.
- d) Finalmente, se aprecian también un conjunto de señales asociadas con la presencia de un residuo de n-propilo, estas señales se observan en δ_H 1.09 (t, $J = 6.0$ Hz, H–8), 1.78 (dd, $J = 6.0, 3.0$ Hz, H–7a), 1.94 (dd, $J = 6.0, 3.0$ Hz, H–7b) y 2.76 (dd, $J = 6.0, 3.0$ Hz, H–6) en el espectro de 1H RMN y en δ_C 11.4, 22.2 y 38.8 en el espectro de ^{13}C RMN.

Tabla 2: Datos espectroscópicos de RMN de la dihidrocoarctatina (**1**). 1H y ^{13}C RMN 300 MHz y 100 MHz, respectivamente. (CDCl₃)

Posición	δ_H (ppm)	δ_C (ppm)
1	-	160.8
2	5.53 (s, 1H)	88.8
3	-	167.3
4	-	101.6
5	-	173.6
6	2.76 (dd, 6.0, 3.0 Hz, 1H)	38.8
7	a) 1.78 (dd, 6.0, 3.0 Hz, 1H) b) 1.94 (dd, 6.0, 3.0 Hz, 1H)	22.2
8	1.09 (t, 6.0 Hz, 3H)	11.4
9	a) 4.31 (dd, 9.0, 3.0 Hz, 1H) b) 4.46 (dd, 9.0, 3.0 Hz, 1H)	66.8
10	-	158.9
3-OCH ₃	3.93 (s, 3H)	56.9

Con base en las evidencias presentadas, este producto natural se caracterizó con el nombre trivial de la dihidrocoarctatina (**1**). Los datos espectroscópicos de **1** se encuentran en perfecta armonía con los descritos por Nakazawa y colaboradores (2013), en donde describen su obtención a partir de una cepa de *C. globosum* genéticamente manipulada. Por otra parte, otras investigaciones realizadas por Burrows y colaboradores en 1975, describen el aislamiento de la coarctatina a partir de la especie *C. coarctatum* y la preparación de su dihidro derivado, la dihidrocoarctatina (**1**) mediante hidrogenación catalítica. Así, este es el segundo reporte del aislamiento del producto **1** a partir de una fuente natural.

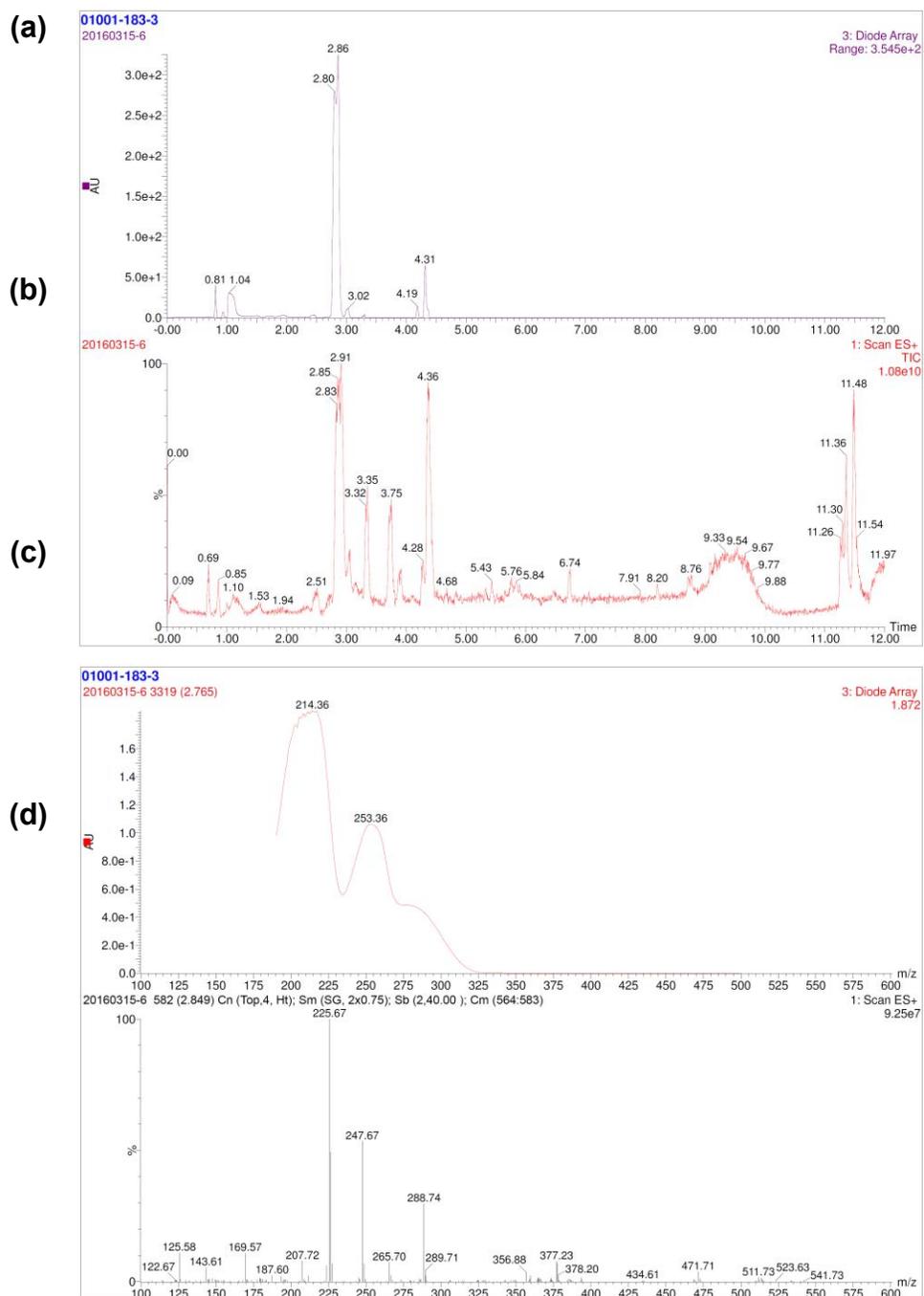


Figura 15. UPLC-PDA-ESIMS del compuesto **1**: **(a)** Cromatograma por UPLC-PDA y **(b)** TIC en modo (+). **(c)** Espectro de UV ($\lambda = 254$ nm) y **(d)** de masas del pico en 2.85 min.

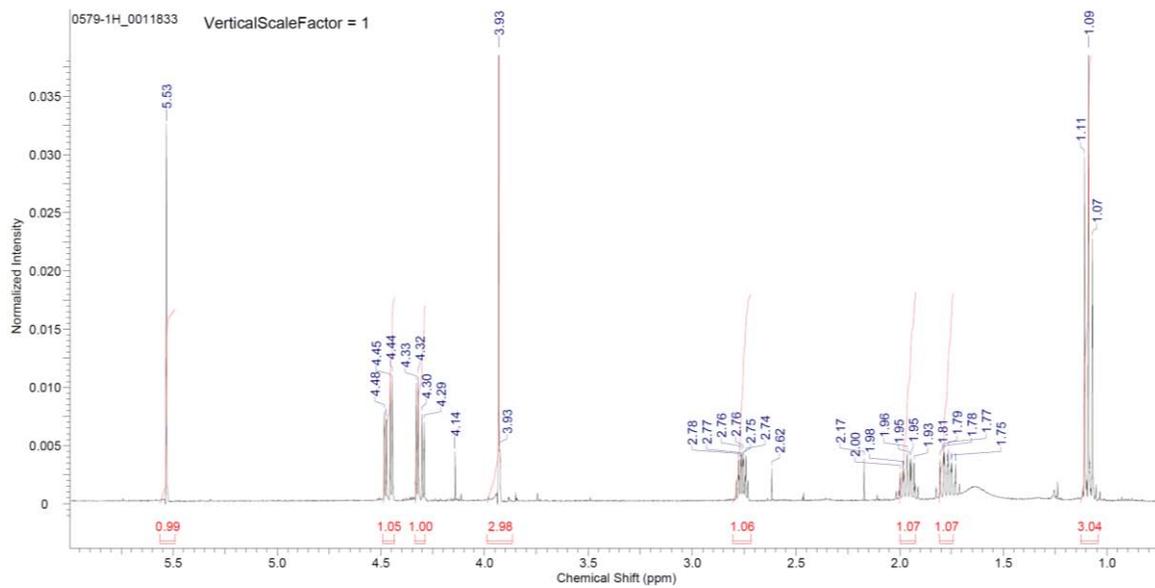


Figura 16. Espectro de ^1H RMN de la dihidrocoarctatina (1).

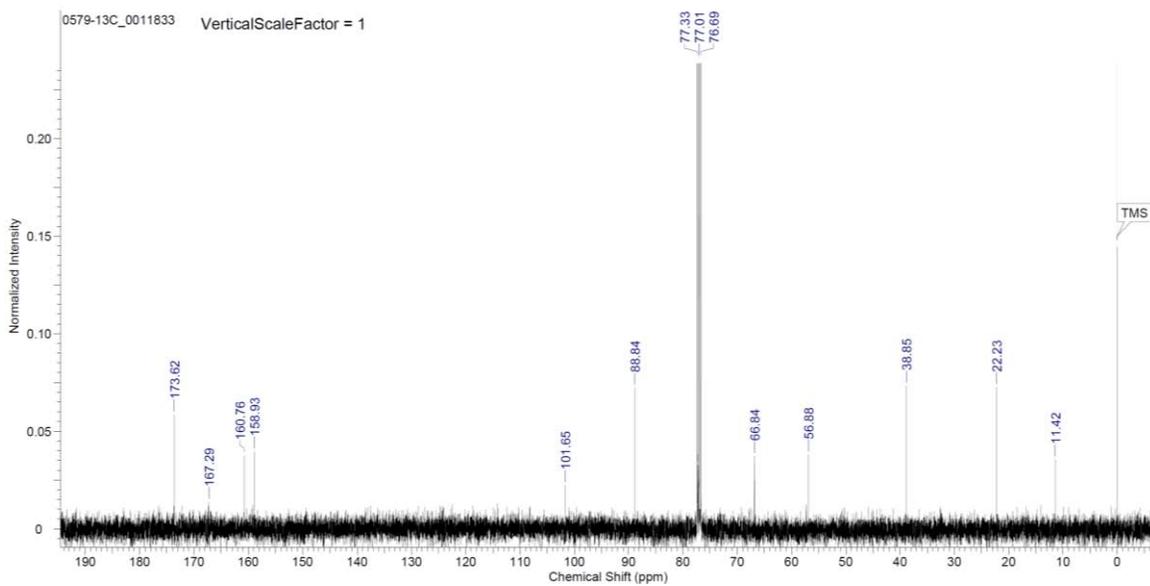


Figura 17. Espectro de ^{13}C RMN de la dihidrocoarctatina (1).

5.2.2 Estudio químico de la especie *Penicillium* sp.

El extracto orgánico derivado de la cepa *Penicillium* sp. (3.2 g) se sometió a un fraccionamiento preliminar por CCA utilizando como eluyentes hexano, mezclas de hexano-cloroformo y cloroformo-metanol y metanol con incrementos de polaridad. Este proceso permitió la obtención de un conjunto de ocho fracciones primarias (**F_T2-1₁**–**F_T2-1₈**). La purificación por HPLC de las fracciones **F_T2-1₃** y **F_T2-1₅** permitió el aislamiento de los productos **2** (225 mg) y **3** (4.5 mg), respectivamente. Los espectros de masas generados por la técnica de electrospray en la modalidad positiva y negativa de estos productos se ilustran en las **Figuras 18 y 19**, en donde se puede observar que el ion molecular para ambos productos corresponde una m/z de 328 uma. Es importante mencionar que los experimentos espectroscópicos generados a la fecha para la caracterización estructural de los compuestos **2** y **3**, han resultado insuficientes para establecer su estructura, por lo que es necesario realizar otros experimentos complementarios que permitan establecer de manera inequívoca la estructura de los mismos.

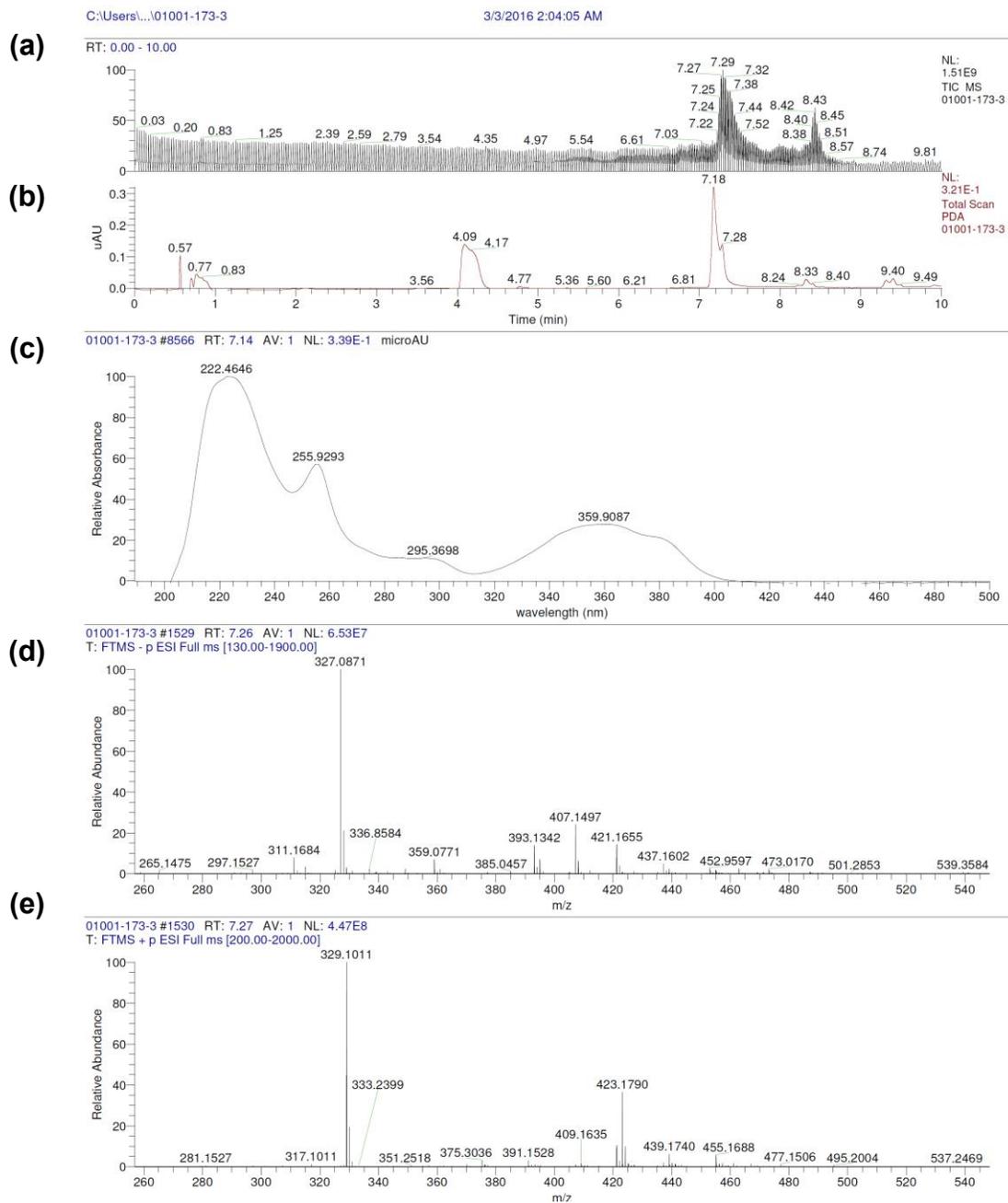


Figura 18. Cromatogramas TIC **(a)** y en el UV-PDA **(b)** del compuesto **2**. Espectro en el UV ($\lambda = 254$ nm) **(c)** y de masas por la técnica de electrospray en modo (-) **(d)** y (+) **(e)**.

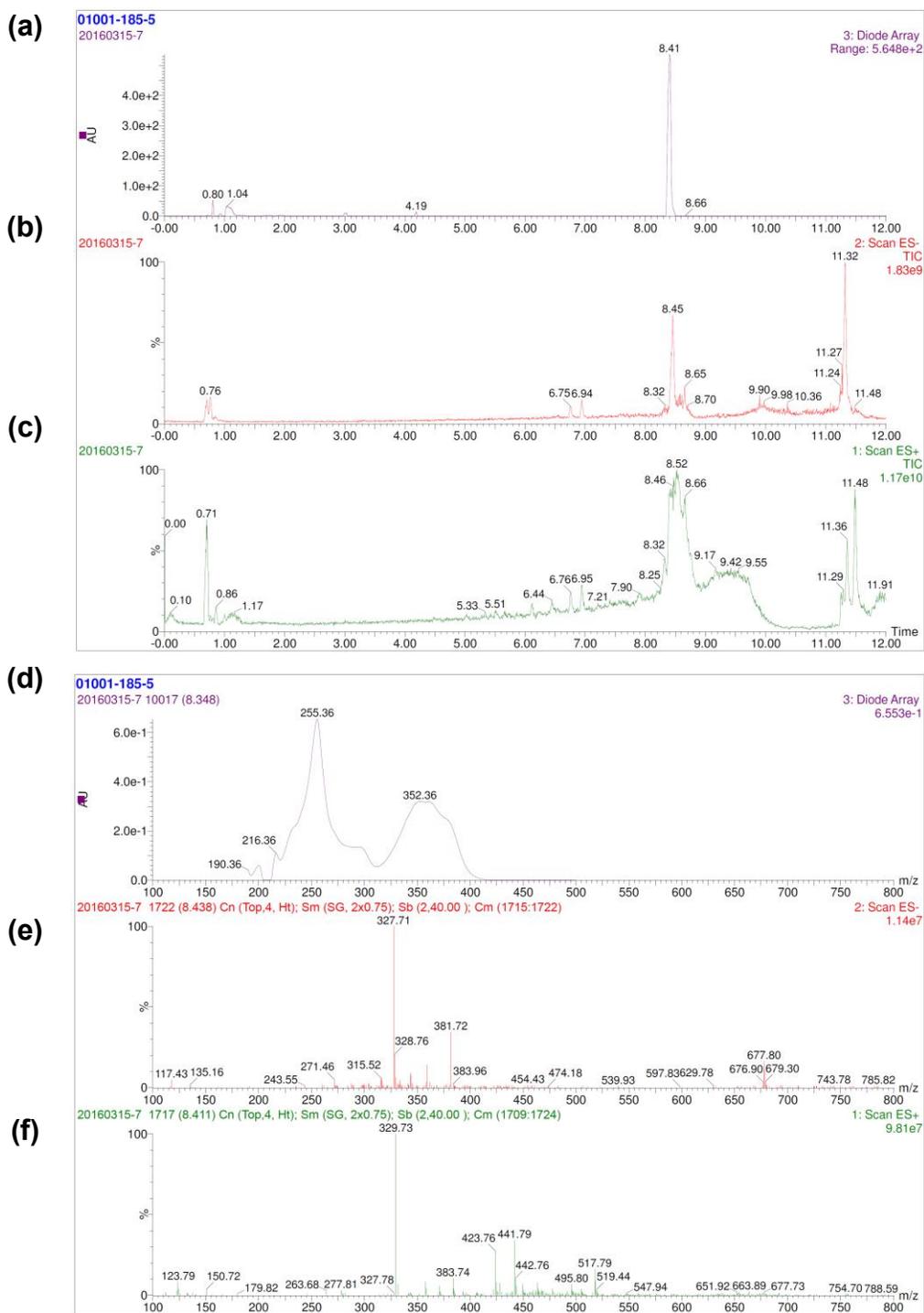


Figura 19. Cromatogramas en el UV-PDA (a), TIC-(+) (b) y TIC(-) (c) del compuesto 3. Espectro en el UV ($\lambda = 254$ nm) (d) y de masas por la técnica de electrospay en modo (-) (e) y (+) (f).

6. CONCLUSIONES

- En la presente investigación a partir de dos diferentes fuentes naturales una proveniente de material vegetal (frutos) y la otra de suelo volcánico, se realizó el aislamiento axénico de 67 especies fúngicas, 9 endófitas y 58 saprótrofas.
- Los resultados de la presente investigación indican que la selección de microorganismos mediante la aplicación de los ensayos biológicos apropiados constituye una estrategia adecuada para la selección de nuevas especies fúngicas con actividad citotóxica. Por otra parte, la selección de los taxones aislados mediante los resultados preliminares de su contenido metabólico (estudios de derreplicación), garantiza el aislamiento de productos biodinámicos con estructuras novedosas.
- El estudio químico de la cepa endófitas perteneciente al género *Chaetomium* sp. (**P30-4**) permitió el aislamiento de la dihidrocoarctatina (**1**), un policétido ya reportado en la especie *Chaetomium globosum*, y este trabajo representa el segundo reporte del aislamiento del producto a partir de una fuente natural. Por otra parte, a partir de la especie saprótrofa perteneciente al género *Penicillium* sp. (**T2-1**), se realizó el aislamiento de dos compuestos mayoritarios (**2 y 3**), los cuales se encuentran en proceso de caracterización.

7. PERSPECTIVAS

- Continuar con la caracterización estructural de los productos **2 y 3** aislados en la presente investigación a partir de la cepa seleccionada **T2-1** para establecer de manera inequívoca su estructura molecular, además de determinar si representan NEQs.

- Realizar la evaluación de la actividad citotóxica de los productos aislados (**1–3**) utilizando el mismo ensayo de monitoreo que permitió establecer la actividad potencial de los microorganismos seleccionados como agentes citotóxicos. Por otra parte, también se pretende continuar con la identificación a nivel molecular de todos los taxones aislados.

- Establecer la configuración absoluta del compuesto **1** mediante el análisis de su rotación óptica.

_. Finalmente, se pretende continuar con el estudio químico de las dos especies fúngicas seleccionadas en la presente investigación.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Acosta, E., *et al.*, **2014**. Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 76-81.
- Alvin, A., Miller, K.I. & Neilan, B.A., **2014**. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds. *Microbiological Research*, 169, 483-495.
- Andrade, C. B., Quilles, M. B. & Iracilda, Z. C., **2013**. Chap. 16: Natural products with activity against multidrug-resistant tumor cells. In fighting multidrug resistance with herbal extracts, essential oils & their components. Academic Press, Elsevier Inc., Massachusetts, USA., 237-244.
- Baker, S. & Satish, S., **2012**. Endophytes: Natural warehouse of bioactive compounds. *Drug Invention Today*, 4(11), 548-553.
- Bass, D. & Richards, T.A., **2011**. Three reasons to re-evaluate fungal diversity "on Earth and in the ocean". *Fungal Biology Reviews*, 25, 159-164.
- Bautista-López, 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.
- Blatt, T.T., *et al.* **2013**. Anticancer and antifungal compounds from *Aspergillus*, *Penicillium* and other filamentous fungi. *Molecules*, 8, 11338-11376.
- Burrows, B. F.; *et al.*, **1975**. 8-etilideno-7,8-dihidro-4-metoxipirano[4,3-b]piran-2,5-diona (coarctatina), a metabolite of *Chaetomium coarctatum*. *Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 999.
- Cook, A. & Meyers, R., **2003**. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16s rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1907-1915.
- Cragg, G. M. & Newman, D. J., **2013**. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 3670-3695.
- Debbab, A. *et al.*, **2009**. Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. isolated from *Salvia officinalis* growing in Morocco. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 13(2), 229-234.

- Deshmukh, S. K., Verekar, S. A. & Bhave S. V., **2015**. Endophytic fungi: A reservoir of antibacterials. *Frontiers in Microbiology*, 5(715), 1-44.
- Du, L., *et al.*, **2014**. Crowdsourcing natural products discovery to access uncharted dimensions of fungal metabolite diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(3), 804–809.
- Fajardo-Hernández, C.A., **2015**. *Aislamiento e identificación de metabolitos biodinámicos a partir de la especie endófito Biscogniauxia sp.* – Tesis de licenciatura para obtener el grado de Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Guzmán, G., **1998**. Inventorying the fungi of Mexico. *Biodiversity and Conservation*, 7, 369-384.
- Harvey, A.I., **2008**. Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13, 894-901.
- Huang, R.M., *et al.*, **2014**. An update on 2,5-diketopiperazines from marine organisms. *Marine Drugs*, 12, 6213-6235.
- Ireland, C.M., Aalbersberg, W., **2003**. Anticancer agents from unique natural products sources. *Pharmaceutical Biology*, 41, 15-38.
- Kingston, D.G.I., **2011**. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *Journal of Natural Products*, 74(3), 496-511.
- Kozlovskii, A.G., Zhelifonova, V.P. & Antipova, T.V., **2013**. Fungi of the genus *Penicillium* as producers of physiologically active compounds (review). *Applied Biochemistry & Microbiology*, 49(1), 1-10.
- Kozlovskii, A.G., Zhelifonova, V.P. & Antipova, T.V., **2015**. Biosynthesis of biologically active low-molecular weight compounds by fungi of the genus *Penicillium* (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(02), 236-241.
- Kusari, S., Hertweck, C. & Spiteller, M., **2012**. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites. *Chemistry and Biology*, 19, 792-798.
- Kusari, S., Singh, S. & Jayabaskaran, C., **2014**. Biotechnological potential of plant-associated endophytic fungi: Hope versus hype. *Trends in Biotechnology*, 32(6), 297-303.
- Milshteyn, A., *et al.*, **2014**. Mining the metabiome: Identifying novel natural products from microbial communities. *Chemistry and Biology*, 21, 1211-1223.

- Mioso, R., Toledo, F.J. & Herrera, I., **2014**. *Penicillium roqueforti*: A multifunctional cell factory of high value-added molecules. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 781-791.
- Mishra, B. B. & Tiwari, V. K., **2011**. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 4769-4807.
- Mishra, Y., *et al.*, **2014**. Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: A review. *Microbial and Biochemical Technology*, S8(1).
- Momesso, L.S., *et al.*, **2008**. Chaetoglobosins produced by *Chaetomium globosum*, endophytic fungus found in association with *Viguiera robusta* Gard (Asteraceae). *Quimica Nova*, 31(7), 1680-1685.
- Monge, A., *et al.*, **2000**. Medicinal chemistry in the development of societies: Biodiversity and natural products. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 35, 1121-1125.
- Nakazawa, T., *et al.*, **2013**. Target Disruption of transcriptional regulators in *Chaetomium globosum* activates biosynthetic pathways and reveals transcriptional regulator-like behavior of aureonitol. *Journal of American Chemical Society*, 135, 13446-13455.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M., **2012**. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335.
- Newman, D. J., **2008**. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(9), 2589-2599.
- Nicoletti, R., Filippis, A. & Buommino, E., **2013**. Antagonistic aptitude and antiproliferative properties on tumor cells of fungal endophytes from the Astroni Nature Reserve, Italy. *African Journal of Microbiology Research*, 7(31), 4073-4083.
- Nigam, P. & Singh, D., **2014**. Production of secondary metabolites-fungi. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 2, 570-578.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). **2015**. Resistencia a los antimicrobianos (nota descriptiva No. 194) [en línea]. Recuperado el 05 de mayo de 2016, de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
- Radic, N. & Strukelj, B., **2012**. Endophytic fungi - the treasure chest of antibacterial substances. *Phytomedicine*, 19, 1270-1284.

- Samaga, P.V., *et al.*, **2014**. Production of an antimicrobial cytochalasan by an endophytic *Chaetomium globosum* HYML55 from *Hypericum mysorens* and its RNA secondary structure analysis. *Chemistry and Ecology*, 30(6), 566-578.
- Schoch, C., Seifert, K., *et al.*, **2012**. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*, 109(16), 6241-6246.
- Seto, H., *et al.*, **1983**. Biosynthesis of 2-(But-1,3-dienyl)-3-hydro-4-(penta-1,3-dienyl)-tetrahydrofuran, a metabolite of *Chaetomium coarctatum*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47 (12), 2935-2937.
- Sette, L.D., *et al.*, **2013**. Microbial culture collections as pillars for promoting fungal diversity, conservation and exploitation. *Fungal Genetics and Biology*, 60, 2-8.
- Silva-Hughes, A.F., *et al.*, **2015**. Diversity and antifungal activity of the endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from the United States. *Microbiological Research*, 175, 67–77.
- Suryanarayanan, T.S., **2013**. Endophyte research: Going beyond isolation and metabolite documentation. *Fungal Ecology*, 6, 561-568.
- Takagi, M. & Shin-Ya, K., **2012**. Construction of a natural product library containing secondary metabolites produced by actinomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 65, 433-447.
- Wang, Y.T., Xue, Y.R. & Liu, C.H., **2015**. A brief review of bioactive metabolites derived from deep-sea fungi. *Marine Drugs*, 13, 4594-4616.
- Ye, Y., *et al.*, **2013**. Flavipin in *Chaetomium globosum* CDW7, an endophytic fungus from *Ginkgo biloba*, contributes to antioxidant activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 7131-7139
- Yu, H., *et al.*, **2010**. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbial Research*, 165, 437-449.
- Zhang, G., *et al.*, **2013**. Antifungal metabolites produced by *Chaetomium globosum* No.4, an endophytic fungus isolated from *Ginkgo biloba*. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 175-180.