



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

“Aislamiento e identificación de metabolitos  
biodinámicos a partir de las especies fúngicas  
*Phoma macrostoma* y *Neosartorya* sp.”

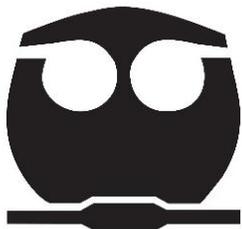
**TESIS**

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

PRESENTA

**JESÚS JONATAN FRAGOSO URBINA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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:**

<b>Presidente:</b>	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
<b>Vocal:</b>	Dra. Rachel Mata Essayag
<b>Secretario:</b>	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
<b>1<sup>er</sup> suplente:</b>	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
<b>2<sup>do</sup> suplente:</b>	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

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:**

---

Jesús Jonatan Fragoso Urbina

## AGRADECIMIENTOS

- Al financiamiento otorgado para el desarrollo de esta investigación a través de los proyectos PAIP-FQ No. 5000-9145, DGAPA-PAPIIT No. IB200213-RR260213, CONACyT CB-2014 No. 236564 y CONACyT INFR-2015-01 No. 252226, a cargo del Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar.
- A los Dres. Rogelio Pereda y Mabel Fragoso (FQ, UNAM) por su apoyo en la realización de los ensayos de citotoxicidad; al Dr. Huzefa Raja (Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, EE.UU.) por su colaboración en la identificación de los organismos fúngicos; y a la Dra. Isabel Rivero Cruz (FQ, UNAM) por su valioso apoyo durante la realización de los estudios químicos de los organismos fúngicos.
- A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), FQ, UNAM, por su apoyo para la realización de los análisis de RMN.
- Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar por permitirme ser parte de su equipo de trabajo y por ser mi tutor de este proyecto. De igual manera quiero agradecerle por sus enseñanzas las cuales me ayudaron en mi desarrollo ético y profesional. Cabe mencionar que hoy y siempre lo consideraré como un padre académico y un gran amigo.
- A la Dra. Rachel Mata Essayag por su gran apoyo durante la realización de este proyecto y revisión del trabajo escrito. Agradezco su generosidad al permitirnos trabajar en su laboratorio y prestarnos sus equipos y reactivos, además de que fue un gran honor ser su alumno. También agradezco a todo su equipo de trabajo ya que fueron grandes compañeros, vecinos, colegas y hermanos en el laboratorio 124.
- A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents por su generosidad en la revisión de este trabajo, además por todos los buenos consejos que me dio. De igual manera quiero manifestarle que la tengo en gran estima.
- Finalmente, a todos mis compañeros de trabajo del laboratorio 125 del conjunto E, de la Facultad de Química, UNAM. Por todos los gratos e inolvidables momentos que pasamos juntos, trabajando con un solo objetivo y de manera armónica, bajo la asesoría de nuestro tutor. Cabe resaltar que siempre los tendré en gran estima.

## DEDICATORIAS

- Con gratitud a mis padres Javier Lucio Fragoso Granados y María Eugenia Urbina López. Por todo su amor incondicional, su dedicación y la paciencia con la que cada día se ocupaban por mi avance académico. Su amor es simplemente único y se refleja en la vida de su hijo amado. Gracias padres amados por ser los principales promotores de mis sueños añorados, nunca cesara mi gratitud hacia ustedes por su infinita confianza en mí y su convicción en mis expectativas, gracias a mi madre por estar siempre dispuesta a acompañarme durante esos días agotadores de estudio, agotadores días en los que su compañía y la llegada de sus tés era semejante para mí como un siervo que clama agua en medio del desierto; gracias a mi padre amado por anhelar siempre lo mejor para mi vida, gracias por cada sabio consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron durante mi vida. Gracias bendito Dios por la vida de mis padres, también porque cada día bendices mi vida con la hermosa dicha de estar y disfrutar al lado de las personas que sé que más me aman, y a las que yo más amo en mi vida. Bendito eres tu Dios por darme a mis padres. Y de igual manera quisiera agradecer a mi hermano Javier Omar Fragoso Urbina, aunque en la mayoría de las veces parece que estuviéramos en una batalla interminable, sin embargo hay momentos en los que la riña cesa y nos unificamos para lograr nuestros objetivos. Gracias a ustedes no solo por ayudarme en gran manera a concluir el desarrollo de esta tesis, sino por todos los gratos momentos que pasamos en el proceso. Por mi infinita gratitud este trabajo es para ustedes.

- Al Dr. José Adrián Sánchez Carrillo por todo su apoyo incondicional durante mi servicio social y por brindarme su amistad, le agradezco por todas sus exhortaciones, enseñanzas y su paciencia, generando grades lecciones hacia mi persona.

- Al profesor Arturo Rosales por brindarme su amistad más allá de las aulas, por abrirme mis ojos, y exhortarme a no ser un conformista.

- Al profesor Gerardo Omar Hernández Segura, por ser mi profesor en ambas asignaturas fisicoquímicas, por brindarme su amistad y por permitirme ser su ayudante en la asignatura de termodinámica.

- A la Dra. Nancy Monroy Jaramillo por enseñarme a trabajar bajo presión y por enseñarme a ser un mejor profesionalista, gracias por enseñarme a sacar lo mejor de mí.
- A mis abuelos: Humberto Urbina Lara, Graciela López Tovar†, Jesús Fragoso Vega† y Amparo Granados Álvarez†. A mi tíos: Ángel Antonio Fragoso Granados† y a su familia, Alfredo Genaro Fragoso Granados y a su familia, Miguel Bartolo Fragoso Granados y a su familia, María de Jesús Fragoso Granados y a su familia, Yolanda Urbina López-Rodolfo Manuel Franco Dardon y a su familia, Juan Ernesto Urbina López y a su familia, Humberto Urbina López y a su familia, María Luisa Urbina López y a su familia, María del Socorro Urbina López y a su familia, Gerardo Urbina López y a su familia. A mis primos: Rodolfo Manuel Franco Urbina, Hilda Nallely Franco Urbina y a su familia, Magaly Franco Urbina, Raziel Fragoso Olvera, Angélica Urbina Cano y a su familia, Emmanuel Mosco Trejo a su familia, Juan Urbina Cano y a su familia, Alán Urbina Cano, Javier Ruiz Urbina, Miguel Fragoso Urban y finalmente a mis sobrinas Brenda Arely Urban Franco y Valeria Franco Urbina.
- A mis amigos genuinos, gracias por ser parte de mis momentos más felices como universitario durante esta gran atravesía, volando todos juntos como las águilas culminando nuevos horizontes, gracias por todo su compañerismo en diferentes circunstancias con el objetivo claro, gracias por su valiosa amistad, quiero manifestar por medio de este presente que los estimo en demasía infinita y de igual manera quiero que sepan que contarán conmigo de manera incondicional: Christian Javier Martínez Galicia, Andrés Martínez Galicia, Cristian Alvarado López, Anahí Romero Vergara, Eliseo Tapia Miguel, Mónica Eréndira Domínguez Barrientos, Mónica Bolaños Martínez, Diana Elizabeth Salinas López, Eduardo Méndez Martínez, Elizabeth González Pedroza, Nury Jiménez Tapia, Paul Ricardo Luna, Luis Alex Filio, Andrés Clarín Savage, Héctor Michel Galindo Hernández, Magali Hernández Razo, Alma Elena Soto Valdez, Paola Navarro Navarrete, Jazmín Urrieta Vázquez, Sebastián Florez Rueda, cDr. Manuel Alejandro Aparicio, Cecy Brunilda Ruizz Alemán, Claudia Escudero Galván, Edgar Sandoval Cordero, Mónica Itzel Martínez Franco, Evelyn Damián García, Ma. Esther Rodríguez Barrena, Stefany

Sophia VG, Marco Tulio Alducin, Carlos Pérez Díaz, Elías Sánchez Serrano, Mario Tenorio, Joaquín Hernández Pérez, Gustavo A. Martínez, Tania Hernández, Kenia Morales Quintero, Paulina García Barbosa, Yesica Paola Rosas Martínez, Ramsés Zenil Hernández, Itzel Aline De la Fuente Castañeda, Miguel Tonalli González Molina, Florencia Soledad Maiza, Delgadillo Huerta Andrés, David Martínez Cortes, Eduardo Negrete Tiro, Ofelia Velázquez García, Rodrigo Pérez Huerta, Araixchel García Fernández, Lizette Mares Gómez, Guadalupe Trejo Santiago, Aldo Eduardo Kuri Alferez, Nancy M. Viridiana Sánchez Lira, Ilse Lucía Vidal Vázquez, Jaqueline Armenta Galicia, Alejandro Felipe Anastasio, José Manuel Montaña Hilario, Sebastián Florez Rueda, Brenda Lucía Martínez Álvarez, Adriana Marisa Ramírez Ramírez, López Pavón Karen Estefanía, Verónica Juárez Montiel, José René Valverde Esparza, Ivette Scarlet Gorostieta Merchand, Paulina Sabanero Lee, Luis Gustavo Peralta López, Alan Iván Valle Corona, Luis Fernando de la Rosa Ortega, Laura Pedro Martínez, Selene Ortega Sánchez, Oscar, Marcos René López Hernández, María Danae Paz Rueda, Guadalupe Guillén de los Santos, Stefany Velázquez Galán, Raúl Enrique Camiña Blando, Zosim Silva Gómez, María Fernanda Trejo Villa, Amaury Cerón Pérez, Anayeli González Torres y Ricardo Alberto Bernal Cortes.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	IX
<b>Lista de cuadros</b> .....	XI
<b>Lista de tablas</b> .....	XII
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Importancia de los hongos microscópicos como una fuente potencial de metabolitos biodinámicos .....	1
1.2 <i>Phoma macrostoma</i> .....	4
1.3 <i>Neosartorya</i> sp. ....	9
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	19
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	20
4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio .....	20
4.2 Identificación de los hongos saprótrofos .....	21
4.3 Preparación de los cultivos fúngicos en sustrato solido (arroz húmedo): pequeña y mediana escala .....	21
4.4 Obtención de los extractos orgánicos a partir de los cultivos sólidos .....	22
4.5 Estudio químico de las especies fúngicas <i>Phoma macrostoma</i> y <i>Neosartorya</i> sp. ....	22
4.5.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>P. macrostoma</i> (T1-86) .....	22
4.5.2 Análisis cromatográficos .....	23
4.5.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF) .....	23

4.5.3	Análisis cromatográfico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) de las fracciones primarias de <i>P. macrostoma</i> .....	23
4.5.3.1	Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción <b>F_T1-86<sub>8</sub></b> .....	24
4.5.4	Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>Neosartorya</i> sp. ( <b>T1-21</b> ) .....	26
4.5.5	Análisis cromatográfico por HPLC de las fracciones primarias de <i>Neosartorya</i> sp. ....	26
4.5.6	Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción <b>F_T1-21<sub>7</sub></b> .....	27
4.6	Estudios de derreplicación .....	28
4.7	Caracterización estructural .....	29
4.8	Ensayo de citotoxicidad .....	29
4.8.1	Cultivo y suspensión de las líneas celulares cancerosas .....	30
4.8.2	Desarrollo del bioensayo .....	30
4.8.3	Determinación de CI <sub>50</sub> .....	31
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>32</b>
5.1	Aislamiento de los microorganismos fúngicos .....	32
5.2	Estudio químico de la especie <i>Phoma macrostoma</i> ( <b>T1-86</b> ) .....	33
5.2.1	Caracterización estructural del compuesto <b>I</b> .....	33
5.2.2	Caracterización estructural del compuesto <b>II</b> .....	38
5.3	Estudio químico de la especie <i>Neosartorya</i> sp. ( <b>T1-21</b> ) .....	42
5.3.1	Caracterización estructural del compuesto <b>III</b> .....	42
5.4	Actividad citotóxica de los productos <b>I</b> y <b>III</b> .....	45
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>47</b>

## Lista de figuras

Figura		Página
1	Efecto de fitopatogenicidad provocado por el hongo <i>Phoma macrostoma</i> en plantas de cardo canadiense ( <i>Cirsium arvense</i> ) .....	4
2	Estructura química de las macrociclinas A y B .....	9
3	Especies de hongos aislados de la muestra de suelo objeto de estudio .....	20
4	Análisis cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción primaria <b>F_T1-86<sub>8</sub></b> ( $\lambda = 290$ nm) .....	25
5	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria <b>F_T1-86<sub>8</sub></b> mediante HPLC a nivel preparativo ( $\lambda = 290$ nm)·	25
6	Análisis cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción primaria <b>F_T1-21<sub>7</sub></b> ( $\lambda = 254$ nm) .....	27
7	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria <b>F_T1-21<sub>7</sub></b> mediante HPLC a nivel preparativo ( $\lambda = 254$ nm)·	28
8	Especies fúngicas <b>T1-86</b> [( <b>A</b> ) cultivo sólido en mediana escala] y <b>T1-21</b> [( <b>B</b> ) cultivo sólido en mediana escala] .....	32
9	Diagrama de flujo de los procesos de fraccionamiento y purificación de los compuestos <b>I</b> y <b>II</b> a partir de la especie <b>T1-86</b> .....	34
10	2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5- <i>trans</i> -propenilfuran-3-ona .....	34
11	Análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto ( <b>I</b> ): ( <b>A</b> ) Cromatograma de corriente total de iones (TIC; arriba) y en el UV-PDA (abajo). Espectro de masas por la técnica de electrospray en modo (+) ( <b>B</b> ), en modo (-) ( <b>C</b> ) y en el UV ( <b>D</b> ) .....	35

<b>12</b>	Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5- <i>trans</i> -propenilfuran-3-ona ( <b>I</b> ) (CDCl <sub>3</sub> δ <sub>H</sub> en ppm) .....	37
<b>13</b>	Espectro de <sup>13</sup> C-RMN (100 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5- <i>trans</i> -propenilfuran-3-ona ( <b>I</b> ) (CDCl <sub>3</sub> δ en ppm) .....	37
<b>14</b>	2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona ( <b>II</b> ) ...	39
<b>15</b>	Análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto ( <b>II</b> ): ( <b>A</b> ) Cromatograma de corriente total de iones (TIC; arriba) y en el UV-PDA (abajo). Espectro de masas por la técnica de electrospray en modo (+) ( <b>B</b> ), en modo (-) ( <b>C</b> ) y en el UV ( <b>D</b> ) .....	40
<b>16</b>	Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (400 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona ( <b>II</b> ) (CDCl <sub>3</sub> δ <sub>H</sub> en ppm) .....	41
<b>17</b>	Espectro de <sup>13</sup> C-RMN (100 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona ( <b>II</b> ) (CDCl <sub>3</sub> δ en ppm) .....	41
<b>18</b>	Diagrama de flujo de los procesos de fraccionamiento y purificación del compuesto <b>III</b> a partir de la especie <b>T1-21</b> ·	43
<b>19</b>	Ácido helvólico [ácido 16-(acetiloxi)-3,7-dioxo-29-nordamara-1,17(20),24-trien-21-oico] .....	43
<b>20</b>	Análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto ( <b>III</b> ): ( <b>A</b> ) Cromatograma de corriente total de iones (TIC; arriba) y en el UV-PDA (abajo). Espectro de masas por la técnica de electrospray en modo (+) ( <b>B</b> ), en modo (-) ( <b>C</b> ) y en el UV ( <b>D</b> ) .....	44
<b>21</b>	Espectro de <sup>1</sup> H-RMN (300 MHz) del ácido helvólico ( <b>III</b> ) (CDCl <sub>3</sub> δ <sub>H</sub> en ppm) .....	45

## Lista de cuadros

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>P. macrostoma</i> .....	23
2	Condiciones de análisis por HPLC a nivel analítico .....	24
3	Fraccionamiento primario del extracto de <i>Neosartorya</i> sp.	26
4	Condiciones de análisis por HPLC a nivel analítico .....	27

## Lista de tablas

Tabla		Página
1	Ejemplos selectos de metabolitos secundarios producidos por hongos microscópicos de importancia farmacéutica y/o agroquímica .....	2
2	Metabolitos secundarios producidos por el género <i>Phoma</i> .....	5
3	Metabolitos secundarios aislados a partir del género <i>Neosartorya</i> .....	10
4	Identificación taxonómica mediante el análisis genético del ITS de las especies objeto de estudio .....	21
5	Resultados de las evaluaciones biológicas, estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados .....	33
6	Análisis comparativo de los datos espectroscópicos de $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN del producto <b>I</b> en $\text{CDCl}_3$ .....	38
7	Análisis comparativo de los datos espectroscópicos de $^1\text{H}$ -RMN y $^{13}\text{C}$ -RMN del producto <b>II</b> en $\text{CDCl}_3$ .....	42

## Lista de abreviaturas

°C	Grado Celsius	m	Múltiplete
[ $\alpha$ ]	Rotación específica	MCF7	Carcinoma de mama
$\delta$	Desplazamiento químico	MEA	Agar extracto de malta y dextrosa
$\lambda$	Longitud de onda	MeCN	Acetonitrilo
$\mu$ g	Microgramo	MeOH	Metanol
$\mu$ L	Microlitro	mg	Miligramo
$\mu$ m	Micrómetro	min	Minuto
$\mu$ M	Micromolar	mL	Mililitro
A375-C5	Melanoma maligno	mM	Milimolar
Abs	Absorbancia	mm	Milímetro
C <sub>18</sub>	Columna de octadecilsilano	MS	Espectrometría de masas
CCA	Cromatografía en columna abierta	<i>m/z</i>	Relación masa-carga
CCF	Cromatografía en capa fina	NCI-H460	Carcinoma bronquioalveolar
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado	nm	Nanómetro
CHCl <sub>3</sub>	Cloroformo	PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media	PC3	Carcinoma de próstata
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	PDA	Agar papa-dextrosa
d	Doblete	PDA	Detector de arreglo de fotodiodos
dd	Doble de dobles	pH	Potencial de hidrogeno
dq	Doble cuarteteado	ppm	Partes por millón
DMSO	Dimetilsulfóxido	psi	Libra-fuerza por pulgada cuadrada
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas	<sup>1</sup> H-RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
ELSD	Detector de dispersión de luz evaporativo	<sup>13</sup> C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
EM	Espectrometría de masas	RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
ESI	Ionización por electrospray	rpm	Revoluciones por minuto
g	Gramo	s	Singulete
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas	SRB	Sulforodamida B
HCT15	Adenocarcinoma colonrectal	t	Triplete
HeLa	Carcinoma de cérvix	TCA	Ácido tricloroacético
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia	t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución	TIC	Corriente total de iones
Hz	Hertz	TRIS	Tris-hidroximetil-aminoetano
ITS	Espaciador interno ribosomal	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
<i>J</i>	Constante de acoplamiento	uma	Unidad de masa atómica
kV	Kilovoltio	UV	Espectro en el ultravioleta
L	Litro	YESD	Extracto de levadura-peptona de soya-dextrosa

## 1. INTRODUCCIÓN

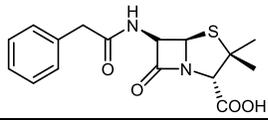
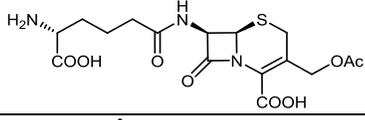
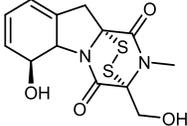
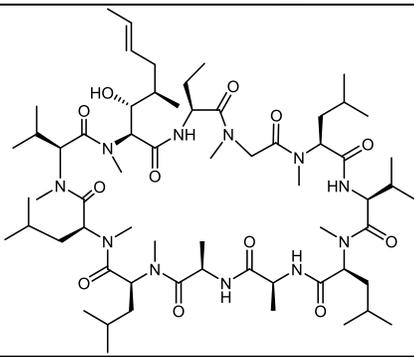
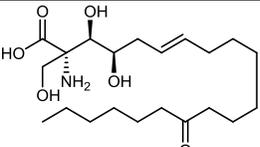
### 1.1 Importancia de los hongos microscópicos como una fuente potencial de metabolitos biodinámicos

El descubrimiento fortuito del hongo filamentoso *Penicillium notatum*, por Alexander Fleming en 1929, y el amplio uso terapéutico de la penicilina durante la segunda guerra mundial, marcaron el comienzo de una nueva era en la medicina denominada "la edad de oro de los antibióticos".<sup>1</sup>

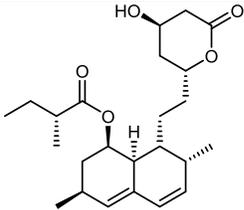
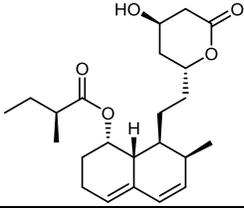
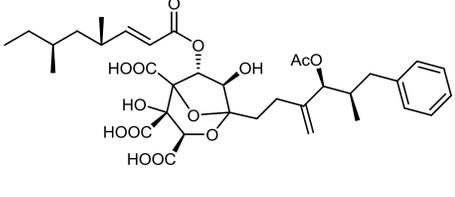
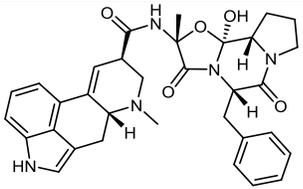
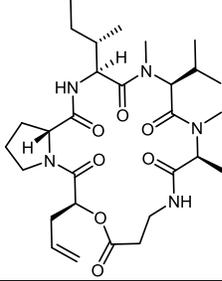
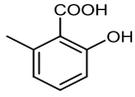
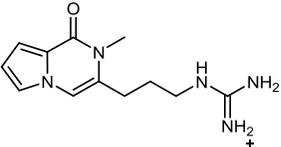
La mejora continua de las técnicas analíticas de separación y purificación de metabolitos biodinámicos, además de los métodos novedosos de búsqueda en fuentes naturales inexploradas, han permitido la obtención de más de 250,000 de productos naturales.<sup>2</sup> De éstos, aproximadamente el 65% han sido obtenidos de plantas y el 19% de microorganismos. De los 40,000 compuestos que se han obtenido hasta el momento estos últimos, el 40% son producidos por bacterias (principalmente por actinomicetos) y el 39% por hongos.<sup>2</sup> Cabe mencionar que estos metabolitos secundarios han incidido de manera importante en el control de enfermedades infecciosas u otros problemas de salud, además de contribuir con el desarrollo de la industria farmacéutica.<sup>3</sup>

Los hongos son organismos eucarióticos caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células intercomunicadas y que en conjunto constituyen el micelio.<sup>4</sup> Estos organismos son muy diversos y cosmopolitas. A la fecha, se han descrito más de 100,000 especies y se estima que podrían existir entre 1,5 y 5 millones de especies a nivel mundial.<sup>5</sup> La clasificación general de estos microorganismos se basa, en primera instancia, en la comparación de las secuencias del gen 18S ribosomal, que permite identificar a varios grupos fúngicos importantes como son: los quitridiomycetos, los zigomicetos, los glomeromicetos, los ascomicetos y los basidiomicetos.<sup>6</sup> Sin embargo, actualmente la identificación taxonómica a nivel de especie se realiza mediante el análisis genético de su espaciador interno ribosomal (ITS).<sup>7</sup>

Los organismos fúngicos juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la biosfera ya que son los principales agentes que participan en la descomposición de la materia orgánica, permitiendo así completar el ciclo de la materia y de la energía.<sup>4</sup> Otra característica importante de éstos es que son una fuente invaluable de metabolitos bioactivos estructuralmente diversos, y que han servido de prototipos estructurales para la elaboración de numerosos fármacos, como son los agentes inmunosupresores, que han revolucionado el campo de la medicina al facilitar el trasplante de órganos, antitumorales, estimulantes de la motilidad intestinal, hipocolesterolemiantes, antiparasitarios, antihelmínticos, además de insecticidas y herbicidas (**Tabla 1**).<sup>8</sup>

<b>Tabla 1.</b> Ejemplos selectos de metabolitos secundarios producidos por hongos microscópicos de importancia farmacéutica y/o agroquímica.			
<b>Especie productora</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Estructura molecular</b>	<b>Actividad biológica</b>
<i>Penicillium chrysogenum</i> <sup>9</sup>	Penicilina G		Antibiótico β-lactámico
<i>Cephalosporium acremonium</i> <sup>10</sup>	Cefalosporina C		Antibiótico β-lactámico
<i>Aspergillus fumigatus</i> <sup>10</sup>	Gliotoxina		Inmunosupresor
<i>Beauveria nivea</i> <sup>10,11</sup>	Ciclosporina A		Inmunosupresor
<i>Isaria sinclairii</i> <sup>12</sup>	Miriocina		Inmunosupresor

**Tabla 1.** Ejemplos selectos de metabolitos secundarios producidos por hongos microscópicos de importancia farmacéutica y/o agroquímica (continuación).

<i>Aspergillus terreus</i> <sup>10,13</sup>	Lovastatina		Hipocoles-terolemiante
<i>Penicillium citrinum</i> <sup>10,13</sup>	Compactina		Hipocoles-terolemiante
<i>Phoma</i> sp. <sup>10</sup>	Escualestina		Hipocoles-terolemiante
<i>Claviceps purpurea</i> <sup>9</sup>	Ergotamina		Vasoconstrictor
<i>Metarhizium anisopliae</i> <sup>10,14</sup>	Destruxina A		Antineoplásico
<i>Penicillium patulum</i> <sup>10</sup>	Ácido 6-metil-salicílico		Antiinflamatorio
<i>Neotyphodium</i> spp. <sup>10</sup>	Peramina		Insecticida

Así, el papel de los microorganismos fúngicos en la producción de medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades ha sido muy relevante. Sin embargo, el desarrollo del fenómeno de resistencia se ha convertido en un problema, de tal

manera que la búsqueda de nuevos metabolitos que permitan disminuir este fenómeno y/o que presenten novedosos mecanismos de acción está plenamente justificado.<sup>8</sup>

## 1.2 *Phoma macrostoma*

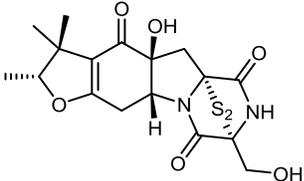
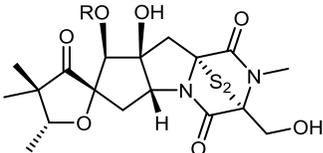
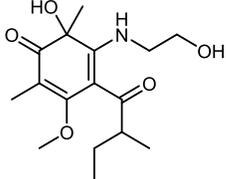
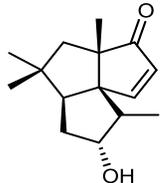
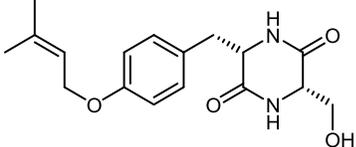
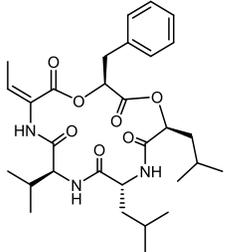
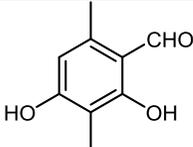
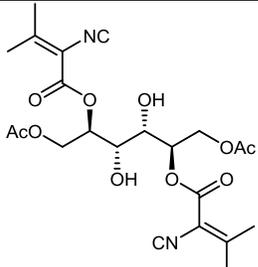
*Phoma macrostoma* (Sphaeropsidaceae) es un hongo fitopatógeno y oportunista que provoca clorosis en hojas (foto-blanqueamiento, **Figura 1**), e inhibe el crecimiento y el brote de la raíz en las plantas susceptibles.<sup>15-17</sup> También causa necrosis sobre plantas herbáceas y leñosas, y llega a generar putrefacción en las hojas de alcachofa.<sup>18,19</sup> Otras especies del género son saprófitas, es decir, que viven en el suelo.



**Figura 1.** Efecto de fitopatogenicidad provocado por el hongo *Phoma macrostoma* en plantas de cardo canadiense (*Cirsium arvense*). Izquierda: plantas sanas. Derecha: manifestación de clorosis intensa (Imagen tomada de Graupner *et al.* 2003).<sup>15</sup>

*Phoma macrostoma* var. *macrostoma* produce un pigmento característico opaco rojo-violeta en las hifas. Por otro lado, *P. macrostoma* var. *incolorata* se distingue por la ausencia de pigmentación en las hifas.<sup>15</sup> Algunos metabolitos fitotóxicos obtenidos de diversas especies de este género son la phomalairdenona producida por *P. lingam*,<sup>20</sup> las nonenólidas producidas por *P. herbarum*,<sup>21</sup> los ésteres de epoxidón de *Phoma* sp.,<sup>22</sup> y la putaminoxina de *P. putaminum*.<sup>23</sup> entre los más importantes. Otros metabolitos bioactivos producidos se muestran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios producidos por el género *Phoma*.

Especie	Metabolito	Estructura
<i>P. lingam</i> <sup>20,24-28</sup>	Phomalirazina	
	Sirodesmina PL R= Ac Desacetilsirodesmina PL R= H	
	Phomaligina A	
	Phomalairdenona A	
	Phomamida	
	Phomálida	
	2,4-Dihidroxi-3,6-dimetilbenzaldehído	
	Maculansina A	

**Tabla 2.** Metabolitos secundarios producidos por el género *Phoma* (continuación).

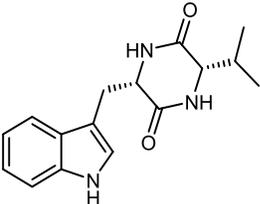
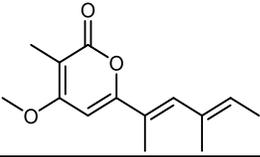
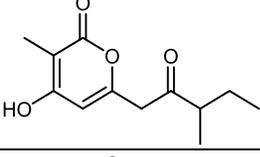
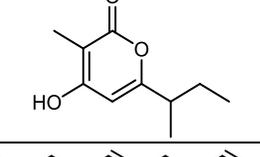
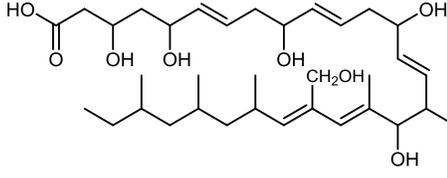
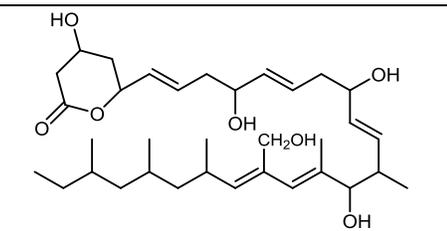
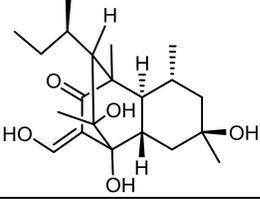
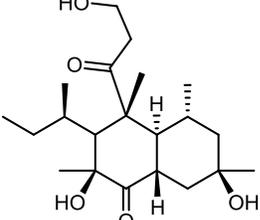
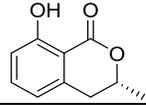
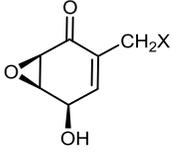
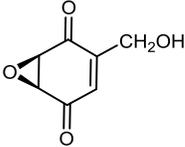
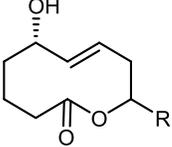
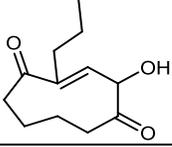
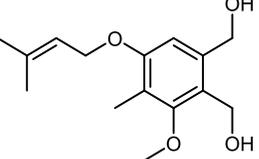
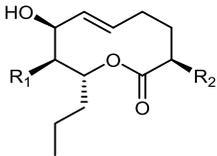
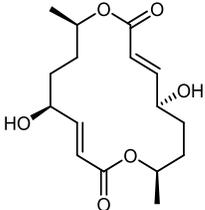
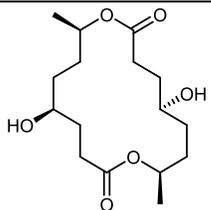
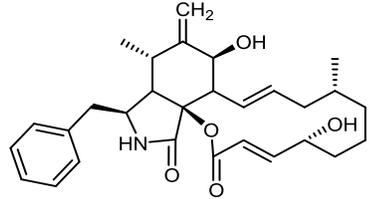
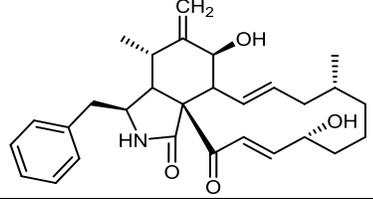
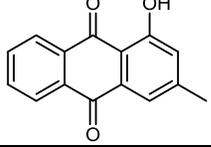
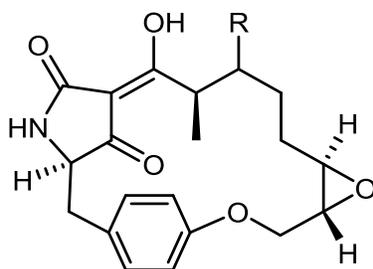
<i>P. lingam</i> <sup>25-28</sup>	Anhídrido de L-valil-L-triptófano	
	Phomapirona A	
	Phomapirona B	
	Phomapirona C	
	Ácido Phomenoico	
	Phomenolactona	
<i>P. betae</i> <sup>29</sup>	Betaenona A	
	Betaenona B	

Tabla 2. Metabolitos secundarios producidos por el género <i>Phoma</i> (continuación).		
<i>P. tracheiphila</i> <sup>30</sup>	Meleína	
<i>Phoma</i> sp. <sup>22</sup> <i>P. glomerata</i> <sup>31</sup>	Epoxidón X= OH	
<i>P. sorghina</i> <sup>32</sup>	Desoxiepoxidón X= H	
	Filostina	
<i>P. putaminum</i> <sup>23,33</sup>	Putaminoxina R= CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> Putaminoxina B R= CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	
	Putaminoxina C	
<i>P. macdonaldi</i> <sup>34</sup>	Ziniol	
<i>P. herbarum</i> <sup>21,35</sup>	Herbarumina I R <sup>1</sup> = OH, R <sup>2</sup> = H	
	Herbarumina II R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = OH	
	Herbarumina III R <sup>1</sup> = R <sup>2</sup> = H	
<i>Phoma</i> sp. <sup>36</sup>	Pirenoforol (helmidol)	

<b>Tabla 2.</b> Metabolitos secundarios producidos por el género <i>Phoma</i> (continuación).		
<i>Phoma</i> sp. <sup>36</sup>	2,3,10,11-Tetrahidropirenoforol	
<i>P. exigua</i> var. <i>exigua</i> <sup>37</sup>	Citochaldasina B	
	Deoxaphomina	
<i>P. sorghina</i> <sup>38</sup>	Pachibasina	

En la literatura científica especializada existe un solo reporte realizado por el grupo de Graupner sobre el aislamiento de metabolitos secundarios a partir de la especie *Phoma macrostoma*.<sup>15</sup> Estos investigadores realizaron la evaluación de la actividad herbicida de seis extractos orgánicos derivados de las cepas identificadas con las claves 94-44B, 94-359A, 95-268B, 94-26, 95-54A1 y 95-54A2, aisladas de pequeñas lesiones cloróticas y necróticas de hojas, y tejidos del tallo de plantas de cardo canadiense (*Cirsium arvense*), recolectadas en los campos, pastos y bordes de la carretera en tres provincias de Canadá entre los años de 1985 y 1997.<sup>15</sup> Estos extractos fúngicos provocaron foto-blanqueamiento cuando se aplicaron sobre las plantas de hoja ancha, además de que se observó una inhibición del crecimiento después de 4-6 días, y muerte de la planta después de 14 días.<sup>15</sup> El estudio químico realizado sobre esta especie condujo al aislamiento de dos metabolitos secundarios fitotóxicos, las macrocidinas A y B (**Figura 2**), que son los primeros representantes de una nueva familia de ácidos tetrámicos cíclicos.<sup>15,16</sup>



macrocidina A R = H  
 macrocidina B R = OH

**Figura 2.** Estructura química de las macrocidinas A y B.

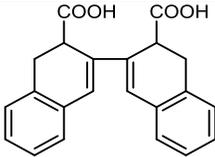
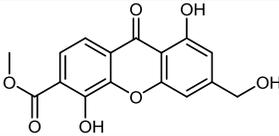
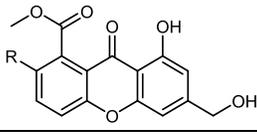
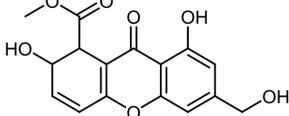
Por otro lado, Bailey y colaboradores también a partir de *P. macrostoma* realizaron una formulación granular para la propagación superficial del césped o tierra, mediante la encapsulación del micelio.<sup>16,17</sup> Este tipo de formulación y aplicación a la rizosfera favorece la absorción de las fitotoxinas (macrocidinas A y B), las cuales se liberan a partir del gránulo en el suelo húmedo y son absorbidas por las raíces de las plantas, y al mismo tiempo, el hongo germina e invade el huésped penetrando a través de la raíz.<sup>39</sup> Cabe destacar que esta formulación de gránulos mantiene su actividad como bioherbicida en combinación con fertilizantes comerciales, especialmente en combinación con fertilizantes nitrogenados.<sup>17</sup> De tal manera que, se ha propuesto el uso de este hongo como bioherbicida comercial para el manejo de malezas en pasto, y de utilidad en la agricultura, horticultura y silvicultura.<sup>16,17</sup>

### 1.3 *Neosartorya* sp.

Los hongos del género *Neosartorya* han sido aislados principalmente a partir de muestras del suelo (*N. fischeri*, *N. siamensis*, *N. pseudofischeri*, etc.),<sup>40–43</sup> ambientes marinos (*N. paulistensis*, *N. laciniosa*, *N. tsunodae*, etc.)<sup>42–44</sup> además de jugos de frutos procesados (*N. fischeri*).<sup>40</sup> Cabe mencionar que este género es considerado un problema grave para la industria de alimentos debido a que todas sus especies son capaces de crecer en altas temperaturas,<sup>45</sup> además de que producen ascosporas resistentes al calor en diferentes productos alimenticios tratados térmicamente.<sup>40,41</sup>

Actualmente se han identificado 26 especies pertenecientes a este género, y algunas de ellas como *N. fischeri*, *N. pseudofischeri*, *N. hiratsukae* y *N. spinosa*, han sido descritas como patógenos en humanos, causando enfermedades como la aspergilosis invasiva, osteomielitis, endocarditis y queratitis micótica.<sup>41,46</sup> Algunas cepas de *N. fischeri* son capaces de producir toxinas como la terreína, las fumitremorginas A, B, C y TR-2, y el verruculógeno. Las fumitremorginas actúan sobre el sistema nervioso central causando convulsiones sostenidas y la muerte en animales. El verruculógeno es el más tóxico de éstas y la fischerina, producida por la cepa *N. fischeri* var. *fischeri*, causa peritonitis letal en ratones.<sup>40,47</sup>

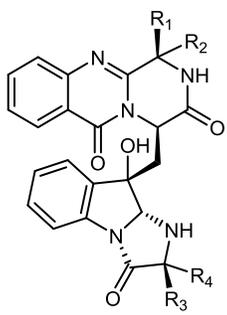
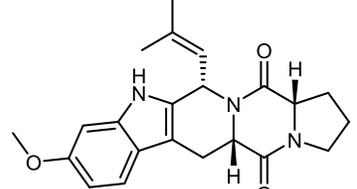
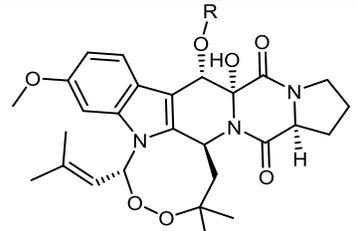
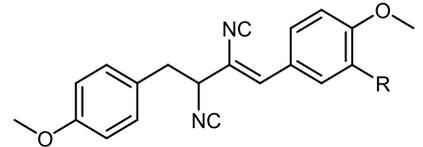
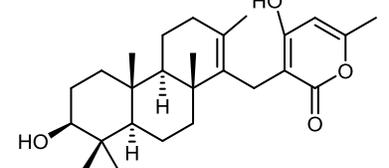
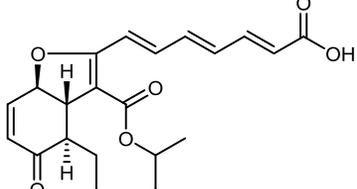
Cabe mencionar que muchos compuestos con propiedades antimicrobianas y citotóxicas se han aislado también a partir de diversas especies del género *Neosartorya* (**Tabla 3**). Algunos de ellos son los pirrolindoles y las fischerindolinas de *N. pseudofischeri*, los cuales inhiben el crecimiento celular de líneas de cáncer de humanos y de ratón;<sup>48</sup> las glabramicinas A, B y C, aisladas de *N. glabra*, con actividad antibacteriana;<sup>49</sup> la solanapirona A, aislada a partir del cultivo de *N. fischeri* (KUFC 6344), con una importante actividad citotóxica contra las líneas cancerígenas MCF7, NCI-H460 y A375-C5,<sup>43</sup> y las fiscalinas, que poseen actividad inhibitoria de la unión de la sustancia P al receptor de neuroquinina-1 (NK-1) humana.<sup>50</sup>

<b>Tabla 3.</b> Metabolitos secundarios aislados a partir del género <i>Neosartorya</i> .		
<b>Especie</b>	<b>Metabolito</b>	<b>Estructura</b>
<i>N. fischeri</i> <sup>44,50,51</sup>	Fischeácido	
	Fischexantona	
	Sidowinina A R = H Sidowinina B R = OH	
	AGI-B4	

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir del género *Neosartorya* (continuación).

<i>N. fischeri</i> <sup>44,50,51</sup>	Crisofanol R = H Emodina R = OH	
	5'-Desoxi-5'-metilamino-adenosina	
	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	
	Fiscalina B	
	Neosartorina	
	Eumitrina A1	
<i>N. siamensis</i> (KUFC 6349) <sup>52</sup>	Triptoquivalina	

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir del género *Neosartorya* (continuación).

<p><i>N. siamensis</i> (KUFC 6349)<sup>52</sup></p>	<p>Fiscalina C R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = Me <i>epi</i>-Fiscalina C R<sub>1</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = H, R<sub>3</sub> = R<sub>4</sub> = Me Fiscalina A R<sub>1</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> = Me <i>epi</i>-Fiscalina A R<sub>1</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>2</sub> = R<sub>4</sub> = H, R<sub>3</sub> = Me Neofiscalina A R<sub>1</sub> = R<sub>3</sub> = H, R<sub>2</sub> = CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> = Me</p>	
<p><i>N. fischeri</i> (IBT3023)<sup>40</sup></p>	<p>Fumitremorgina C</p>	
	<p>Verruculógono R = H Fumitremorgina A R = 2-metil-2-butenio</p>	
<p><i>N. fischeri</i> var. <i>glabra</i> (IFO9857)<sup>53</sup></p>	<p>NK372135A R = H NK372135B R = OCH<sub>3</sub> NK372135C R = OH</p>	
<p><i>N. paulistensis</i> (KUFC 7897)<sup>42</sup></p>	<p>Sartoripirona C</p>	
<p><i>N. glabra</i> (MF7030)<sup>49</sup></p>	<p>Glabramicina C</p>	

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir del género *Neosartorya* (continuación).

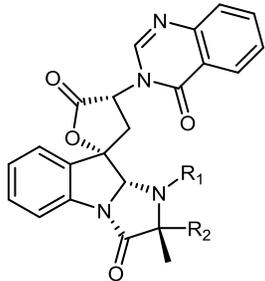
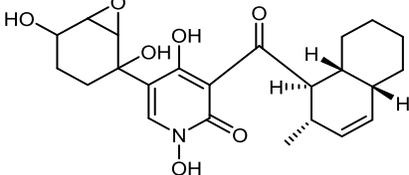
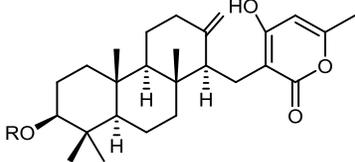
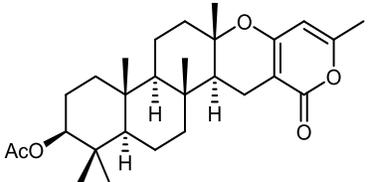
<p><i>N. siamensis</i> (KUFC 6349)<sup>52</sup></p> <p><i>N. laciniosa</i> (KUFC 7896)<sup>42,43</sup></p> <p><i>N. paulistensis</i> (KUFC 7897)<sup>42</sup></p>	<p>Triptoquivalina L R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = Me</p> <p>Triptoquivalina H R<sub>1</sub> = OH, R<sub>2</sub> = H</p> <p>Triptoquivalina F R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = H</p> <p>Triptoquivalina O R<sub>1</sub> = CHO, R<sub>2</sub> = H</p> <p>Triptoquivalina T R<sub>1</sub> = CHO, R<sub>2</sub> = Me</p> <p>Triptoquivalina U R<sub>1</sub> = H, R<sub>2</sub> = Me</p>	
<p><i>N. fischeri</i> var. <i>fischeri</i> (CBM-FA-0156)<sup>47</sup></p>	<p>Fischerina</p>	
<p><i>N. tatenoi</i> (KKU-2NK23)<sup>54</sup></p> <p><i>N. laciniosa</i> (KUFC 7896)<sup>42</sup></p> <p><i>N. fischeri</i> (KUFC 6344)<sup>43</sup></p> <p><i>N. fischeri</i> (FO-5897)<sup>55</sup></p>	<p>Aszonapirona A R = Ac</p> <p>Aszonapirona B R = H</p>	
<p><i>N. siamensis</i> (KUFC 6349)<sup>42</sup></p> <p><i>N. tsunodae</i> (KUFC 9213)<sup>42,43</sup></p>	<p>Chevalona B</p>	

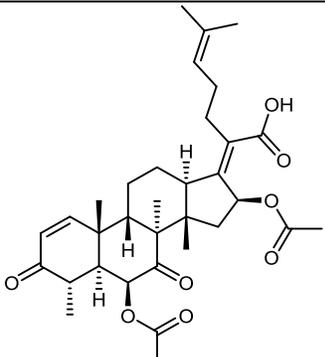
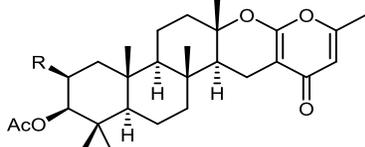
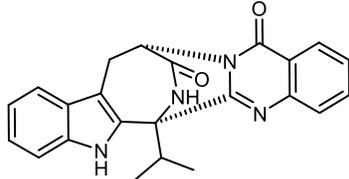
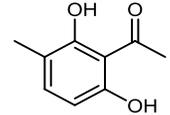
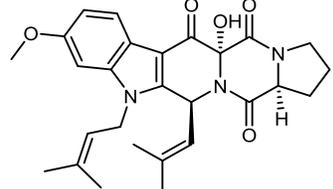
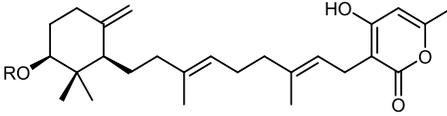
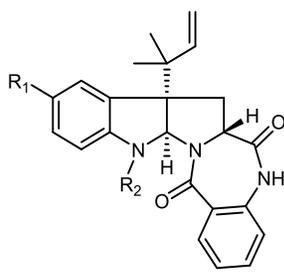
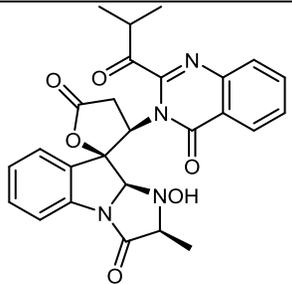
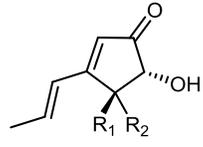
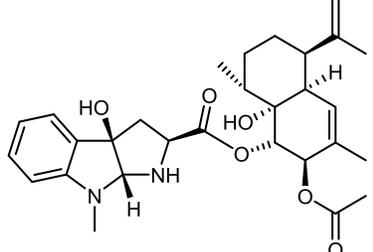
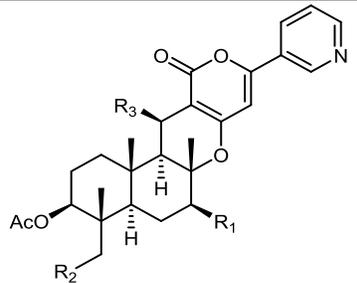
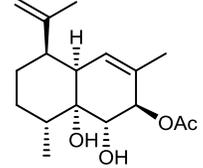
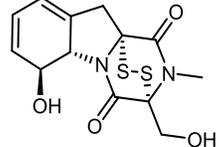
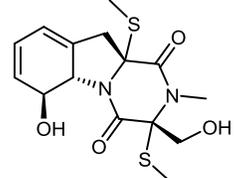
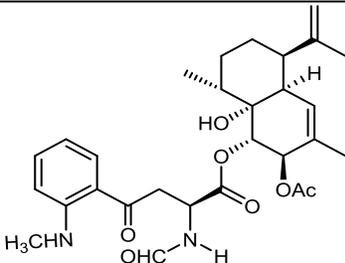
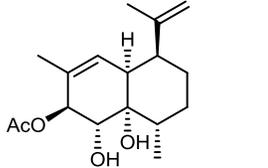
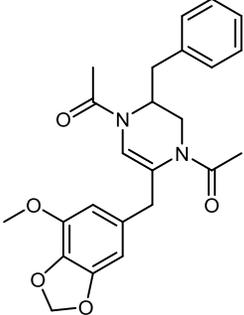
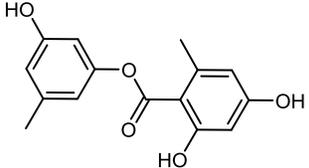
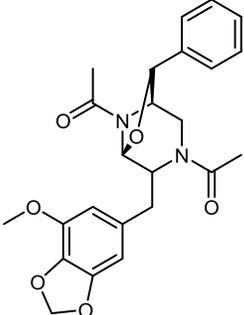
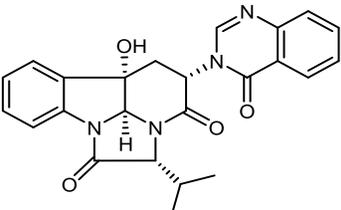
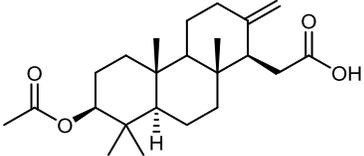
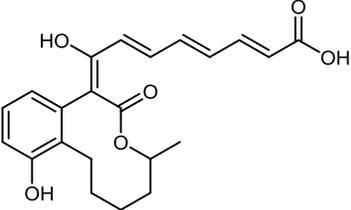
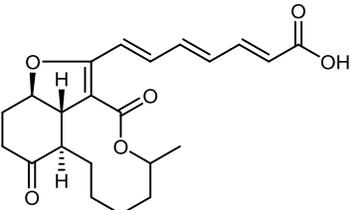
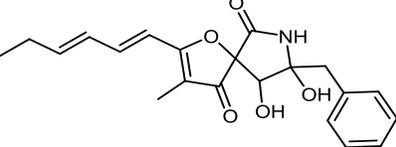
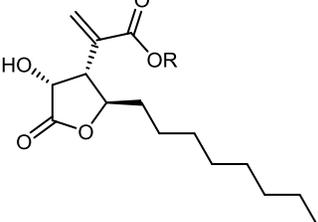
Tabla 3. Metabolitos secundarios aislados a partir del género <i>Neosartorya</i> (continuación).		
<i>N. fischeri</i> (KUFC 6344) <sup>43</sup>	Ácido helvólico	
<i>N. tsunodae</i> (KUFC 9213) <sup>42,43</sup>		
<i>N. siamensis</i> (KUFC 6349) <sup>42,52</sup>	Chevalona C R = H Sartoripirona B R = OAc	
	Sartorimensina	
	2,6-Dihidroxi-3-metilacetofenona	
<i>N. fischeri</i> (KUFC 6344) <sup>42,43</sup>	13-Oxofumitremorgina B	
<i>N. fischeri</i> (FO-5897) <sup>55</sup>	Sartoripirona A R = Ac Sartoripirona D R = H	
<i>N. tatenoi</i> (KKU-2NK23) <sup>54</sup>	Aszonalenina R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = H Acetil-Aszonalenina R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = OAc 1-Formil-5-hidroxi- aszonalenina R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = CHO	
<i>N. fischeri</i> (KUFC 6344) <sup>42,43</sup>		
<i>N. fischeri</i> (IFM52672) <sup>56</sup>		
<i>N. fischeri</i> (NRRL181) <sup>57</sup>		

Tabla 3. Metabolitos secundarios aislados a partir del género <i>Neosartorya</i> (continuación).		
<i>N. fischeri</i> (IFM52672) <sup>56</sup>	Nortriptoquivalona	
	Iso-terreina R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = OH  Terreina R <sub>1</sub> = OH, R <sub>2</sub> = H	
<i>N. pseudofischeri</i> (CBS 404.67) <sup>48</sup>	Fischerindolina	
<i>N. pseudofischeri</i> (KUFC 6422) <sup>58</sup>	Piripiropeno A R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = OAc, R <sub>3</sub> = OH Piripiropeno E R <sub>1</sub> = R <sub>2</sub> = R <sub>3</sub> = H	
<i>N. pseudofischeri</i> (CBS 404.67) <sup>48</sup>	(1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>aR</i> ,5 <i>R</i> ,8 <i>R</i> ,8 <i>aR</i> )-2-Acetato de 1,2,8 <i>a</i> (1 <i>H</i> )-naftalenetriol, 2,4 <i>a</i> ,5,6,7,8-hexahidro-3,8-dimetil-5-(1-metiletetil)	
	Gliotoxina	
	Bis(detio)bis(metil)io gliotoxina	

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios aislados a partir del género *Neosartorya* (continuación).

<p><i>N. pseudofischeri</i> (KUFC 6422)<sup>58</sup></p>	Eurochevalierina	
	Cadineno	
	Brasiliamida B	
	3-Hidroxi-5-metilfenil 2,4-dihidroxi-6-metilbenzoato	
	3,8-Diacetil-4-(3-metoxi-4,5-metilenedioxi)encil-7-fenil-6-oxa-3,8-diazabicyclo[3.2.1]octano	
	Pseudofischerina	

<b>Tabla 3.</b> Metabolitos secundarios aislados a partir del género <i>Neosartorya</i> (continuación).		
<i>N. tatenoi</i> (KKU-2NK23) <sup>54</sup>	Ácido tatenóico	
<i>N. glabra</i> (MF7030) <sup>49</sup>	Glabramicina A	
	Glabramicina B	
<i>Neosartorya</i> sp. <sup>59,60</sup>	Azaspireno	
	Neosartolactona R = H Éster 7-metílico de la Neosartolactona R = CH <sub>3</sub>	

## **2. HIPÓTESIS**

- El criterio de selección ecológica de hongos microscópicos a partir de hábitats inexplorados permitirá la obtención de candidatos idóneos para el aislamiento de moléculas novedosas.
- Los ensayos de citotoxicidad, así como los estudios de derreplicación, permitirán la selección de las especies fúngicas capaces de producir metabolitos secundarios biodinámicos.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El presente trabajo se generó como parte de un proyecto de investigación enfocado en la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios biodinámicos de origen fúngico, de utilidad para el desarrollo de nuevos fármacos, 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. Para el cumplimiento de este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1.- Realizar el aislamiento de hongos saprófitos a partir de muestras de suelo selectas.
- 2.- Obtener los cultivos axénicos de cada uno de los microorganismos aislados.
- 3.- Preparar los cultivos en pequeña escala de todas las cepas aisladas 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 objeto de estudio.
- 6.- Preparar los cultivos en mediana escala de las especies seleccionadas con base en los criterios indicados en el inciso 4.
- 7.- Realizar el fraccionamiento preliminar de al menos uno de los extractos activos seleccionados mediante técnicas cromatográficas convencionales.
- 8.- Realizar el aislamiento, purificación y caracterización de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las especies objeto de estudio, utilizando técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas de vanguardia.
9. Evaluar los productos puros en el ensayo biológico de citotoxicidad.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Aislamiento de los microorganismos objeto de estudio

Los hongos saprófitos *Phoma macrostoma* y *Neosartorya* sp. (T1-86 y T1-21, respectivamente) fueron aislados a partir de una muestra de tierra depositada sobre coladas de lava en el Chiñiñal (18° 30.55' N; -95° 11.04' O), un rancho localizado a las afueras de San Andrés Tuxtla, Veracruz. La muestra fue colectada por el Dr. Juan Manuel Espíndola en Junio del 2013, y el aislamiento de los microorganismos se realizó utilizando el método de dilución. Brevemente, a partir de 500 mg de muestra libre de materiales extraños (restos de raíces, ramas, hojas y piedras) se realizaron diluciones consecutivas por triplicado en agua estéril, a las concentraciones finales de 1:100, 1:1,000 y 1:10,000 (v/v). Enseguida, 1 mL de cada dilución fue vertido en cajas de Petri estériles, y posteriormente se adicionó medio de cultivo agar papa-dextrosa (PDA, Difco), suplementado con 30 mg/L de estreptomycin y 50 mg/L del colorante rosa de bengala. Los inóculos se mantuvieron a temperatura ambiente, con fotoperiodos de luz/obscuridad 12/12 hrs, y una vez detectado crecimiento de micelio, proceso que tardó entre 2 y 5 días, las colonias individuales fueron transferidas a tubos de reacción [50 tubos con medio PDA y 50 tubos con agar extracto de malta y dextrosa (MEA, Difco)] y en cajas de Petri conteniendo medio PDA, para su aislamiento y purificación (**Figura 3**).



**Figura 3.** Especies de hongos aislados de la muestra de suelo objeto de estudio: T1-21 (izq.) y T1-86 (der.).

## 4.2 Identificación de los hongos saprótrofos

Las cepas fúngicas *Phoma macrostoma* y *Neosartorya* sp., fueron identificadas taxonómicamente mediante el análisis genético de su espaciador interno ribosomal (ITS) o “código de barras”, por el Dr. Huzefa Raja en la Universidad de Carolina del Norte, Greensboro (UNCG) (**Tabla 4**). Cabe mencionar que, para establecer la identidad de un organismo a nivel de especie, la secuencia del ITS debe tener  $\geq 80\%$  de cobertura y  $\geq 97\%$  de identidad en la secuencia analizada mediante BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) en la base de datos del GenBank.<sup>7</sup>

<b>Tabla 4.</b> Identificación taxonómica mediante el análisis genético del ITS de las especies objeto de estudio.			
<b>Aislamiento</b>	<b>Nombre</b>	<b>(%) Cobertura GenBank</b>	<b>(%) Similitud en la secuencia GenBank</b>
<b>T1-21</b>	<i>Neosartorya</i> sp.	70	100
<b>T1-86</b>	<i>Phoma macrostoma</i>	98	100

## 4.3 Preparación de los cultivos fúngicos en sustrato sólido (arroz húmedo): pequeña y mediana escala

Una vez obtenidos los cultivos axénicos de los organismos **T1-86** y **T1-21** (inciso 4.1), se continuó con la preparación de los cultivos en pequeña escala en medio sólido. Para ello, cada especie fue inicialmente cultivada en 15 mL de un medio líquido (YESD, Difco), compuesto de extracto de levadura (1%), peptona de soya (2%), y dextrosa (2%). Los cultivos se mantuvieron en agitación constante a 100 rpm durante 5 días. Posteriormente, cada cultivo líquido fue vertido sobre un sustrato sólido compuesto por arroz húmedo (15 g de arroz/30 mL de agua), en matraces Erlenmeyer de 125 mL. El proceso de fermentación se llevó a cabo durante 21 días a temperatura ambiente y con fotoperiodos de luz-obscuridad 12/12 horas. Los cultivos en mediana escala fueron preparados siguiendo la misma estrategia metodológica pero en escala de 6x (90 g de arroz/180mL de agua).

#### 4.4 Obtención de los extractos orgánicos a partir de los cultivos sólidos

De manera general, la preparación de los extractos orgánicos en pequeña y/o mediana escala se realizó mediante un proceso de maceración a temperatura ambiente con agitación constante a 100 rpm por 12 horas, con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH (1:1). Transcurrido el período de maceración, la mezcla se filtró y la solución resultante se adicionaron 60 mL de H<sub>2</sub>O y 40 mL de CHCl<sub>3</sub>, para los cultivos en pequeña escala, y 90 mL de H<sub>2</sub>O y 60 mL de CHCl<sub>3</sub>, para los cultivos en mediana escala, y esta mezcla se mantuvo en agitación constante durante 30 minutos. La fase orgánica se separó de la fase acuosa, y esta última fase se sometió a un proceso de extracción con CHCl<sub>3</sub> (20 y 40 mL para los cultivos en pequeña y mediana escala, respectivamente). Las fases orgánicas se reunieron y se llevaron a sequedad a presión reducida. A continuación, el extracto seco fue resuspendido 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 con hexano (1:1). La fase de hexano se descartó y la fase de MeCN-MeOH resultante se evaporó a sequedad.

#### 4.5 Estudio químico de las especies fúngicas *Phoma macrostoma* y *Neosartorya* sp.

##### 4.5.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *P. macrostoma* (T1-86)

El fraccionamiento primario del extracto orgánico de *P. macrostoma* (T1-86, 1.46 g) se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en columna abierta (CCA) utilizando 150 g de gel de sílice 60 (tamaño de partícula 10-12 µm, Merck), y como fase móvil, hexano, mezclas entre hexano-CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-MeOH y MeOH, en orden creciente de polaridad (**Cuadro 1**). Este proceso permitió la obtención de 108 eluatos de 100 mL de cada uno, los cuales fueron reunidos mediante la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) de acuerdo a su similitud cromatográfica, obteniéndose un conjunto de 11 fracciones primarias (**F\_T1-86<sub>1</sub>-F\_T1-86<sub>11</sub>**) (**Cuadro 1**).

<b>Cuadro 1.</b> Fraccionamiento primario del extracto orgánico de <i>P. macrostoma</i> .				
<b>Fracciones</b>	<b>Mezcla</b>	<b>Reuniones</b>	<b>Código de muestra</b>	<b>Peso (mg)</b>
1-6	Hexano	1-12	F_T1-86 <sub>1</sub>	5.1
7-12	Hex-CHCl <sub>3</sub> (9:1)			
13-18	Hex-CHCl <sub>3</sub> (8:2)	13-18	F_T1-86 <sub>2</sub>	3.1
19-24	Hex-CHCl <sub>3</sub> (7:3)	19-30	F_T1-86 <sub>3</sub>	15.6
25-30	Hex-CHCl <sub>3</sub> (6:4)			
31-36	Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:1)			
37-42	Hex-CHCl <sub>3</sub> (4:6)	31-42	F_T1-86 <sub>4</sub>	33.6
43-48	Hex-CHCl <sub>3</sub> (3:7)	43-48	F_T1-86 <sub>5</sub>	18.1
49-54	Hex-CHCl <sub>3</sub> (2:8)	49-54	F_T1-86 <sub>6</sub>	65.9
55-60	Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:9)	55-68	F_T1-86 <sub>7</sub>	341.2
61-66	CHCl <sub>3</sub>			
67-72	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (9:1)	69-70	F_T1-86 <sub>8</sub>	686.3
73-78	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (8:2)	71-78	F_T1-86 <sub>9</sub>	225.2
79-84	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (7:3)	79-90	F_T1-86 <sub>10</sub>	19.3
85-90	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (6:4)			
91-96	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1)			
97-108	MeOH	91-108	F_T1-86 <sub>11</sub>	64.5

#### 4.5.2 Análisis cromatográficos

##### 4.5.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

La cromatografía analítica en capa fina se realizó en placas de aluminio de diferentes dimensiones recubiertas con gel de sílice (60 F<sub>254</sub> Merck, malla 3.5-7.0 ASTM de 0.25 mm de espesor). Los compuestos se visualizaron bajo luz UV a las longitudes de onda de 254 y 365 nm. Como agente cromógeno se utilizó una solución de sulfato cérico amoniacal y las cromatoplasmas se calentaron sobre una parrilla a 110°C.

##### 4.5.3 Análisis cromatográfico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) de las fracciones primarias de *P. macrostoma*

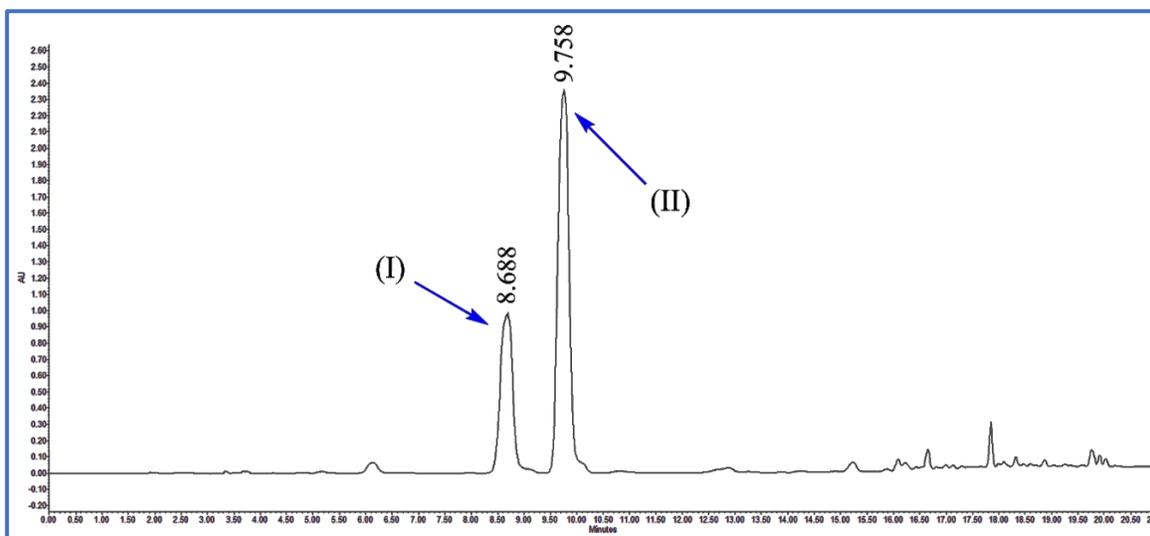
Los análisis por HPLC se realizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos (Waters), equipado con un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) y un detector de dispersión de luz evaporativo (ELSD); este último se trabajó con las siguientes condiciones de análisis: ganancia, 100; presión de gas, 40 psi; nebulizador en modo de calentamiento; y temperatura del tubo, 70°C +/- 25°C. El control del equipo, el

procesamiento y la manipulación de los datos se realizó utilizando el software Empower versión 3.0 (Waters). El análisis de las fracciones (**F\_T1-86<sub>1</sub>**-**F\_T1-86<sub>11</sub>**; **Cuadro 1**) se realizó en una columna analítica (Gemini C<sub>18</sub>, Phenomenex), con un tamaño de partícula de 5 µm, una longitud de 250 mm y un diámetro interno de 4.6 mm, y a una concentración de 2 mg/mL. Todos los análisis se realizaron a una temperatura de 40°C y la fase móvil consistió en una mezcla binaria H<sub>2</sub>O-ácido fórmico al 0.1% v/v (A) y Acetonitrilo (MeCN) (B), y empleando el gradiente de elución lineal indicado en el **Cuadro 2**. La longitud de onda de detección fue de 290 nm.

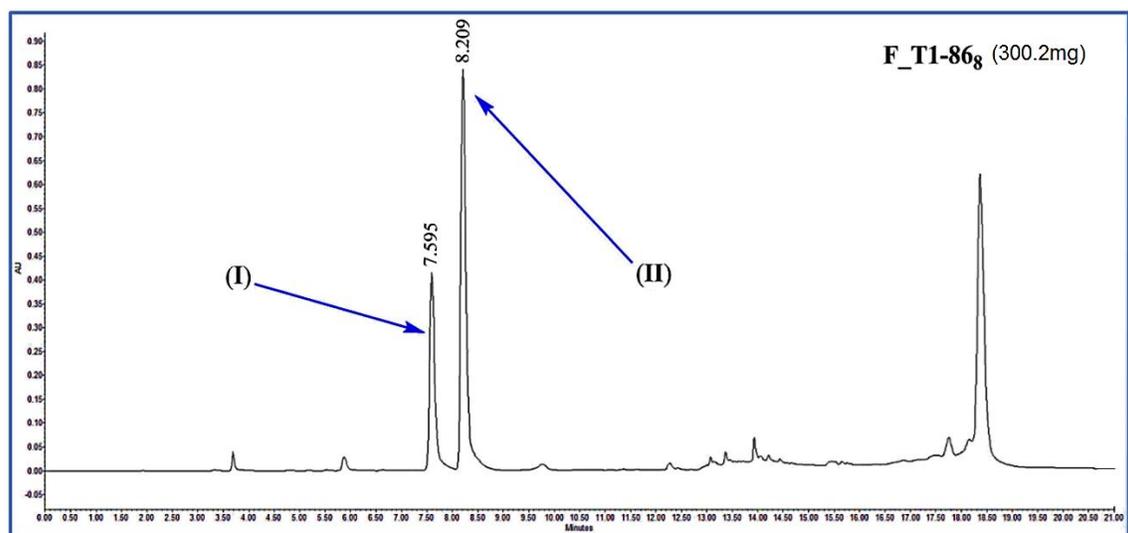
Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	1.0	75.0	25.0
10.00	1.0	47.0	53.0
10.50	1.0	0.0	100.0
18.00	1.0	0.0	100.0
18.10	1.0	75.0	25.0
21.00	1.0	75.0	25.0

#### 4.5.3.1 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción **F\_T1-86<sub>8</sub>**

En el cromatograma obtenido de la fracción **F\_T1-86<sub>8</sub>** se observó la presencia de dos componentes mayoritarios (**Figura 4**). La separación y purificación de estos compuestos se realizó por HPLC a nivel preparativo. La columna utilizada para la purificación fue una Gemini C<sub>18</sub>, con tamaño de partícula de 5 µm, con una longitud de 250 mm y un diámetro interno de 21.2 mm. La fase móvil consistió de una mezcla binaria de disolventes H<sub>2</sub>O-ácido fórmico al 0.1% v/v (A) y MeCN (B), utilizando el gradiente de elución indicado en el **Cuadro 2**, pero con flujo de 21.24 mL/min y una longitud de onda de detección de 290 nm. La concentración de la muestra por inyección fue de 30 mg/mL y se realizaron 10 inyecciones (**Figura 5**).



**Figura 4.** Análisis cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción primaria **F\_T1-86<sub>8</sub>** ( $\lambda = 290$  nm).



**Figura 5.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria **F\_T1-86<sub>8</sub>** mediante HPLC a nivel preparativo ( $\lambda = 290$  nm).

El proceso de purificación antes descrito permitió el aislamiento de los compuestos **2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-*trans*-propenilfuran-3-ona (I)**;  $t_R$  7.6 min, 17.9 mg) y **2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona (II)**;  $t_R$  8.2 min, 18.6 mg), los cuales fueron caracterizados mediante las técnicas de RMN y EM.

#### 4.5.4 Fraccionamiento primario del extracto orgánico de *Neosartorya* sp. (T1-21)

El fraccionamiento primario del extracto de la especie fúngica *Neosartorya* sp. (T1-21, 0.58 g) se realizó mediante la técnica de CCA (120 g de gel de sílice 60, tamaño de partícula 10-12 µm, Merck). Como fase móvil se utilizó hexano, mezclas de hexano-CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-MeOH y MeOH, en orden creciente de polaridad. Este procedimiento permitió la obtención de 108 eluatos de 100 mL cada uno, los cuales fueron reunidos con base en su similitud cromatográfica por CCF, en nueve fracciones primarias (F\_T1-21<sub>1</sub>-F\_T1-21<sub>9</sub>) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Fraccionamiento primario del extracto de <i>Neosartorya</i> sp.				
Fracciones	Mezcla	Reuniones	Código de muestra	Peso (mg)
1-6	Hexano	1-18	F_T1-21 <sub>1</sub>	8.3
7-12	Hex-CHCl <sub>3</sub> (9:1)			
13-18	Hex-CHCl <sub>3</sub> (8:2)			
19-24	Hex-CHCl <sub>3</sub> (7:3)	19-30	F_T1-21 <sub>2</sub>	7.9
25-30	Hex-CHCl <sub>3</sub> (6:4)			
31-36	Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:1)	31-42	F_T1-21 <sub>3</sub>	1.8
37-42	Hex-CHCl <sub>3</sub> (4:6)			
43-48	Hex-CHCl <sub>3</sub> (3:7)	43-48	F_T1-21 <sub>4</sub>	27.6
49-54	Hex-CHCl <sub>3</sub> (2:8)	49-54	F_T1-21 <sub>5</sub>	52.5
55-60	Hex-CHCl <sub>3</sub> (1:9)	55-60	F_T1-21 <sub>6</sub>	29.6
61-66	CHCl <sub>3</sub>	61-72	F_T1-21 <sub>7</sub>	411.0
67-72	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (9:1)			
73-78	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (8:2)	73-90	F_T1-21 <sub>8</sub>	74.8
79-84	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (7:3)			
85-90	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (6:4)			
91-96	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (1:1)	91-108	F_T1-21 <sub>9</sub>	22.8
97-108	MeOH			

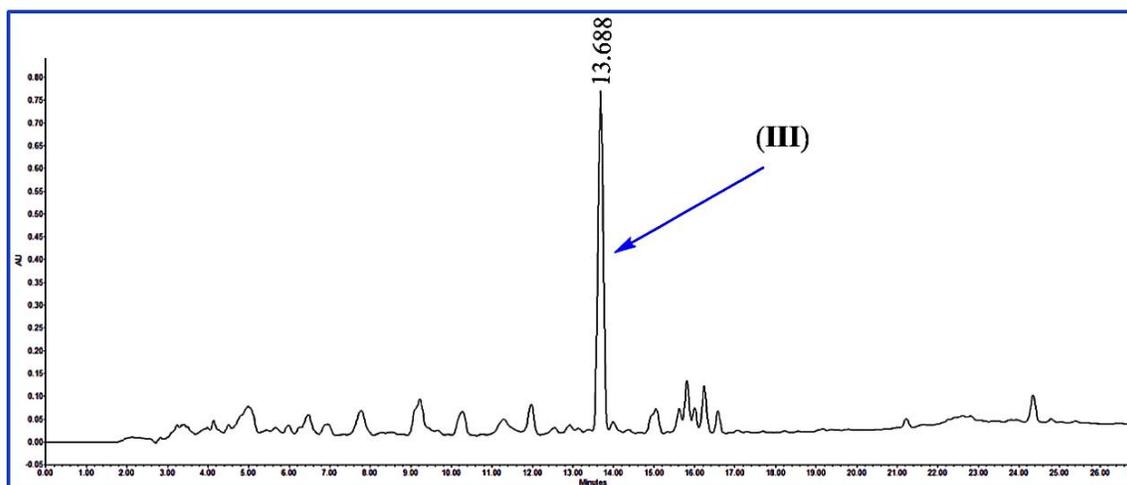
#### 4.5.5 Análisis cromatográfico por HPLC de las fracciones primarias de *Neosartorya* sp.

El análisis de las fracciones primarias (F\_T1-21<sub>1</sub>-F\_T1-21<sub>9</sub>) obtenidas a partir del fraccionamiento del extracto orgánico de *Neosartorya* sp. (Cuadro 3) se realizó siguiendo el mismo procedimiento indicado en el inciso 4.5.3, pero con el gradiente de elución mostrado en el Cuadro 4. La longitud de onda de detección fue de 254nm.

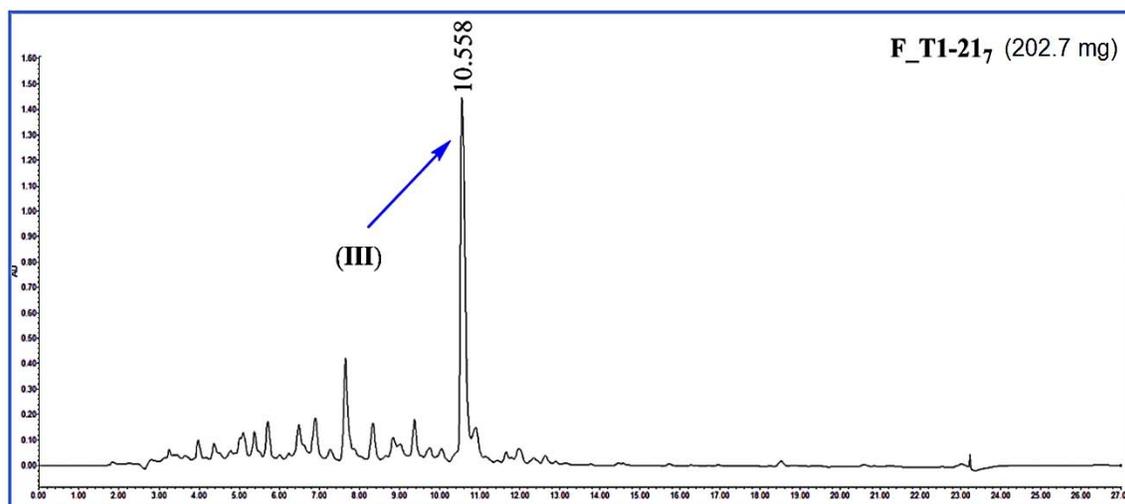
<b>Cuadro 4.</b> Condiciones de análisis por HPLC a nivel analítico.			
Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	1.0	50.0	50.0
15.0	1.0	0.0	100.0
20.0	1.0	0.0	100.0
20.1	1.0	50.0	50.0
27.0	1.0	50.0	50.0

#### 4.5.6 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios presentes en la fracción F\_T1-217

La resolución cromatográfica de la fracción **F\_T1-217** por HPLC permitió establecer la presencia de un componente mayoritario en la muestra analizada (**Figura 6**). La separación y purificación de este compuesto se realizó por HPLC a nivel preparativo utilizando el mismo equipo y columna cromatográfica que en el inciso **4.5.3.1**. Las condiciones cromatográficas se ilustran en el **Cuadro 4**, pero el proceso de elución se realizó a flujo de 21.24 mL/min y a una concentración de la muestra por inyección de 30 mg/mL (siete inyecciones en total) (**Figura 7**). Este procedimiento permitió el aislamiento del producto (**III**;  $t_R$  10.56 min, 11.1 mg), caracterizado como el **ácido helvólico** mediante las técnicas de RMN y EM.



**Figura 6.** Análisis cromatográfico por HPLC a nivel analítico de la fracción primaria **F\_T1-217** ( $\lambda = 254$  nm).



**Figura 7.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria **F\_T1-217** mediante HPLC a nivel preparativo ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).

#### 4.6 Estudios de derreplicación

Los estudios de derreplicación se llevaron a cabo mediante la técnica de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS).<sup>64</sup> La cromatografía de líquidos de ultra eficiencia (UPLC) se desarrolló en un cromatógrafo (Waters) equipado con un detector PDA. El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y la manipulación de la información se realizó usando el programa Empower versión 3.0 (Waters). Todos los análisis fueron realizados a una temperatura de 40°C, empleando una columna Acquity BEH C<sub>18</sub> (Waters) con un tamaño de partícula de 1.7  $\mu\text{m}$ , y 10 mm de longitud  $\times$  2.1 mm de diámetro interno. La elución se efectuó con una mezcla binaria de MeCN (A) y H<sub>2</sub>O-ácido fórmico 0.1% v/v (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 la composición isocrática por 1.5 minutos y regresando a las condiciones iniciales en 0.5 minutos. Los espectros en el UV se registraron con un barrido desde 200 hasta 500 nm con una resolución de 4 nm.

Los análisis por espectrometría de masas de alta resolución (HRESIMS) se desarrollaron 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 (Thermo Fisher). Las condiciones 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 del equipo fueron las siguientes: 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 y se fijó 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). Para cada análisis se utilizó a una concentración de 0.1 mg de muestra disuelto en 1 mL de una mezcla de MeOH-dioxano (1:1).

#### **4.7 Caracterización estructural**

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), fueron registrados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI), en el edificio B de la Facultad de Química de la UNAM, los espectros de RMN de hidrógeno (RMN-<sup>1</sup>H) para los compuestos **I** y **II** se generaron en el espectrómetro de RMN Varian MR de 9.4 T, a una frecuencia de 400 MHz, y para el compuesto **III** la adquisición se realizó a una frecuencia de 300 MHz. Los espectros de RMN de carbono 13 (RMN<sup>13</sup>C) de todos los compuestos se registraron a una frecuencia de 100 MHz. En todos los experimentos se utilizó como disolvente CDCl<sub>3</sub>. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (*J*) están expresadas en Hz.

#### **4.8 Ensayo de citotoxicidad**

La evaluación de la actividad citotóxica de los extractos y compuestos puros **I-III** se realizó utilizando las líneas celulares cancerosas humanas: MCF7 (carcinoma de mama), HCT15 (adenocarcinoma colorrectal), HeLa (carcinoma de cérvix) y PC3 (carcinoma de próstata). A continuación se describe de manera general el procedimiento empleado.<sup>62</sup>

#### **4.8.1 Cultivo y suspensión de las líneas celulares cancerosas**

Las líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, estas células se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 y 100% de humedad relativa. Para el bioensayo se utilizaron cultivos con un crecimiento del 60-70% de confluencia, previo, cambio del medio de cultivo e incubación durante 24 horas, se procedió a lavar dos veces los cultivos celulares con 5 mL de una solución amortiguadora de fosfatos (PBS), al término de este lavado se adicionaron 0.3 mL de tripsina para desprender las células de la caja de crecimiento, enseguida se incubó por 5 minutos, transcurrido este tiempo de incubación, los cultivos se observaron al microscopio para comprobar que el desprendimiento de las células fuera completo. Enseguida, se adicionaron 5 mL de medio RPMI 1640, se homogenizó la suspensión y finalmente se procedió al conteo de las células en una cámara de Neubauer, con base en los resultados obtenidos se calculó el volumen requerido para tener una suspensión de alrededor de 10<sup>4</sup> células.

#### **4.8.2 Desarrollo del bioensayo**

Los extractos se evaluaron a las concentraciones finales de 2 y 20 µg/mL, mientras que para los compuestos **I**, **II** y **III** se prepararon diluciones seriadas a las siguientes concentraciones finales de 10, 2, 0.4, 0.08 y 0.016 µg/mL, en DMSO al 10%. Para el ensayo, 190 µL de la suspensión de células a la concentración adecuada, fueron colocadas en microplacas de ELISA (con 96 pozos de 250 µL de capacidad) junto con 10 µL de las diferentes concentraciones de las muestras a evaluar, este procedimiento se realizó por triplicado. Al mismo tiempo, se prepararon muestras blanco (células de tiempo inicial) con 190 µL de la suspensión de células, éstas se incubaron por 30 minutos. Posteriormente las cajas se incubaron por 72 horas en las mismas condiciones de temperatura, y humedad, mencionados en el inciso **4.8.1**.

Al concluir el periodo de incubación, se realizó la fijación de las células mediante la adición de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA) y posterior incubación a 4°C durante 30 minutos. Al término de la incubación, se decantó el TCA, después se

realizaron 4 lavados sucesivos con agua fría y el secado de las placas a temperatura ambiente, posteriormente se adicionaron 100 µL del colorante sulforodamida B (SRB) al 0.4% en una solución de ácido acético al 1%, y se incubaron las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, se procedió a eliminar el exceso de colorante lavando la placa con una solución de ácido acético al 1% y secando a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 200 µL de una solución de tris-hidroximetil-aminoetano (TRIS) (10 mM; pH 10) para solubilizar el colorante y la placa se mantuvo en agitación durante 5 minutos y se determinó la absorbancia en un lector para placas de ELISA a una longitud de onda de 564 nm.

#### 4.8.3 Determinación de $CI_{50}$

Los valores obtenidos a partir de las lecturas de absorbancia ( $\lambda = 564$  nm) de las diferentes muestras analizadas fueron promediados y para cada uno de ellos, se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento mediante la siguiente expresión matemática:

$$\% \text{ Inhibición del Crecimiento} = \frac{\text{Abs}_{(\text{muestra})} - \text{Abs}_{(\text{tiempo inicial})}}{\text{Abs}_{(\text{DMSO } 10\%)} - \text{Abs}_{(\text{tiempo inicial})}} \times 100$$

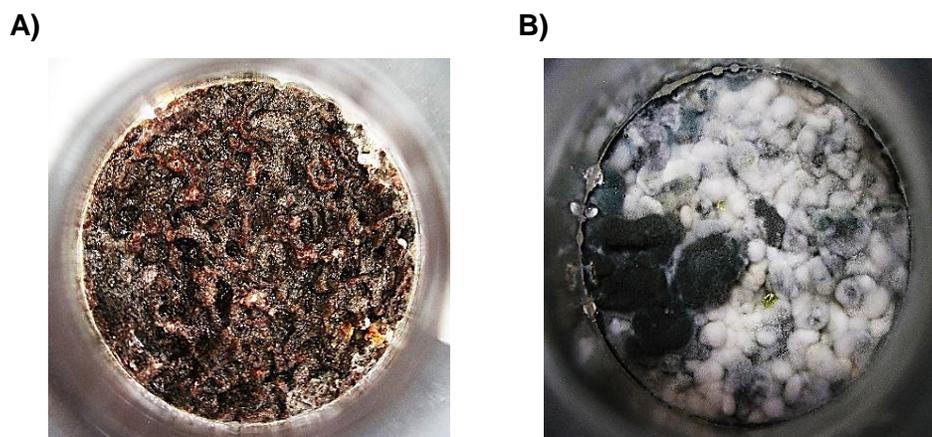
El porcentaje de inhibición del crecimiento fue graficado con sus respectivas concentraciones con el programa TableCurve 2D v5.01 de Jandel Scientific. Los extractos con porcentajes de inhibición mayor al 80% a la concentración de 20 µg/mL, se consideran como activos para este ensayo. Para los compuestos puros se calcularon los correspondientes valores de concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó el estudio químico y biológico de dos especies fúngicas aisladas a partir de una muestra de suelo obtenida de un hábitat inexplorado de nuestro país. Los resultados de esta investigación se presentarán en dos partes: en primer lugar se describirá el aislamiento de los organismos fúngicos a partir de la fuente natural seleccionada, así como su potencial citotóxico y los estudios de derreplicación. Posteriormente, se detallarán los resultados de la investigación química de las especies objeto de estudio.

### 5.1 Aislamiento de los microorganismos fúngicos

Previamente, en un estudio realizado en nuestro grupo de trabajo, las especies fúngicas **T1-86** y **T1-21** (**Figura 8**) fueron seleccionadas como candidatos para la obtención de metabolitos bioactivos con base en los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad y estudios de derreplicación (**Tabla 5**).<sup>63</sup> Así, en el presente estudio se realizó el acondicionamiento de estos organismos fúngicos saprótrofos para verificar su viabilidad y pureza, utilizando las técnicas microbiológicas descritas en el inciso **4.1** de la sección experimental.



**Figura 8.** Especies fúngicas **T1-86** [(A) cultivo sólido en mediana escala] y **T1-21** [(B) cultivo sólido en mediana escala].

**Tabla 5.** Resultados de las evaluaciones biológicas, estudios de derreplicación de los diferentes organismos fúngicos aislados.<sup>63</sup>

Clave	Fuente de obtención	Rendimiento (mg)	Ensayo de citotoxicidad (% crecimiento)						Estudio de derreplicación
			HCT15		HeLA		MCF7		
			2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	2 µg/mL	20 µg/mL	
T1-86	Suelo	57.7	121.1	10.0	3.8	2.6			-----
T1-21	Suelo	36.3	85.0	44.0			66.6	30.7	-----

Las cepas fúngicas objeto de estudio fueron identificadas taxonómicamente mediante el análisis molecular del ITS (inciso 4.2) como *Phoma macrostoma* (T1-86) y *Neosartorya* sp. (T1-21).

A continuación se realizó el cultivo en mediana escala en sustrato sólido de las especies. Una vez transcurrido el periodo de fermentación, se obtuvieron los extractos orgánicos correspondientes por maceración (inciso 4.4).

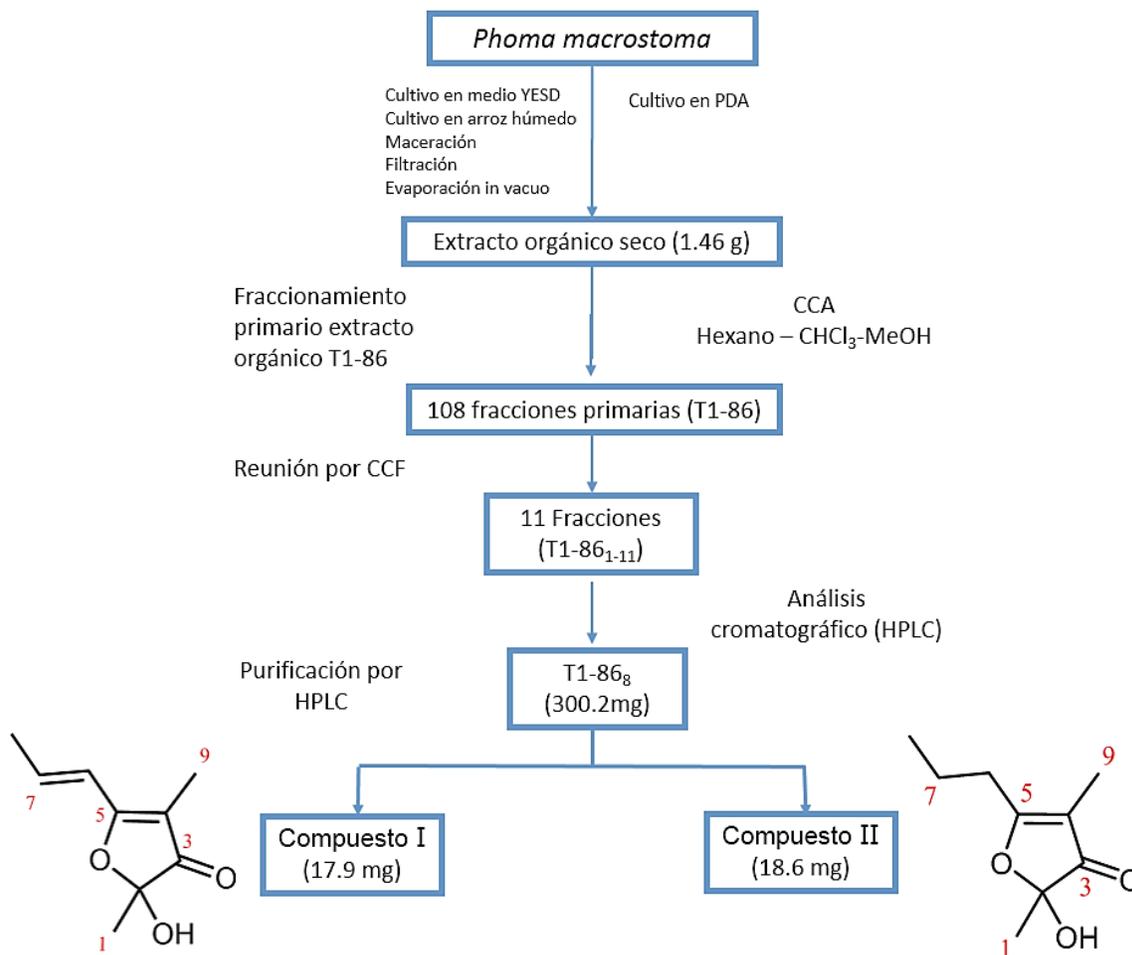
## 5.2 Estudio químico de la especie *Phoma macrostoma* (T1-86)

El fraccionamiento del extracto orgánico (Figura 9) de la especie *P. macrostoma*, mediante las técnicas de CCA y HPLC, condujo al aislamiento de la **2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-trans-propenilfuran-3-ona (I)** y su dihidro derivado novedoso **2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona (II)**. De manera general, la elucidación estructural de los compuestos obtenidos se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos, y se describe a continuación.

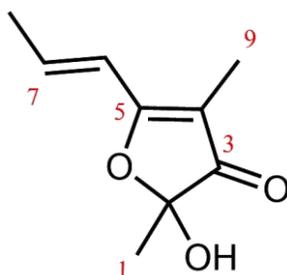
### 5.2.1 Caracterización estructural del compuesto I

El compuesto (I) (Figura 10) se aisló como un aceite, con un valor de rotación óptica de  $[\alpha]^{20}_D = -5.0$  (c 0.0012 MeOH). Los análisis realizados por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS, en la modalidad positiva (Figura 11B), permitieron identificar al ion pseudomolecular en una relación  $m/z$  169.0858  $[M+H]^+$ , del cual se deduce una fórmula molecular de  $C_9H_{12}O_3$  y que permite cuatro grados de insaturación. Además, en este espectro también se observaron las señales correspondientes al aducto con sodio  $m/z$  191.0676  $[M+Na]^+$  y un fragmento en  $m/z$  151.0752  $[M-H_2O]^+$

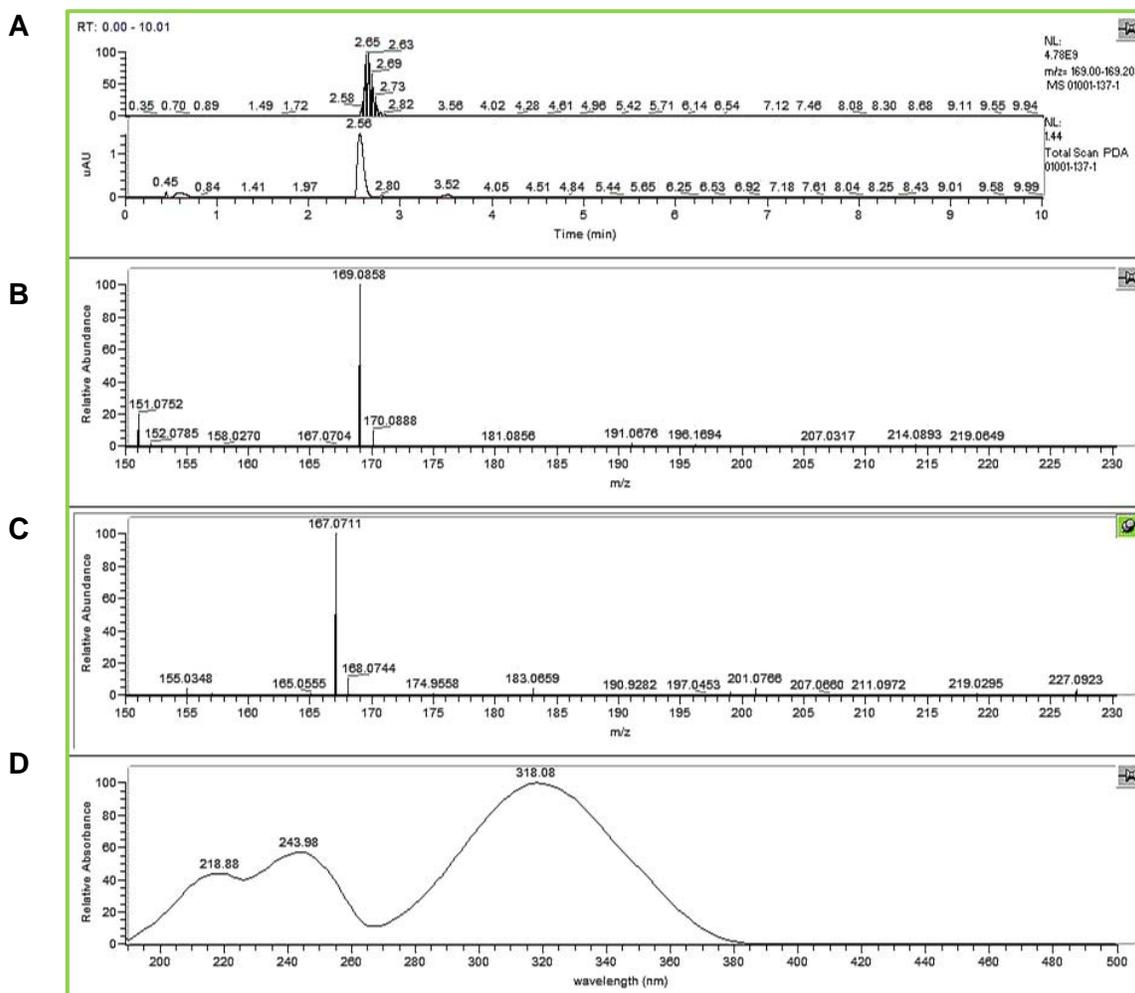
correspondiente a la pérdida de una molécula de agua. Por otra parte, en el espectro obtenido en el modo negativo (**Figura 11C**), se observa el ion pseudomolecular en una  $m/z$  167.0711  $[M-H]^-$ .



**Figura 9.** Diagrama de flujo de los procesos de fraccionamiento y purificación de los compuestos **I** y **II** a partir de la especie **T1-86**.



**Figura 10.** 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-*trans*-propenilfuran-3-ona.



**Figura 11.** Análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto **(I)**: **(A)** Cromatograma de corriente total de iones (TIC; arriba) y en el UV-PDA (abajo). Espectro de masas por la técnica de electrospray en modo (+) **(B)**, en modo (-) **(C)** y en el UV **(D)**.

En los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN (**Figuras 12 y 13**) del compuesto **I** se observaron las siguientes señales:

- En  $\delta_{\text{H}}$  6.86 se observa una señal como un doblete cuartetado (dq) atribuible a un protón vinílico (1H,  $J= 15.2, 6.8$  Hz). Esta señal muestra un acoplamiento vecinal con los hidrógenos de un grupo metilo geminal ( $\delta_{\text{H}}$  1.98, 3H, dd,  $J= 6.8, 1.2$  Hz) y con otro protón vinílico ( $\delta_{\text{H}}$  6.36, 1H, dd,  $J= 15.6, 1.6$  Hz).
- En la misma región vinílica, se observa otra señal en  $\delta_{\text{H}}$  6.36 correspondiente a otro protón vinílico, como un doble de dobles (dd) ( $J= 15.6, 1.6$  Hz). Esta información nos sugiere un acoplamiento *trans* de esta doble ligadura.<sup>64</sup>

- c) En  $\delta_H$  1.98 se observa una señal doble de dobles ( $J= 6.8, 1.2$  Hz) que integra para tres protones y es característica para la presencia de un grupo metilo unido a un doble enlace.

El conjunto de las señales recién descritas, confirma la presencia de una cadena de *trans*-propenilo.

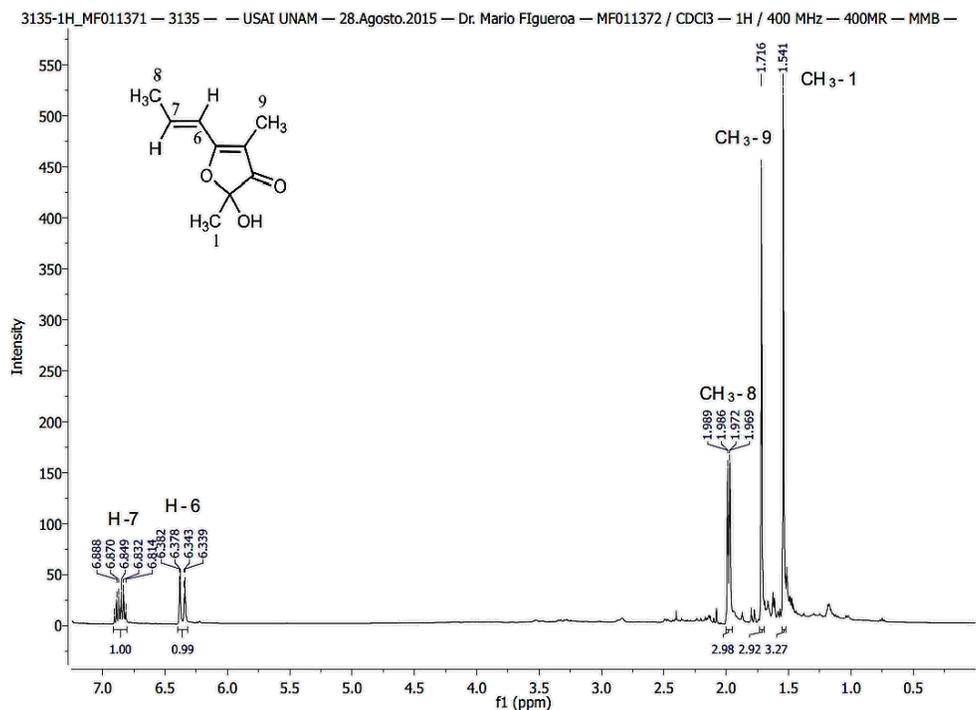
- d) Finalmente, se observan dos señales como singuletes en  $\delta_H$  1.72 y 1.54, que corresponden a los hidrógenos de dos grupos metilo.

En el espectro de  $^{13}C$  RMN se observan las siguientes señales:

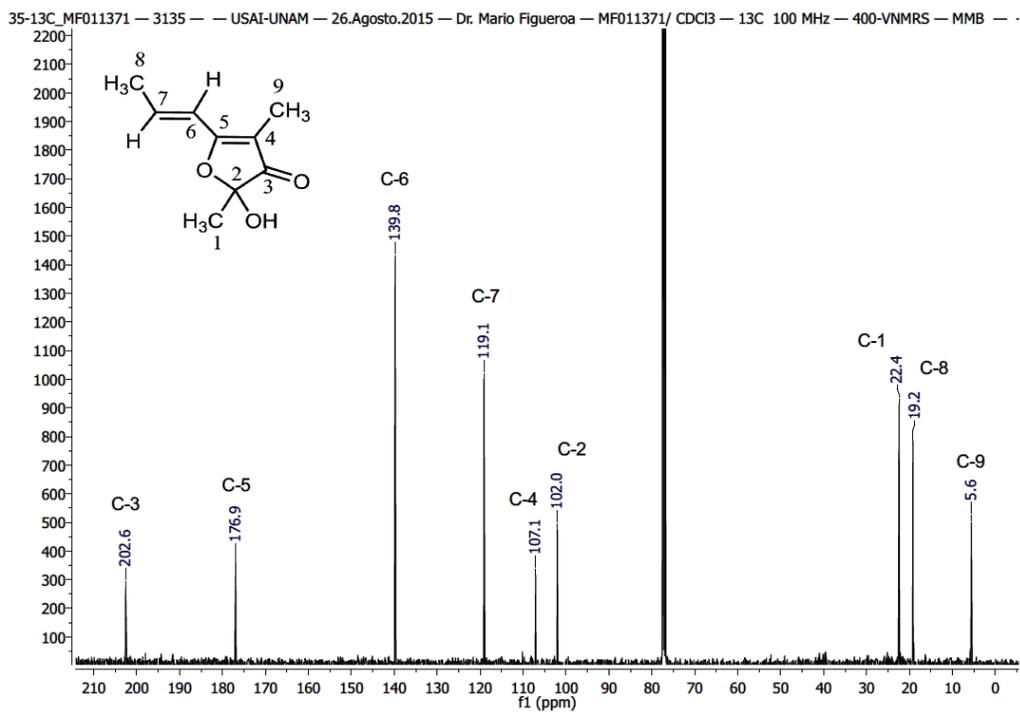
- a) Dos señales asignables a carbonos vinílicos en  $\delta_C$  139.8 y 119.1.  
b) Tres señales correspondientes a grupos metilo en  $\delta_C$  22.4, 19.2 y 5.6.  
c) Y cuatro carbonos cuaternarios: tres asignados a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\delta_C$  202.6, 176.9 y 107.1) y el último a un grupo éter de un anillo de furano en  $\delta_C$  102.0.

Este conjunto de señales revelaron la presencia de un sistema de tipo furanona, con un residuo de *trans*-propenilo.

El análisis detallado de los datos espectroscópicos y espectrométricos antes descrito, así como el análisis comparativo con aquellos reportados en la literatura especializada<sup>65-67</sup> (**Tabla 6**), permitieron la caracterización de este compuesto como la **2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-*trans*-propenilfuran-3-ona (I)**.



**Figura 12.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-*trans*-propeniifuran-3-ona (**I**) (CDCl<sub>3</sub> δ<sub>H</sub> en ppm).



**Figura 13.** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-*trans*-propeniifuran-3-ona (**I**) (CDCl<sub>3</sub> δ en ppm).

**Tabla 6.** Análisis comparativo de los datos espectroscópicos de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN del producto **I** en CDCl<sub>3</sub>.<sup>65,66</sup>

No.	Datos experimentales		Grove J. et al. 1971	Stierle, D.B. et al. 1997	
	δ <sub>H</sub> ppm <sup>a</sup>	δ <sub>C</sub> ppm <sup>b</sup>	δ <sub>H</sub> ppm <sup>b</sup>	δ <sub>H</sub> ppm <sup>c</sup>	δ <sub>C</sub> ppm <sup>d</sup>
1	1.54 (3H, s)	22.4	1.50 (3H, s)	1.51 (3H, s)	22.1
2		102.0			102.3
3		202.6			203.1
4		107.1			106.7
5		176.9			176.9
6	6.36 (1H, dd, J= 15.6, 1.6Hz)	139.8	6.30 (1H, dd, J= 15.5, 1.0 Hz)	6.33 (1H, dd, J= 15.6, 1.5 Hz)	139.5
7	6.86 (1H, dq, J= 15.2, 6.8 Hz)	119.1	6.85 (1H, dq, J= 15.5, 6.5 Hz)	6.83 (1H, dq, J= 15.6, 6.9 Hz)	118.9
8	1.98 (3H, dd, J= 6.8, 1.2 Hz)	19.2	1.95 (3H, dd, J= 6.5, 1.0 Hz)	1.95 (3H, dd, J= 6.9, 1.5 Hz)	18.8
9	1.72 (3H, s)	5.6	1.68 (3H, s)	1.68 (3H, s)	5.2
OH			4.85 (OH, s)		

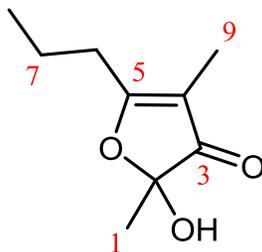
<sup>a</sup> 400, <sup>b</sup> 100, <sup>c</sup> 300 y <sup>d</sup> 75 MHz.

Este producto natural fue obtenido por primera vez a partir del hongo fitopatógeno *Stemphylium radicinum*,<sup>65</sup> y de la especie endófito *Penicillium* sp., aislada de la corteza de *Taxus brevifolia*.<sup>66</sup> Recientemente Osterhage y colaboradores<sup>68</sup> aislaron este producto del hongo *Ascochyta salicorniae*, marino obligado y endófito de la alga verde *Ulva* sp.<sup>67</sup> Cabe destacar que este metabolito presenta propiedades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus*,<sup>66</sup> *Eurotium repens* y *Microbotryum violácea*<sup>68</sup>, además de propiedades antiparasitarias contra cepas resistentes a la cloroquina y a la pirimetamina, *Plasmodium falciparum* K1 y NF 54.<sup>68</sup> Por otra parte, ha mostrado una actividad contra los hemoflagelados *Trypanosoma brucei* subsp. rhodesiense y *T. cruzi*.<sup>68</sup> Finalmente, está reportada la actividad citotóxica contra células de mioblastos de músculo esquelético de rata.<sup>68</sup>

### 5.2.2 Caracterización estructural del compuesto **II**

El compuesto **II** (2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona), se aisló como un aceite con un valor de rotación óptica de  $[\alpha]_D^{20} = -10.8$  (c 0.0012 MeOH). El análisis por espectrometría de masas (**Figura 15B**) reveló la presencia de un ion pseudomolecular en  $m/z$  171.1014  $[M+H]^+$ , el cual corresponde a una

formula molecular de  $C_9H_{14}O_3$  y permite tres grados de insaturación. Por otra parte, el análisis del espectro en modo negativo (**Figura 15C**), permitió observar el ion pseudomolecular  $[M-H]^-$  en una  $m/z$  169.0867.



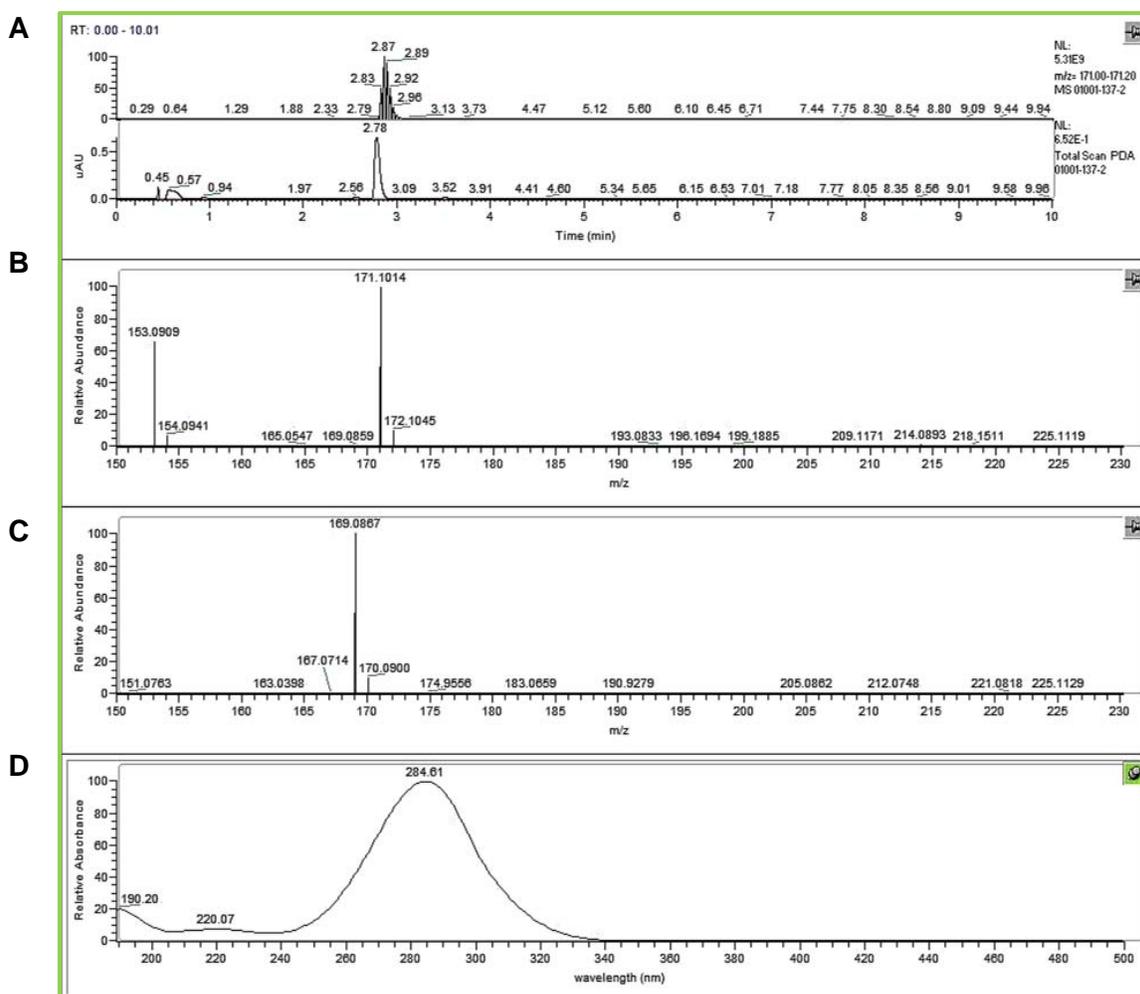
**Figura 14.** 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona (**II**).

El análisis detallado de los espectros de RMN de este producto, permitieron establecer que se trataba también de una propil-furanona y similar a la del producto **I** descrito en el inciso 5.2.1. Las principales diferencias observadas entre los espectros de  $^1H$ -RMN se detallan a continuación:

- En  $\delta_H$  2.48 y 1.70 se observan dos señales como un triplete (t) y un multiplete (m), respectivamente, asignables a dos grupos metilenos con un valor de constante de acoplamiento de 8 Hz.
- En  $\delta_H$  0.98, se observa la presencia de un t que integra para tres protones y asignable a un grupo metilo terminal de una cadena de propilo.
- Además, se observan dos siguletes (s) en  $\delta_H$  1.64 y 1.51, en armonía con la presencia de dos grupos metilo y cuyos desplazamientos químicos son muy parecidos con aquellos descritos para el producto **I**.
- Finalmente, en  $\delta_H$  4.41, se observa una señal como un sigulete ancho (sa), la cual se asocia con la presencia de un grupo hidroxilo.

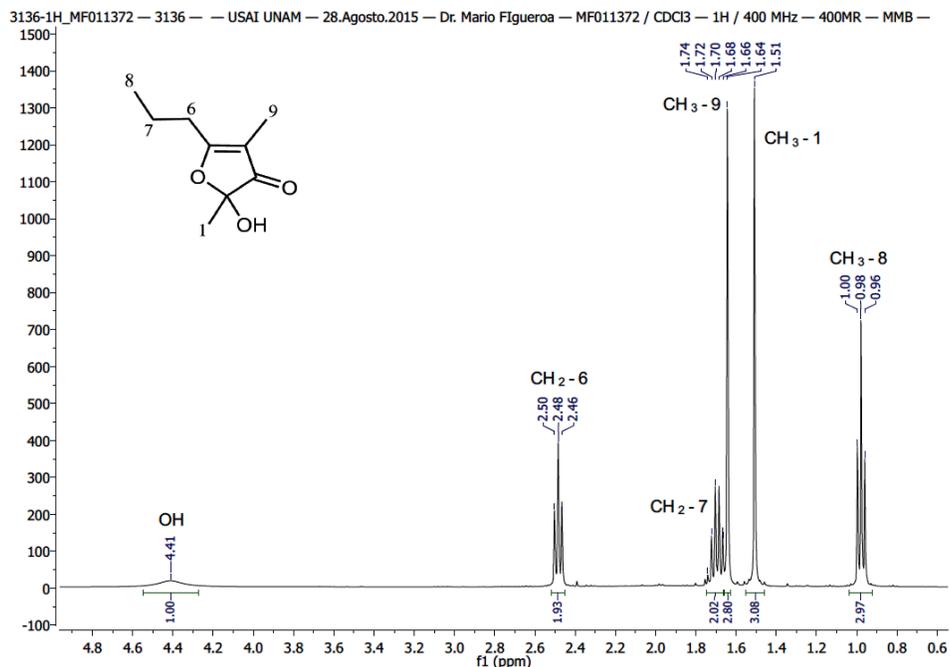
En el espectro de  $^{13}C$ -RMN se observan nueve señales asignables a dos carbonos de metileno ( $\delta_C$  30.6 y 19.3), tres metilos ( $\delta_C$  22.0, 13.5 y 5.4), y cuatro carbonos cuaternarios, tres de ellos base de oxígeno y que están en armonía con la presencia de un grupo cetona  $\alpha,\beta$ -insaturado ( $\delta_C$  202.9 y 107.6) y un grupo éter ( $\delta_C$  187.5 y 102.1) (**Tabla 7**). Estas observaciones, aunadas a la diferencia de 2 uma con

respecto al producto **I**, permitieron establecer que el compuesto **II** corresponde a su dihidro-derivado.

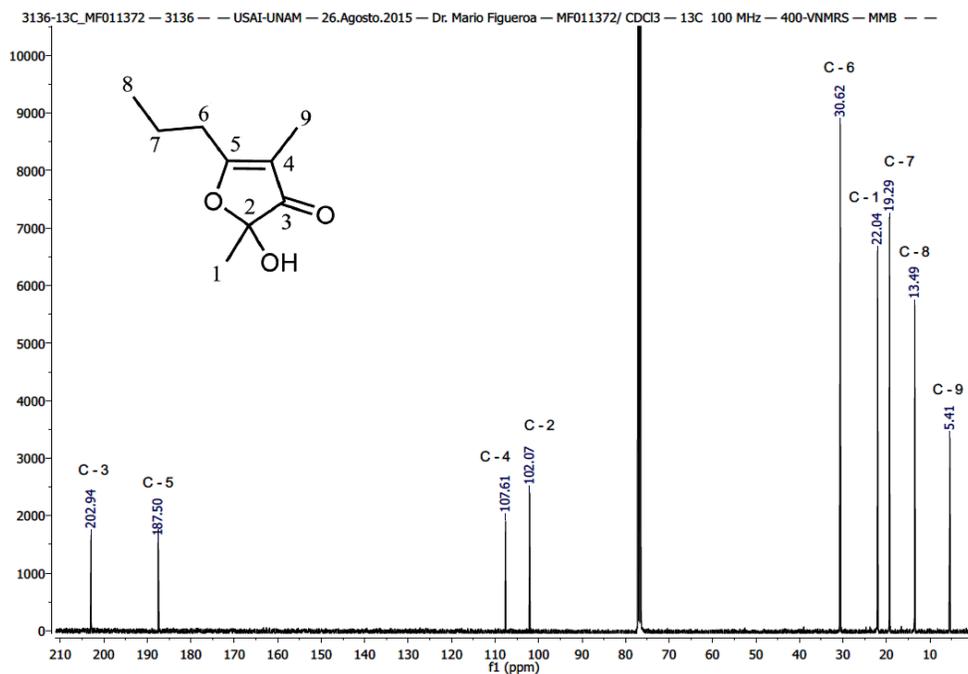


**Figura 15.** Análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto (**II**): (A) Cromatograma de corriente total de iones (TIC; arriba) y en el UV-PDA (abajo). Espectro de masas por la técnica de electrospray en modo (+) (B), en modo (-) (C) y en el UV (D).

Este compuesto fue reportado por Grove y colaboradores<sup>65</sup> como producto de la reducción catalítica de **I**, por lo que este trabajo constituye el primer reporte del aislamiento del producto **II** a partir de una fuente natural.



**Figura 16.** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona (**II**) (CDCl<sub>3</sub> δ<sub>H</sub> en ppm).



**Figura 17.** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz) de la 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona (**II**) (CDCl<sub>3</sub> δ en ppm).

**Tabla 7.** Análisis comparativo de los datos espectroscópicos de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN del producto **II** en  $\text{CDCl}_3$ .<sup>65</sup>

No.	Datos experimentales		Grove, J.F. <i>et al.</i> 1971
	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	1.51 (3H, s)	22.04	
2		102.07	
3		202.94	
4		107.61	
5		187.50	
6	2.48 (2H, t, $J= 8.0$ Hz)	30.62	2.50 (2H, t)
7	1.74–1.66 (2H, m, $J= 8$ Hz)	19.29	1.60 (2H, m)
8	0.98 (3H, t, $J= 8.0$ Hz)	13.49	0.95 (3H, t)
9	1.64 (3H, s)	5.41	1.60 (3H, s)
OH	4.41 (OH, sa)		3.9 (OH, s)

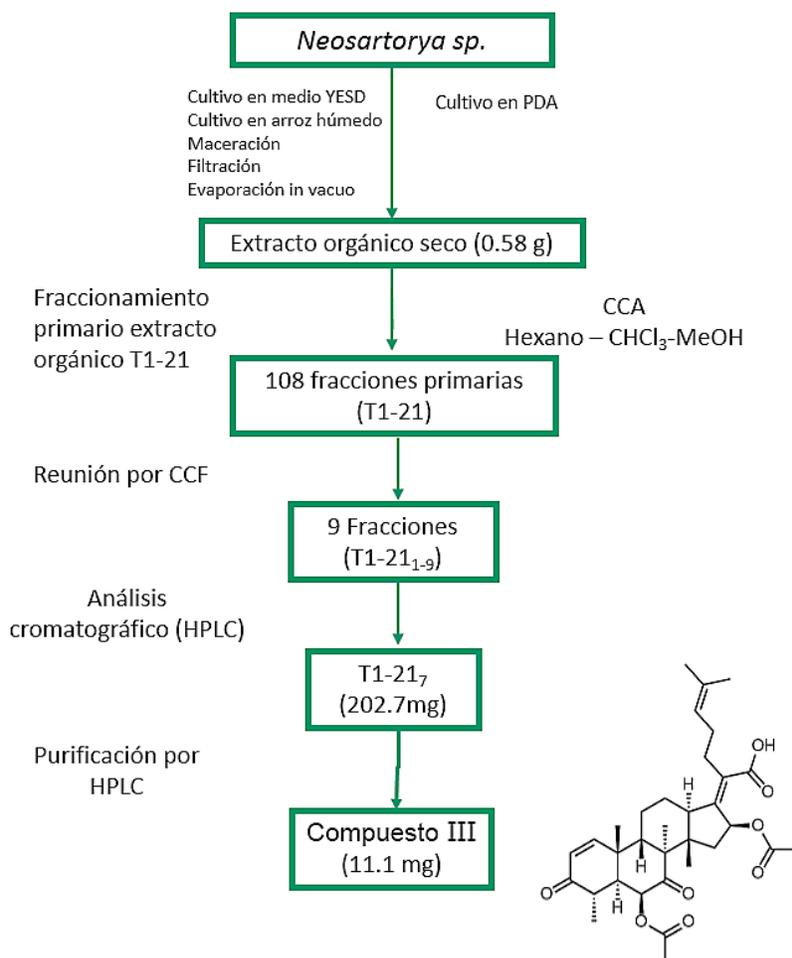
<sup>a</sup> 400 y <sup>b</sup> 100 MHz.

### 5.3 Estudio químico de la especie *Neosartorya* sp. (T1-21)

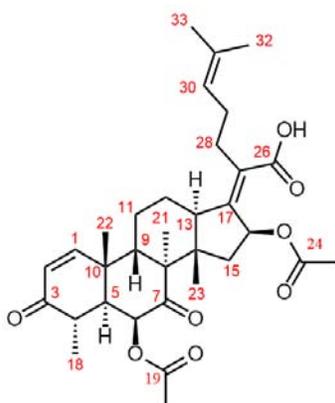
El fraccionamiento del extracto orgánico de la especie *Neosartorya* sp. (T1-21), mediante la aplicación de diversas técnicas cromatográficas convencionales (CCA, HPLC, etc.) (Figura 18), permitió el aislamiento del ácido helvólico (III) (Figura 19). De manera general, la elucidación estructural del compuesto III se realizó mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos convencionales, y por comparación con aquellos datos reportados en la literatura especializada.

#### 5.3.1 Caracterización estructural del compuesto III

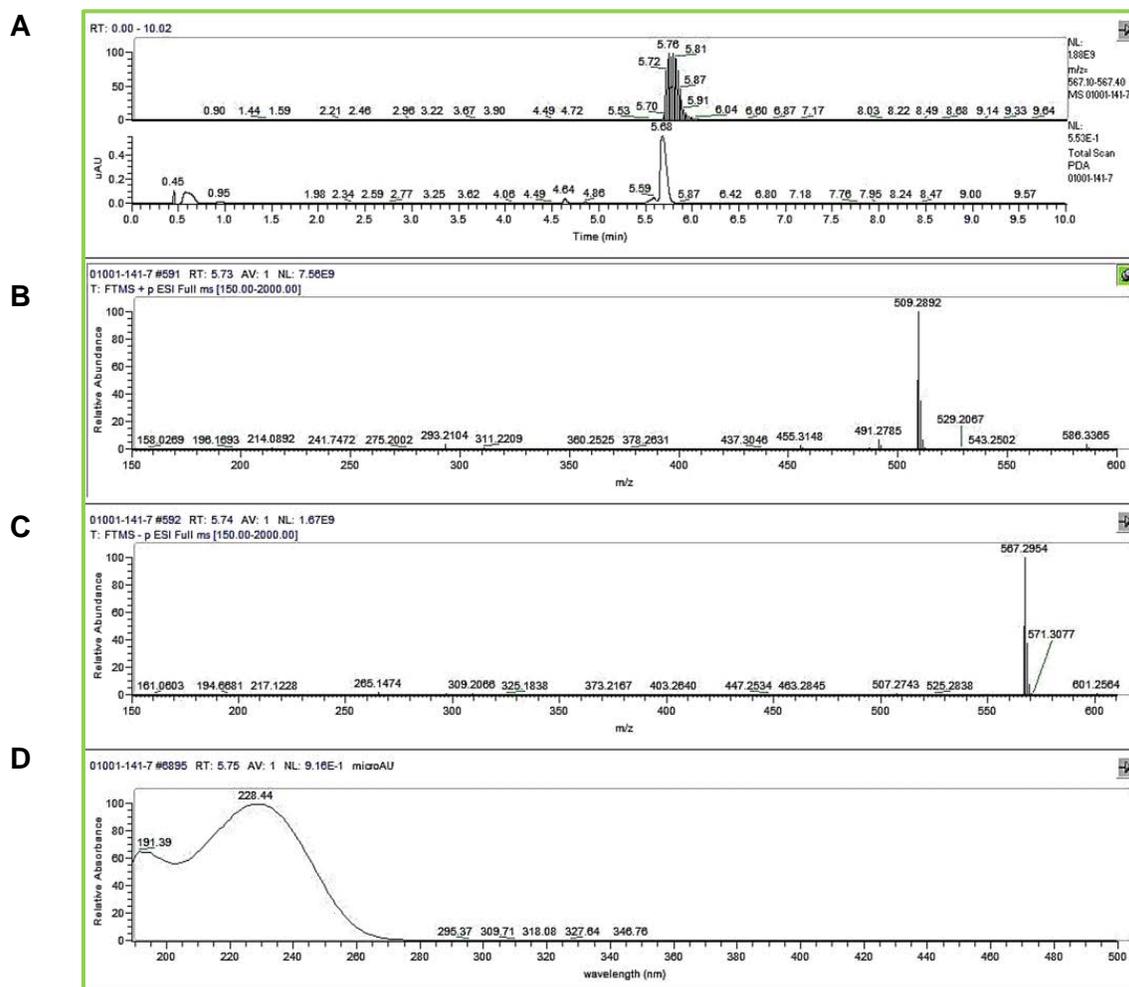
El compuesto III (ácido helvólico) se aisló como un sólido blanco. Los espectros de masas de este compuesto permitieron establecer su peso molecular: en modo (+), observándose un pico base en una  $m/z$  de 509.2892  $[\text{M}-\text{CH}_3\text{COOH}+\text{H}]^+$  correspondiente a la pérdida de un grupo acetato (Figura 20B).<sup>69</sup> Por otra parte, en el modo (-) se observó el ion pseudomolecular en una  $m/z$  de 567.2954  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (Figura 20C). Esta información es congruente para la fórmula molecular  $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_8$  que corresponde con la del ácido helvólico, y que permite 12 grados de insaturación.<sup>70</sup> Los datos de  $^1\text{H}$ -RMN del producto (III) (Figura 21), también están en armonía con los reportados en la literatura.<sup>71-74</sup>



**Figura 18.** Diagrama de flujo de los procesos de fraccionamiento y purificación del compuesto **III** a partir de la especie **T1-21**.



**Figura 19.** Ácido helvético [ácido 16-(acetiloxi)-3,7-dioxo-29-nor-damara-1,17(20),24-trien-21-oico].



**Figura 20.** Análisis por UPLC-PDA-HRESIMS-MS/MS del compuesto (**III**): (**A**) Cromatograma de corriente total de iones (TIC; arriba) y en el UV-PDA (abajo). Espectro de masas por la técnica de electrospray en modo (+) (**B**), en modo (-) (**C**) y en el UV (**D**).

El ácido helvólico (**III**) es una toxina fúngica muy conocida.<sup>75</sup> Este metabolito secundario está clasificado como un nortriterpenoide tetracíclico, y posee un esqueleto de tipo nordamarano,<sup>71</sup> que ha mostrado actividad fitotóxica<sup>76</sup> y antimicrobiana contra bacterias y hongos,<sup>73,74,77-80</sup> así como efectos sinérgicos con la eritromicina contra *Staphylococcus aureus* multiresistente,<sup>81</sup> además de tener actividad antimalárica.<sup>82</sup>

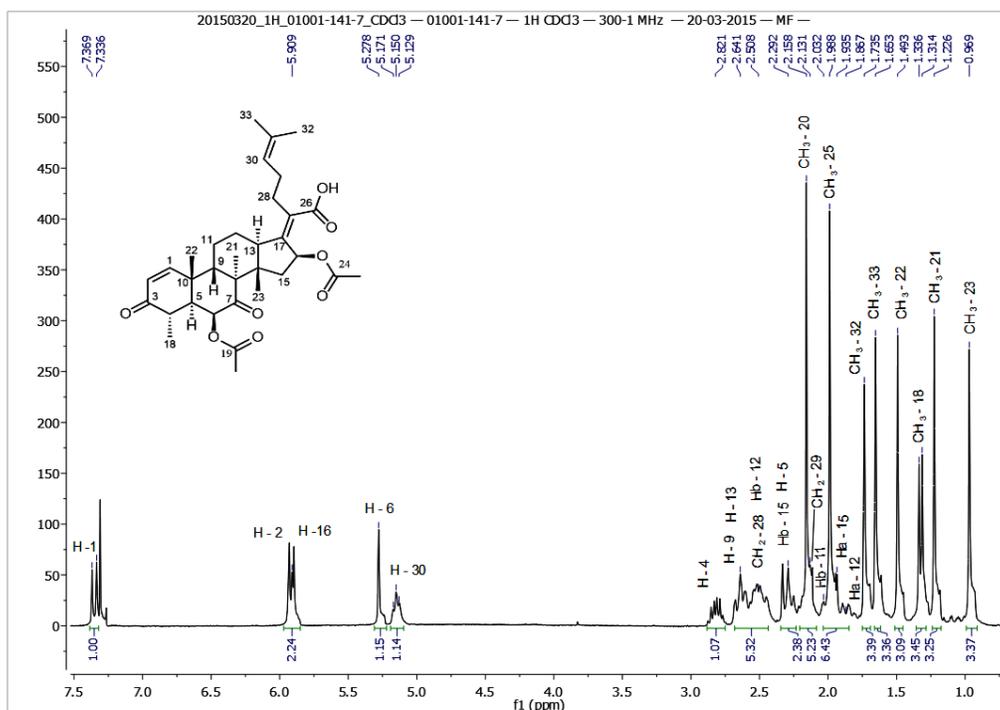


Figura 21. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz) del ácido helvético (**III**) ( $\text{CDCl}_3$   $\delta_{\text{H}}$  en ppm).

El ácido helvético fue aislado por primera vez en 1943 a partir de la especie *Aspergillus fumigatus*.<sup>83</sup> Además, también se ha identificado en otras especies fúngicas como el entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*,<sup>84</sup> el patógeno del arroz *Sarocladium oryzae*,<sup>85</sup> el marino *Aspergillus sydowi*,<sup>78</sup> y en los endófitos *Alternaria* sp. FL25 de *Ficus carica*,<sup>74</sup> *Aspergillus* sp. CY725 de *Cynodon dactylon*,<sup>77</sup> entre otros (Tabla 3).<sup>69–71,73,86–91</sup>

#### 5.4 Actividad citotóxica de los productos I y III

Como se indicó en el inciso 4.8, la actividad biológica de los compuestos **I-III** se determinó mediante el ensayo de citotoxicidad con el colorante SRB y sobre un panel de líneas celulares humanas. Así, el compuesto **I** fue citotóxico contra las células MCF7 y HTC15 con valores de  $\text{Cl}_{50}$  de  $67.8 \pm 13.7$  y  $124.4 \pm 95 \mu\text{M}$ , respectivamente, y el compuesto **III** contra HTC15 con una  $\text{Cl}_{50}$  de  $38.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ .

## 6. CONCLUSIONES

- 1) Se realizó el estudio químico de las especies fúngicas saprótrofas *Phoma macrostoma* (T1-86) y *Neosartorya* sp. (T1-21), aisladas a partir de una muestra de tierra formada sobre coladas de lava.
- 2) La selección de las especies objeto de estudio a partir de los ensayos de citotoxicidad y los estudios de derreplicación, representan herramientas adecuadas para la búsqueda de nuevas entidades químicas bioactivas.
- 3) A partir de la especie *P. macrostoma* se aislaron y se caracterizaron dos compuestos de tipo propil-furanona, designados como 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-*trans*-propenilfuran-3-ona (**I**) y 2,3-dihidro-2-hidroxi-2,4-dimetil-5-propilfuran-3-ona (**II**). Este trabajo representa el primer reporte del aislamiento del producto **II** a partir de una fuente natural. El producto **I** mostró actividad citotóxica contra las líneas celulares MCF7 y HTC15.
- 4) El fraccionamiento primario de la especie *Neosartorya* sp. permitió el aislamiento y caracterización de un compuesto mayoritario, el ácido helvólico (**III**), el cual también presentó actividad citotóxica contra HCT15.
- 5) El presente trabajo de investigación constituye una aportación original al conocimiento de la biodiversidad fúngica de especies saprótrofas de nuestro país.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Cragg, G. *et al.* Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**, 3670–3695 (2013).
2. DNP Dictionary of Natural Products. Chapman & Hall/CRC. *Chemical Database*. London, UK. <http://www.chemnetbase.com>.
3. Lederberg, J. Infectious history. *Science* **288**, 287–93 (2000).
4. Guarro, J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **30**, 33–39 (2012).
5. Blackwell, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species? *Am. J. Bot.* **98**, 426–438 (2011).
6. Hibbett, D. *et al.* A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol. Res.* **111**, 509–547 (2007).
7. Schoch, C. *et al.* Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 6241–6246 (2012).
8. Demain, A. *et al.* Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **62**, 5–16 (2009).
9. Keller, N. *et al.* Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937–947 (2005).
10. Hoffmeister, D. *et al.* Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 393–416 (2007).
11. Borel, J. History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development. *Wien. Klin. Wochenschr.* **114**, 433–437 (2002).
12. Fujita, T. *et al.* Fungal metabolites. Part 12. Potent immunosuppressant, 14-deoxomyriocin,(2S,3R,4R)-(E)-2-amino-3,4-dihydroxy-2-hydroxymethyleicos-6-enoic acid and structure-activity relationships of myriocin derivatives. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **47**, 216–224 (1994).
13. Alberts, A. *et al.* Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 3957–3961 (1980).
14. Odier, F. *et al.* *In vitro* effect of fungal cyclodepsipeptides on leukemic cells:

- Study of destruxins A, B and E. *Biol. Cell* **74**, 267–271 (1992).
15. Graupner, P. *et al.* The macrocidins: Novel cyclic tetramic acids with herbicidal activity produced by *Phoma macrostoma*. *J. Nat. Prod.* **66**, 1558–1561 (2003).
  16. Bailey, K. *et al.* The effects of *Phoma macrostoma* on nontarget plant and target weed species. *Biol. Control* **58**, 379–386 (2011).
  17. Bailey, K. *et al.* The effect of fertilizers on the efficacy of the bioherbicide, *Phoma macrostoma*, to control dandelions in turfgrass. *Biol. Control* **65**, 147–151 (2013).
  18. Kubota, M. *et al.* Black rot of artichoke leaves caused by two *Phoma* species in Japan. *J. Gen. Plant Pathol.* **68**, 208–211 (2002).
  19. Boerema, G. Additional notes on *Phoma herbarum*. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* **6**, 15–48 (1970).
  20. Pedras, M. *et al.* Phomalairdenone: A new host-selective phytotoxin from a virulent type of the blackleg fungus *Phoma lingam*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **9**, 3291–3294 (1999).
  21. Rivero, F. *et al.* Erratum to ‘conformational behavior and absolute stereostructure of two phytotoxic nonenolides from the fungus *Phoma herbarum*’. *Tetrahedron* **56**, 5337–5344 (2000).
  22. Vemkatasubbaiah, P. *et al.* An epoxydon-derived ester from a *Phoma* sp., pathogenic to Rhubarb. *J. Nat. Prod.* **55**, 639–643 (1992).
  23. Evidente, A. *et al.* Putaminoxin, a phytotoxic nonenolide from *Phoma putaminum*. *Phytochemistry* **40**, 1637–1641 (1995).
  24. Pedras, M. *et al.* Phomalirazine, a novel toxin from the phytopathogenic fungus *Phoma lingam*. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1904–1905 (1989).
  25. Pedras, M. *et al.* Structure and biological activity of maculansin A, a phytotoxin from the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytochemistry* **69**, 2966–2971 (2008).
  26. Pedras, M. *et al.* Production of 2,5-dioxopiperazine by a new isolate type of the blackleg fungus *Phoma lingam*. *Phytochemistry* **49**, 1575–1577 (1998).
  27. Pedras, M. *et al.* Phomapyrones: Three metabolites from the blackleg fungus. *Phytochemistry* **36**, 1315–1318 (1994).

28. Topgi, R. *et al.* Phomenoic acid and phomenolactone, antifungal substances from *Phoma lingam* (Tode) Desm.: Kinetics of their biosynthesis, with an optimization of the isolation procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 966–968 (1987).
29. Ichihara, A. *et al.* Structures of betaenones A and B, novel phytotoxins from *Phoma betae* Fr. *J. Am. Chem. Soc.* **105**, 2907–2908 (1983).
30. Parisi, A. *et al.* Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. *Phytochemistry* **32**, 865–867 (1993).
31. Arie, T. *et al.* Control of clubroot of crucifers by *Phoma glomerata* and its product epoxydon. *Pestic. Sci.* **55**, 602–604 (1999).
32. Venkatasubbaiah, P. *et al.* Phytotoxic metabolites of *Phoma sorghina*, a new foliar pathogen of pokeweed. *Mycologia* **84**, 715–723 (1992).
33. Evidente, A. *et al.* Putaminoxins B and C from *Phoma putaminum*. *Phytochemistry* **44**, 1041–1045 (1997).
34. Sugawara, F. *et al.* Zinniol, a phytotoxin, is produced by *Phoma macdonaldii*. *Plant Sci.* **43**, 19–23 (1986).
35. Gurjar, M. *et al.* First total synthesis of herbarumin III. *Tetrahedron Lett.* **45**, 4525–4526 (2004).
36. Krohn, K. *et al.* Secondary metabolites isolated from an endophytic *Phoma* sp. Absolute configuration of tetrahydropyrenophorol using the solid-state TDDFT CD methodology. *European J. Org. Chem.* **2007**, 3206–3211 (2007).
37. Cimmino, A. *et al.* Production of phytotoxins by *Phoma exigua* var. *exigua*, a potential mycoherbicide against perennial thistles. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 6304–6309 (2008).
38. Borges, W. *et al.* Novel anthraquinone derivatives produced by *Phoma sorghina*, an endophyte found in association with the medicinal plant *Tithonia diversifolia* (Asteraceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **17**, 929–934 (2006).
39. Bailey, K. *et al.* Determining the infection process of *Phoma macrostoma* that leads to bioherbicidal activity on broadleaved weeds. *Biol. Control* **59**, 268–276 (2011).
40. Nielsen, P. *et al.* Growth of and fumitremorgin production by *Neosartorya*

- fischeri* as affected by temperature, light, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1504–1510 (1988).
41. Samson, R. *et al.* Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud. Mycol.* **59**, 147–203 (2007).
  42. Gomes, N. *et al.* Antibacterial and antibiofilm activities of tryptoquivalines and meroditerpenes isolated from the marine-derived fungi *Neosartorya paulistensis*, *N. laciniosa*, *N. tsunodae*, and the soil fungi *N. fischeri* and *N. siamensis*. *Mar. Drugs* **12**, 822–839 (2014).
  43. Eamvijarn, A. *et al.* Bioactive meroditerpenes and indole alkaloids from the soil fungus *Neosartorya fischeri* (KUFC 6344), and the marine-derived fungi *Neosartorya laciniosa* (KUFC 7896) and *Neosartorya tsunodae* (KUFC 9213). *Tetrahedron* **69**, 8583–8591 (2013).
  44. Tan, Q. *et al.* Bioactive metabolites from a marine-derived strain of the fungus *Neosartorya fischeri*. *Nat. Prod. Res.* **26**, 1402–1407 (2012).
  45. Yaguchi, T. *et al.* A new species of *Neosartorya* from Taiwan soil. *Mycoscience* **35**, 309–313 (1994).
  46. Frisón, L. *et al.* Identificación y caracterización de especies de *Neosartorya* aisladas de frutillas (*Fragaria* spp.) frescas y tratadas térmicamente. *Rev. Venez. Cienc. y Tecnol. Aliment.* **3**, 319–329 (2012).
  47. Fujimoto, H. *et al.* Structure of fischerin, a new toxic metabolite from an Ascomycete, *Neosartorya fischeri* var. *fischeri*. *J. Nat. Prod.* **56**, 1268–1275 (1993).
  48. Masi, M. *et al.* Fischerindoline, a pyrroloindole sesquiterpenoid isolated from *Neosartorya pseudofischeri*, with *in vitro* growth inhibitory activity in human cancer cell lines. *Tetrahedron* **69**, 7466–7470 (2013).
  49. Jayasuriya, H. *et al.* Discovery and antibacterial activity of glabramycin A–C from *Neosartorya glabra* by an antisense strategy. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **62**, 265–269 (2009).
  50. Wong, S. *et al.* Fiscalins. New substance p inhibitors produced by the fungus *Neosartorya fischeri*. Taxonomy, fermentation, structures, and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **46**, 545–553 (1993).

51. Proksa, B. *et al.* Neosartorin, an ergochrome biosynthesized by *Neosartorya fischeri*. *Phytochemistry* **48**, 1161–1164 (1998).
52. Buttachon, S. *et al.* Sartorymensin, a new indole alkaloid, and new analogues of tryptoquivaline and fiscalins produced by *Neosartorya siamensis* (KUFC 6349). *Tetrahedron* **68**, 3253–3262 (2012).
53. Morino, T. *et al.* NK372135s, novel antifungal agents produced by *Neosartoria fischeri*. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **47**, 1546–1548 (1994).
54. Yim, T. *et al.* A new meroterpenoid tatenoic acid from the fungus *Neosartorya tatenoii* KKU-2NK23. *Nat. Prod. Res.* **28**, 1847–1852 (2014).
55. Kaifuchi, S. *et al.* Sartorypyrone D: A new NADH-fumarate reductase inhibitor produced by *Neosartorya fischeri* FO-5897. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **68**, 403–405 (2015).
56. Wakana, D. *et al.* Isolation of isoterrein from *Neosartorya fischeri*. *Mycotoxins* **56**, 3–6 (2006).
57. Yin, W. *et al.* Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J. Biol. Chem.* **284**, 100–109 (2009).
58. Eamvijarn, A. *et al.* Secondary metabolites from a culture of the fungus *Neosartorya pseudofischeri* and their *in vitro* cytostatic activity in human cancer cells. *Planta Med.* **78**, 1767–1776 (2012).
59. Asami, Y. *et al.* Azaspirorene: A novel angiogenesis inhibitor containing a 1-oxa-7-azaspiro[4.4]non-2-ene-4,6-dione skeleton produced by the fungus *Neosartorya* sp. *Org. Lett.* **4**, 2845–2848 (2002).
60. Yang, S. *et al.* Bioactive  $\gamma$ -lactones from the fermented broth of *Neosartorya* sp. *Planta Med.* **76**, 1701–1705 (2010).
61. El-Elimat, T. *et al.* High-Resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *J. Nat. Prod.* **76**, 1709–1716 (2013).
62. Vichai, V. *et al.* Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* **1**, 1112–1116 (2006).

63. Bautista, A. Aislamiento e identificación de metabolitos biodinámicos a partir de especies fúngicas de México. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2014).
64. Richards, S. *et al.* Essential practical NMR for essential practical NMR for organic chemistry. (2011).
65. Grove, F. Metabolic products of *Stemphylium radicinum*. Part IV. Minor products. *J. Chem. Soc. C Org.* 2261–2263 (1971).
66. Stierle, B. *et al.* New phomopsolides from a *Penicillium* sp. *J. Nat. Prod.* **60**, 1207–1209 (1997).
67. Wang, H. *et al.* Chemical constituents in roots of *Osbeckia opipara*. *China Journal of Chinese Materia Medica* **34**, 414–8 (2009).
68. Osterhage, C. *et al.* Ascosalipyrrolidinone A, an antimicrobial alkaloid, from the obligate marine fungus *Ascochyta salicorniae*. *J. Org. Chem.* **65**, 6412–6417 (2000).
69. Kildgaard, S. *et al.* Accurate dereplication of bioactive secondary metabolites from marine-derived fungi by UHPLC-DAD-QTOFMS and a MS/HRMS library. *Mar. Drugs* **12**, 3681–3705 (2014).
70. Larsen, T. *et al.* Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. *Med. Mycol.* **45**, 225–232 (2007).
71. Ratnaweera, P. *et al.* Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka. *Mycology* **5**, 23–28 (2014).
72. Hussain, H. *et al.* Antimicrobial and phytochemical investigation of the endophytic fungus *Acremonium* sp. *Topclass J. Herb. Med.* **3**, 1–4 (2014).
73. Zhao, J. *et al.* Antimicrobial metabolites from the endophytic fungus *Pichia guilliermondii* isolated from *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. *Molecules* **15**, 7961–7970 (2010).
74. Feng, C. *et al.* Isolation and anti-phytopathogenic activity of secondary metabolites from *Alternaria* sp. FL25, an endophytic fungus in *Ficus carica*. *Chinese J. Applied Environ. Biol.* **16**, 76–78 (2010).

75. Waksman, S. *et al.* Two antagonistic fungi, *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus clavatus*, and their antibiotic substances. *J. Bacteriol.* **45**, 233–248 (1943).
76. Tschen, J. *et al.* Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Sarocladium oryzae*. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **38**, 251–256 (1997).
77. Li, Y. *et al.* Anti-*Helicobacter pylori* substances from endophytic fungal cultures. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 553–558 (2005).
78. Zhang, M. *et al.* Cytotoxic alkaloids and antibiotic nordammarane triterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus sydowi*. *J. Nat. Prod.* **71**, 985–989 (2008).
79. Li, J. *et al.* Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 3424–3431 (2012).
80. Godtfredsen, W. *et al.* Structure-activity relationships in fusidic acid-type antibiotics. *Adv. Appl. Microbiol.* **25**, 95–146 (1979).
81. Qin, L. *et al.* *In vitro* synergistic antibacterial activities of helvolic acid on multi-drug resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Prod. Res.* **23**, 309–318 (2009).
82. Sawadsitang, S. *et al.* Antimalarial and cytotoxic constituents of *Xylaria cf. cubensis* PK108. *Nat. Prod. Res.* **29**, 2033–2036 (2015).
83. Chain, E. *et al.* Helvolic acid, and antibiotic produced by *Aspergillus fumigatus*. *Br. J. Exp. Pathol.* **24**, 108–119 (1943).
84. Lee, S. *et al.* Identification of novel derivative of helvolic acid from *Metarhizium anisopliae* grown in medium with insect component. *J. Biosci. Bioeng.* **105**, 476–480 (2008).
85. Sakthivel, N. *et al.* Production of phytotoxic metabolites by *Sarocladium oryzae*. *Mycol. Res.* **106**, 609–614 (2002).
86. Okuda, S. *et al.* The structure of helvolic acid. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **12**, 121–124 (1964).
87. Pinheiro, Â. *et al.* A new bicyclic sesquiterpene from the marine sponge associated fungus *Emericellopsis minima*. *Phytochem. Lett.* **5**, 68–70 (2012).

88. Bills, G. *et al.* Conspecificity of the cerulenin and helvolic acid producing 'Cephalosporium caerulens', and the hypocrealean fungus *Sarocladium oryzae*. *Mycol. Res.* **108**, 1291–1300 (2004).
89. Fujimoto, H. *et al.* Isolation of new tremorgenic metabolites from an Ascomycete, *Corynascus setosus*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **44**, 1843–1848 (1996).
90. Wang, F. *et al.* Neoplaether, a new cytotoxic and antifungal endophyte metabolite from *Neoplaconema napellum* IFB-E016. *FEMS Microbiol. Lett.* **261**, 218–223 (2006).
91. Jayanetti, D. *et al.* Hypocoprins A–C: New sesquiterpenoids from the coprophilous fungus *Hypocopra rostrata*. *J. Nat. Prod.* **78**, 396–401 (2015).