



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Posgrado en Ciencias Químicas



Búsqueda, extracción, purificación y elucidación de productos naturales a partir de microorganismos

Tesis presentada para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Químicas
En el área de Química Orgánica

Presenta:

M.C. Francisco Fidel Salazar de la Luz

Directora de Tesis:

Dra. Estibaliz Sansinenea Royano

Coasesor de Tesis:

Dr. J. Aurelio Ortiz Márquez

Noviembre | 2020



BUAP

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto la Comisión Revisora formada por el Dra. Martha Sosa Rivadeneyra, Dra. Rosa Luisa Meza León, Dr. Eugenio Sánchez Ameola, Dra. Guadalupe Hernández Linares y la Dra. Carmen María González Álvarez, informan haber leído y aprobado para su impresión, la tesis denominada "**Búsqueda, extracción, purificación y elucidación de productos naturales a partir de microorganismos**", que presenta el alumno **M.C. Francisco Fidel Salazar de la Luz** para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Se extiende la presente a los veintitrés días del mes de octubre del año dos mil veinte.

ATENTAMENTE

Dra. Martha Sosa Rivadeneyra

Dra. Rosa Luisa Meza León

Dr. Eugenio Sánchez Ameola

Dra. Guadalupe Hernández Linares

Dra. Carmen María González

Agradecimientos

En estas primeras líneas quisiera expresar mi agradecimiento por su gran apoyo, no solo durante el proceso de este proyecto, sino a lo largo de esta experiencia en el ámbito de la investigación y sobre todo por impulsarme a desarrollarme profesionalmente a mis asesores: Dra. Estibaliz Sansinenea Royano y Dr. José Aurelio Ortiz Márquez.

Un agradecimiento muy especial a la Dra. Carmen Elisa Díaz Hernández por haberme recibido en su laboratorio de investigación en el IPNA-CSIC, Tenerife, España, durante la estancia de investigación, al brindarme sus conocimientos y su gran apoyo en todo lo necesario para seguir creciendo profesionalmente.

A la comisión revisora y Jurado de examen por su disposición e invaluable ayuda brindada para la conclusión de este proyecto.

Dra. Martha Sosa Rivadeneyra

Dra. Rosa Luisa Meza León

Dra. Guadalupe Hernández Linares

Dra. Carmen María González Álvarez

Dr. Eugenio Sánchez Arreola

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la concesión de beca doctoral y beca mixta (2016-2020), a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) por el apoyo otorgado.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP) y en especial al Posgrado en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Químicas.

A mis padres Dorotea de la Luz y Fidel Salazar por forjarme con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mi hermana Alberta Salazar, sobrinos Hannia Ita-ii y M. Xavier, por motivarme y ser ese apoyo en mi día a día.

A mis amigos: Alejandro, Jessica, Yharely, Deyanira, Andrea, Daniel, por ser esos cómplices de intrépidas aventuras, agradezco su cariño, respeto y amistad, por aquellas horas de charlas inmejorables; repletas de múltiples conocimientos, momentos tan llenos de una explosiva química, por regalarme esa gran amistad; J.G Fermín.

Francisco Fidel Salazar de la Luz

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana y Síntesis Orgánica del Posgrado en Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), bajo la dirección de la Dra. Estibaliz Sansinenea Royano y Dr. J. Aurelio Ortiz Márquez y durante una estancia realizada en el Laboratorio de Biotecnología y Química de Productos Naturales en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), San Cristóbal de la Laguna, Tenerife, España, bajo la dirección de la Dra. Carmen Elisa Díaz Hernández, con el apoyo económico de la beca nacional y mixta otorgada por CONACYT con número de registro 291212 y el proyecto CONACyT 251512.

Publicaciones

Parte de los resultados obtenidos durante la elaboración de la presente Tesis Doctoral han generado la siguiente publicación:

- Francisco Salazar, Aurelio Ortiz, Estibaliz Sansinenea. "Characterization of two novel bacteriocin-like substances produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 with broad-spectrum antimicrobial activity". *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. **2017**, 11, 177 – 182.
- Francisco Salazar, Aurelio Ortiz, Estibaliz Sansinenea. A strong antifungal activity of 7-O-succinyl macrolactin A vs Macrolactin A from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. *Current Microbiology*. **2020**, 77, 3409-3413.

Se realizó una estancia en el Laboratorio de Biotecnología y Química de Productos Naturales en el Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC), San Cristóbal de la Laguna, Tenerife, España, en el periodo de septiembre 2017 a agosto 2018.

Se ha participado en los siguientes Congresos:

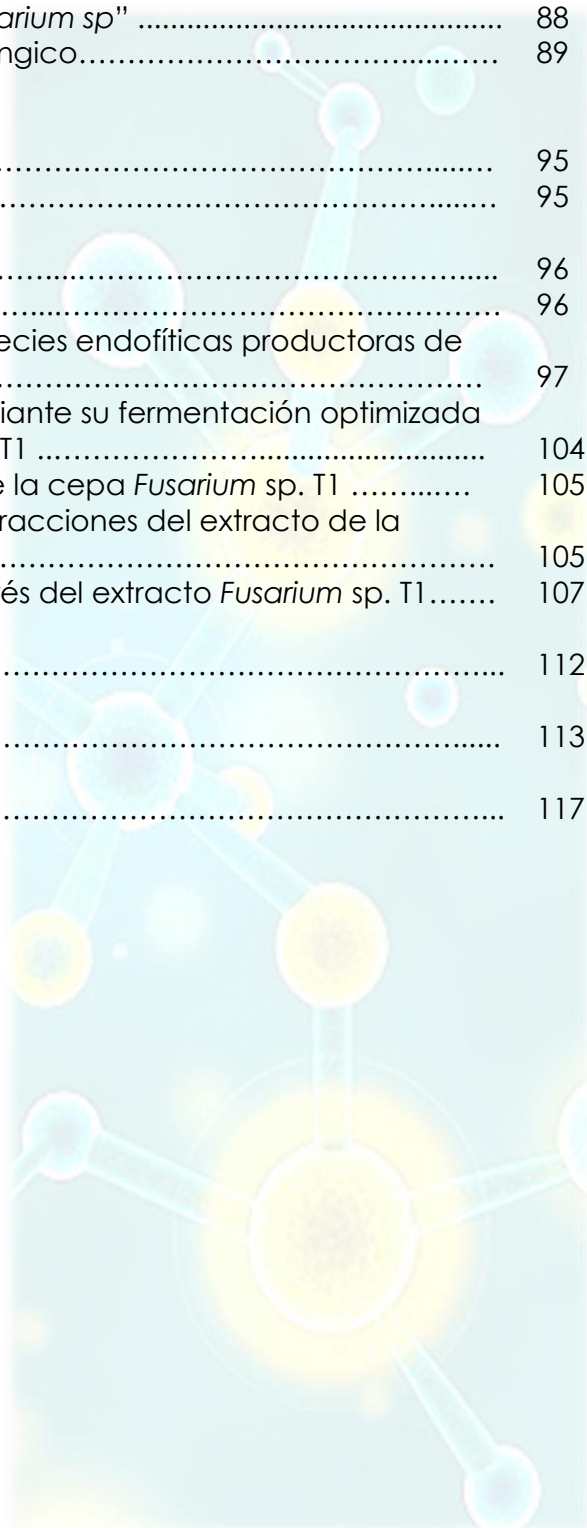
- 13º Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales 17-20 mayo 2017. Extracción y caracterización de dos compuestos de tipo bacteriocina y dos lipopéptidos a partir de la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens*. Morelia, Michoacán (México)
- 15º Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales 22-25 mayo 2019. Aislamiento y caracterización de Macrolactinas en una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens* ELI-149. San Luis Potosí (México)

Índice

Abreviaturas.....	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Antecedentes Generales	12
Capítulo 1	
1.1 Antecedentes: Bacteria " <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> "	15
1.1.1 Productos naturales de <i>Bacillus</i> sp	16
1.1.2 Bacteriocinas	17
1.1.3 Lipopéptidos	19
1.1.4 Policétidos	23
1.1.4.1 Policétidos tipo macrólidos; Macrolactinas	24
1.1.4.2 Síntesis orgánica de Macrolactina A	27
1.2 Objetivos	
1.2.1 Objetivo General	31
1.2.2 Objetivos Particulares	31
1.3 Discusión de Resultados	32
1.3.1 Fraccionamiento del extracto y selección biodirigida de compuestos antibacterianos	32
1.3.1.1 Evaluación de la estabilidad de las bacteriocinas bajo diferentes pH y temperaturas	39
1.3.1.2 Selección biodirigida de metabolitos con actividad antifúngica	39
1.3.1.3 Detección de la actividad antifúngica y daño celular de los lipopéptidos en hongos fitopatógenos	42
1.3.2 Búsqueda de metabolitos de tipo policétido	44
1.3.2.1 Caracterización de 7-O-succinil-macrolactina A	45
1.3.3 Estudio de medios para posible aislamiento de otras Macrolactinas	56
1.3.3.1 Caracterización de macrolactina A	58
1.3.4 Pruebas biológicas de las dos macrolactinas	67
1.4 Conclusiones	75
1.5 Desarrollo Experimental	77
1.6 Referencias	84

Capítulo II

2.1 Antecedentes: Hongo endófito " <i>Fusarium sp</i> "	88
2.1.1 Productos naturales de origen fúngico.....	89
2.2 Objetivos	
2.2.1 Objetivo General.....	95
2.2.2 Objetivos específicos	95
2.3 Discusión de Resultados	96
2.3.1 Obtención de microextractos	96
2.3.2 Selección bio-dirigida de las especies endofíticas productoras de metabolitos de interés	97
2.3.3 Producción biotecnológica mediante su fermentación optimizada en mayor escala de <i>Fusarium sp</i> T1	104
2.3.4 Fraccionamiento del extracto de la cepa <i>Fusarium sp.</i> T1	105
2.3.5 Identificación biodirigida de las fracciones del extracto de la cepa <i>Fusarium sp.</i> T1	105
2.3.6 Análisis de las fracciones de interés del extracto <i>Fusarium sp.</i> T1.....	107
2.4 Conclusiones	112
2.5 Desarrollo experimental	113
2.6 Referencias	117



Abreviaturas

1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
COSY	Correlations Spectroscopy
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DCM	Diclorometano
EI-MS	Espectrometría de masas por impacto electrónico
HSQC	Heteronuclear Simple Quantum Correlation
IR	Espectroscopia infrarroja
J	Constante de acoplamiento
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
PDA	Medio de cultivo papa dextrosa
Re	Resistente
Se	Sensible
RMN	Resonancia magnética nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
s	Señal simple
t	Señal triple
CCF	Cromatografía en capa fina
CLV	Cromatografía líquida bajo vacío
TSB	Medio de cultivo tripticaseína de soya
TA	Temperatura ambiente
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio

Resumen

El presente trabajo se desarrolló en el área de Productos Naturales, compuestos orgánicos derivados del metabolismo secundario de organismos vivos. En este proyecto se utilizaron dos microorganismos de interés; la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* y un hongo endófito *Fusarium sp*, por lo cual este trabajo se ha dividido en dos capítulos.

En el primer capítulo se presenta el estudio de los compuestos orgánicos aislados de la bacteria *B. amyloliquefaciens* ELI149, con ayuda de la resina adsorbente Amberlita® XAD-16. Los compuestos estudiados son: de tipo bacteriocina con un amplio espectro de actividad antibacteriana, las cuales demostraron una alta resistencia al calor y pH (2-10) conservando su actividad, dos lipopéptidos llamados Surfactina y Fengicina, con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos, y por último se aislaron dos compuestos tipo policétidos (macrolactinas) que con ayuda de la espectroscopia de RMN 1D y RMN 2D se lograron identificar sus estructuras adecuadamente y se probó su actividad frente a hongos fitopatógenos en una concentración mínima (1 mg/mL) lográndose observar el daño celular producido por estos compuestos a microscopia de contraste de fases.

En el segundo capítulo se presenta el estudio de los compuestos orgánicos obtenidos de un hongo endófito llamado *Fusarium sp*. aislado de la planta *Mentha rotundifolia* para evaluar su potencial biotecnológico. El extracto de esta cepa fue capaz de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Mediante una producción a gran escala se obtuvo un macro-extracto, fraccionándolo mediante cromatografía en columna y posteriormente con cada fracción se realizó una nueva selección biodirigida para la localización de los compuestos responsables de esta actividad. Finalmente se realizó la elucidación estructural de los compuestos obtenidos.

Abstract

The presented PhD thesis was developed in the topic of organic chemistry of natural products, which are organic compounds derived from secondary metabolism of living organisms. In this project two different microorganisms were investigated; *Bacillus amyloliquefaciens* bacterium and *Fusarium* sp. endophytic fungus therefore this work was divided in two chapters.

In the first chapter, the study of the natural organic compounds isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149 bacterium is realized with the help of an adsorbent resin (Amberlite® XAD-16). The studied compounds are: bacteriocin like compounds which were heat stable and were not sensitive to acid or alkaline conditions (pH 2–10), with broad-spectrum antimicrobial activity, two lipopeptides called surfactin and fengycin with antifungal activity against phytopathogenic fungi and at last two polyketide compounds (macrolactins) which were completely elucidated with NMR 1D and 2D and were tested against phytopathogenic fungi in a minimum concentration (1 mg/mL) observing a cell damage by contrast phase microscopy.

In the second chapter, the study of the organic natural compounds from *Fusarium* sp. endophytic fungus, isolated from *Mentha rotundifolia* plant, is realized to evaluate its biotechnological potential. This strain was able to inhibit the growth of phytopathogenic fungi. Through a high scale production, a macro-extract was achieved fractionating it by column chromatography to realize a new leaded selection to localize the responsible compounds of this activity. Finally, the achieved compounds were structurally elucidated.

Introducción

Todo se rige por reacciones químicas; desde el universo al formar una estrella hasta cuando una célula se divide para iniciar una vida. Es por ello que son tan importantes para todo proceso. En los seres humanos hay más de 300 billones de células que realizan múltiples reacciones teniendo como resultado los metabolitos primarios, los cuales son esenciales para el mantenimiento y funcionamiento de la célula. Ejemplo de este tipo de metabolitos son carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Todo este proceso se lleva a cabo en células de humanos, pero de igual forma se realiza en otros organismos; ahora bien, existen otras reacciones que se llevan a cabo y que no son vitales pero que usualmente producen otros compuestos que ayudan a la supervivencia de las mismas, estos son los metabolitos secundarios, también llamados productos naturales. [1-4]

Es por ello que la exploración de compuestos producidos por el metabolismo secundario de células pertenecientes a plantas, insectos y mamíferos es muy importante; sin embargo, otra fuente que no ha sido muy explorada son la de los microorganismos tanto de bacterias y los hongos, siendo éstos un reservorio rico en productos naturales de estructuras muy diferentes con múltiples actividades para el beneficio del ser humano. Los productos naturales pueden ser utilizados como antibióticos, pigmentos, toxinas y promotores de crecimiento vegetal entre otros.

Los hongos también son ricos en metabolitos secundarios y por ello se estudió de igual manera una colección de cepas de hongos endófitos aislados de la planta *Mentha rotundifolia*. Se trabajó con el hongo *Fusarium* sp. cuyo extracto crudo se analizó para identificar los productos naturales responsables de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos como son *Alternaria alternata*, *Botrytis cinérea* y *Fusarium oxysporum*, que son los principales patógenos responsables de grandes pérdidas en la agricultura e incluso en cultivos postcosecha.

En este trabajo se propuso la extracción de productos naturales a partir de un extracto tanto de la cepa de *B. amyloliquefaciens* como de *Fusarium* sp. y su aislamiento y purificación por técnicas cromatográficas para finalmente con ayuda de técnicas espectroscópicas y espectrométricas elucidar la estructura total. También se realizaron pruebas biológicas de inhibición a bacterias y hongos de los compuestos de interés.

Antecedentes Generales

La exploración de productos naturales a partir de microorganismos es un objetivo que está emergiendo de la unión de la biología y la química. El suelo es uno de los hábitats menos estudiados de la tierra, al que los humanos tratan como algo sucio o contaminado; sin embargo, éste es el hábitat más útil de la tierra, ya que en él se cultivan plantas, se realiza actividad de minería (son ricos en minerales de utilidad), se realiza la construcción de casas, edificios y algo más importante sería su uso para investigar productos químicos medicinales.

Desde que el científico Selman Waksman descubriera la estreptomicina en los actinomicetos, químicos farmacéuticos y microbiólogos han cultivado diferentes microorganismos del suelo y han realizado un escrutinio de los compuestos químicos con actividad de antibiótico que secretan los mismos. [1]

Alexander Fleming descubrió la penicilina en 1928 (Figura 1) y en consecuencia se desencadenó su desarrollo en la industria farmacéutica. Florey y Chain en 1940 desarrollaron el descubrimiento de productos naturales a partir de microorganismos como piedra angular en el descubrimiento de nuevos compuestos en el siglo XX. A finales de este siglo algunos de los productos naturales microbiológicos han mostrado una gran aplicación en el área clínica como: antibacterianos, antifúngicos, antiparasitarios, anticancerígenos y agentes inmunosupresivos.

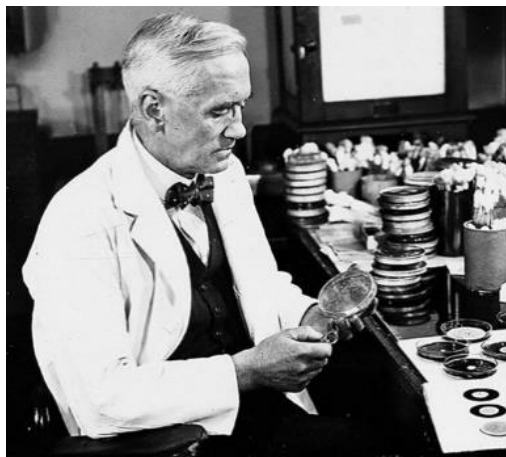


Figura 1. Alexander Fleming descubridor de la penicilina. Tomado de <https://www.biografiasyvidas.com/monografia/fleming/penicilina.htm>

Sin embargo, ahora es la oportunidad de las compañías farmacéuticas de la mano con los investigadores para el descubrimiento de nuevos productos naturales de origen microbiano. Varios factores resultan de este reto científico, incluyendo el redescubrimiento de productos naturales frecuentemente encontrados y los desafíos técnicos asociados con la purificación y la elucidación estructural de los mismos a partir de fermentaciones microbiológicas. [2]

Los productos naturales son moléculas codificadas genéticamente que tienen un impacto profundo en muchas áreas de investigación, incluida la medicina, química orgánica y la biología celular. Numerosos proyectos describen la importancia de compuestos derivados de microorganismos, plantas y animales. Estos compuestos mantienen una fuente importante para el descubrimiento de fármacos y continúa siendo una inspiración para la química sintética por su compleja arquitectura. [3]

Existen varias hipótesis sobre el origen y la función de los productos naturales. La más aceptada considera que estos compuestos son de desecho que bajo una presión de selección natural, se transforman en moléculas mensajeras que deben resistir el tiempo suficiente para desplazarse entre los diversos componentes de la comunidad microbiana; este hecho explicaría la tendencia de algunos productos naturales de pequeño tamaño de tener funciones biológicas variadas. [4]

Los productos naturales han realizado contribuciones importantes a la biología celular, debido a su excelente potencia y especificidad. Además, los compuestos producidos por bacterias continúan siendo una fuente importante para el descubrimiento terapéutico, por lo que encontrar nuevos productos naturales se ha vuelto más difícil y nuevos métodos son necesarios. Métodos basados en la genómica, como la ingeniería genómica y la metagenómica mantienen una gran promesa para el descubrimiento de nuevos productos naturales. Es importante destacar que los productos naturales suelen ser género, especie y hasta cepa dependiente, es decir, aunque se cultiven cepas del mismo género y sean idénticas pueden producir productos naturales diferentes. [5]

El uso más importante de los productos naturales de diferentes fuentes ha sido como fármacos de tipo antiinfeccioso, en el año 2000, estos compuestos comercializaron 55 mil millones de dólares, pero en el año 2007, el mercado de antibióticos fue de 66 mil millones de dólares. [6]

1.1 Antecedentes: Bacteria “*Bacillus amyloliquefaciens*”

El género *Bacillus* consiste en diversas bacterias grampositivas con forma de bastón que son móviles y aeróbicas, además de que son capaces de producir endosporas (lo cual les hace resistir a condiciones ambientales desfavorables). La ventaja de formar esporas es que se pueden aplicar fácilmente en formulaciones y tienen una alta viabilidad en comparación con las células vegetativas y aunado a esto, su ventaja de tener una distribución en el suelo lo que lo hace fácilmente accesible. [7]

Las especies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus pumilus* están estrechamente relacionadas. Hay especies que son conocidas por ser patógenas, las cuales incluyen: *Bacillus anthracis*, patógeno mortal para humanos y animales y *B. cereus*, que causa intoxicación alimentaria. Por otro lado, *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* son patógenos para insectos específicos y estas características especiales los hacen ser buenos candidatos como agentes de control biológico. (Figura 2)

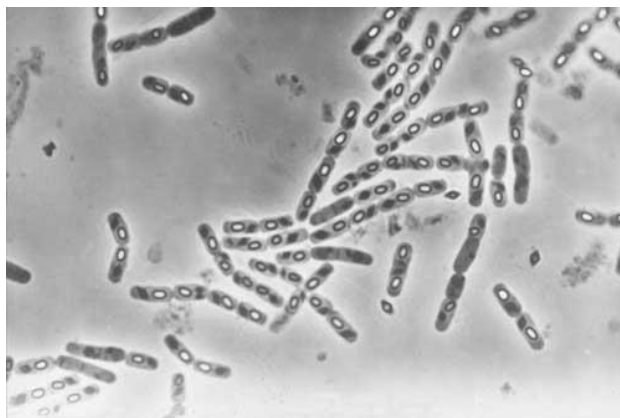


Figura 2. Bacteria *Bacillus* observada a microscopia de inmersión. Tomada de https://www.ecured.cu/Bacillus_thuringiensis

Se puede decir que este tipo de bacterias son muy estudiadas por ser productoras de compuestos con actividad biológica como antifúngicos y antibióticos (actividad antagónica contra hongos y bacterias).

1.1.1 Productos naturales de *Bacillus sp*

Como ya se mencionó la bacteria del género *Bacillus sp.* produce una gran cantidad de compuestos con diferentes estructuras que muestran una amplia diversidad de actividades biológicas. Los productos naturales sirven como armas competitivas usadas contra otras bacterias u hongos e incluso contra insectos, como agentes transportadores de metales o como promotores de crecimiento vegetal. [8, 9]

Estas capacidades metabólicas versátiles hacen de esta bacteria una fábrica química generando diferentes estructuras químicas con alto potencial para su uso industrial. Esta versatilidad de compuestos ha atraído la curiosidad de químicos y la actividad biológica de dichos compuestos ha inspirado a la industria farmacéutica para la búsqueda de nuevas estructuras en los extractos microbianos. [8, 9]

Esta búsqueda de nuevas estructuras ha sido incluso impulsada por otro factor importante y determinante en los últimos años que es la resistencia de los microorganismos patógenos y causantes de enfermedades a los fármacos que ya están en uso clínico. Esta resistencia ha traído cepas multirresistentes con gran capacidad de atacar al ser humano y causar enfermedad por lo que la búsqueda de estructuras con actividad antibacteriana o antibiótica se ha abierto paso en la química multidisciplinaria.

Pero no sólo la salud humana es de gran importancia en la búsqueda de nuevos compuestos también el enfoque agrícola. La población mundial ha venido creciendo año con año y ello ha provocado un aumento en la demanda de alimentos. Sin embargo, el uso continuo del suelo y grandes cultivos han traído también plagas, que atacan a los cultivos extensos provocando millones de pérdidas económicas. La mayor parte de las plagas además de insectos, se deben a los llamados hongos fitopatógenos que causan diversas enfermedades en

diferentes cultivos. El uso indiscriminado de pesticidas químicos ha provocado daños al medioambiente y la salud humana por lo que son deseables otros métodos más sostenibles y sustentables como es el control biológico. La búsqueda de productos naturales con efectos nocivos a estos hongos fitopatógenos es un terreno fértil de investigación en los últimos años.

1.1.2 Bacteriocinas

Entre los compuestos más estudiados con actividad antibacteriana y que no pueden pasar desapercibidos se encuentran las bacteriocinas. Las bacteriocinas son péptidos bacterianos de bajo peso molecular que inhiben o eliminan a microorganismos que generalmente están estrechamente relacionados; aunque no siempre, con la cepa productora. Este tipo de compuestos tiene características variables como: su peso molecular, espectros inhibitorios y mecanismo de acción. Muchas bacteriocinas tienen una alta actividad específica contra bacterias de importancia clínica que incluyen cepas multirresistentes, tienen mecanismos de acción diferentes a los productos quimioterapéuticos actuales y además por su naturaleza peptídica pueden ser manipulados por ingeniería genética. Aunque se prefieren bacteriocinas de amplio espectro, también se han encontrado algunas de espectro estrecho que controlan a patógenos concretos sin afectar negativamente a la población o al individuo. [10]

Las bacteriocinas tienen muchas propiedades que las hacen alternativas viables a los antibióticos. Estas propiedades incluyen su potencia, baja toxicidad, la disponibilidad de bacteriocinas tanto de amplio espectro como de espectro estrecho, la posibilidad de producirlos en gran escala y además como ya se comentó la posibilidad de su manipulación mediante la bioingeniería genética. [10]

Las bacteriocinas se clasifican en diferentes grupos [11]:

- Clase I: lantibióticos que son pequeños péptidos que se someten a una extensa modificación postraducciona para producir el péptido activo.
- Clase II: Son péptidos termoestables, de bajo peso molecular, activos con la membrana de los microorganismos.
- Clase III: Son proteínas grandes, inestables al calor.

A lo largo de los años se han aislado varias bacteriocinas de diferentes especies de *Bacillus* [12] tal y como se muestra en la Tabla 1:

Tabla 1: Bacteriocinas encontradas en diferentes especies de *Bacillus*.

Bacteriocina	Cepa de <i>Bacillus</i>
Kurstakina	<i>B. thuringiensis</i>
Thuricina	<i>B. thuringiensis</i>
Entomocina	<i>B. thuringiensis</i>
Lichenina	<i>B. licheniformis</i>
Megacina	<i>B. megaterium</i>
Bacturicina	<i>B. thuringiensis</i>
Tochicina	<i>B. thuringiensis</i>
Coagulina	<i>B. coagulans</i>
Cereina	<i>B. cereus</i>
Polifermenticina	<i>B. polyfermenticus</i>
Subtilosina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Amilolisina	<i>B. amyloliquefaciens</i>

En la siguiente figura 3 se observan las estructuras tan complejas de dos bacteriocinas aisladas y caracterizadas de *B. thuringiensis* como son la kurstakina [13] y la thuricina CD [14].

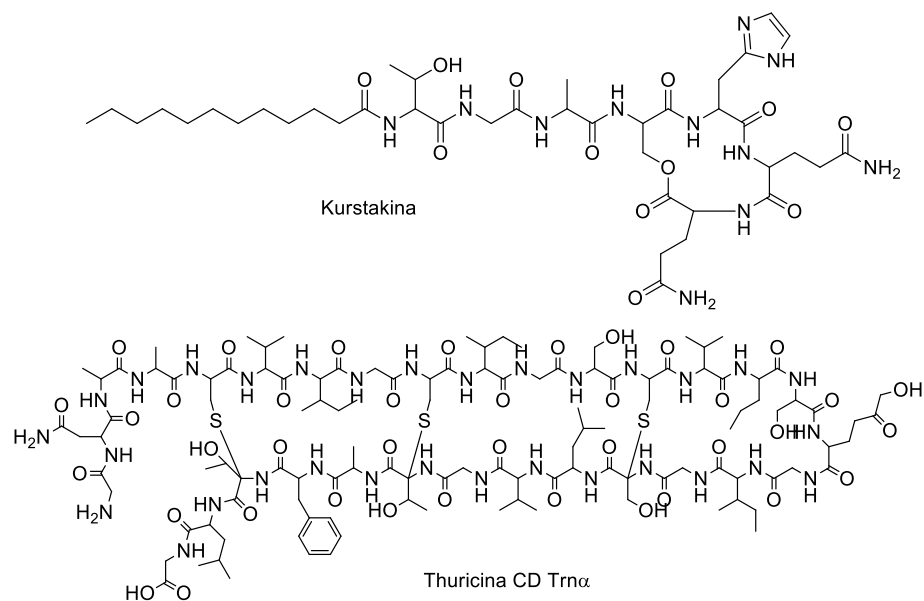


Figura 3. Estructuras de la kurstakina y la thuricina CD.

B. amyloliquefaciens también ha sido reportada como una especie productora de bacteriocinas. Por ejemplo, la subtilosina A y B fueron aisladas de *B. amyloliquefaciens* con pesos moleculares de 3400 Da. [15] El antibiótico amylolisina de 3300 Da demostró ser activo contra *L. monocytogenes*. [16] Un compuesto de tipo bacteriocina de peso molecular de 11 KDa fue identificado también de la misma especie y demostró tener actividad contra muchas bacterias. [17]

El hecho de que los productos naturales difieren entre las diferentes cepas de la misma especie hace pensar que la cepa *B. amyloliquefaciens* ELI149 con la que se ha trabajado en el laboratorio pudiera tener diferentes bacteriocinas.

1.1.3 Lipopéptidos

Otros compuestos importantes producidos por varias especies de *Bacillus* sp. son los lipopéptidos. Los lipopéptidos de *Bacillus* son pequeños compuestos que contienen estructuras cíclicas de siete o diez aminoácidos y una cadena de ácidos grasos de nueve o trece carbonos. Tienen una amplia variedad de actividades biológicas como son antifúngicos, antiinflamatorios, antitumorales y antivirales, entre otras; aunque entre todas ellas la que más destaca es su fuerte actividad

antifúngica. [18] Esta variedad de actividades ocasiona que estas estructuras sean de alto interés para la industria química, farmacéutica, alimenticia y la agricultura.

Los lipopéptidos cíclicos, los cuales se muestran en la Tabla 2 y figura 4, se han dividido en tres grupos:

- Grupo Iturina (iturinas, micosubtilinas y bacilomicinas)
- Grupo Surfactina
- Grupo Fengicina

Como se muestra en la Figura 4 las estructuras de estos compuestos son complejas. Las surfactinas e iturinas son heptadepsipéptidos cíclicos mientras que las fengicinas son decadepsipéptidos cíclicos. La mayoría de estos compuestos tienen poderosa actividad surfactante y exhiben una acción de tipo detergente en las membranas biológicas.

Tabla 2: Lipopéptidos aislados de diferentes cepas de *Bacillus* sp.

Lipopéptidos	Cepa de <i>Bacillus</i>
Surfactina A-D	<i>B. subtilis</i>
Bacircina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Halobacillina	<i>B. licheniformis</i>
Isohalobacillina	<i>B. licheniformis</i>
Lichenisina	<i>B. licheniformis</i>
Daitocidina	<i>B. pumilus</i>
Pumilacidina	<i>B. pumilus</i>
Bacillomycina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Iturina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Fengicina	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Micosubtilina	<i>B. subtilis</i>

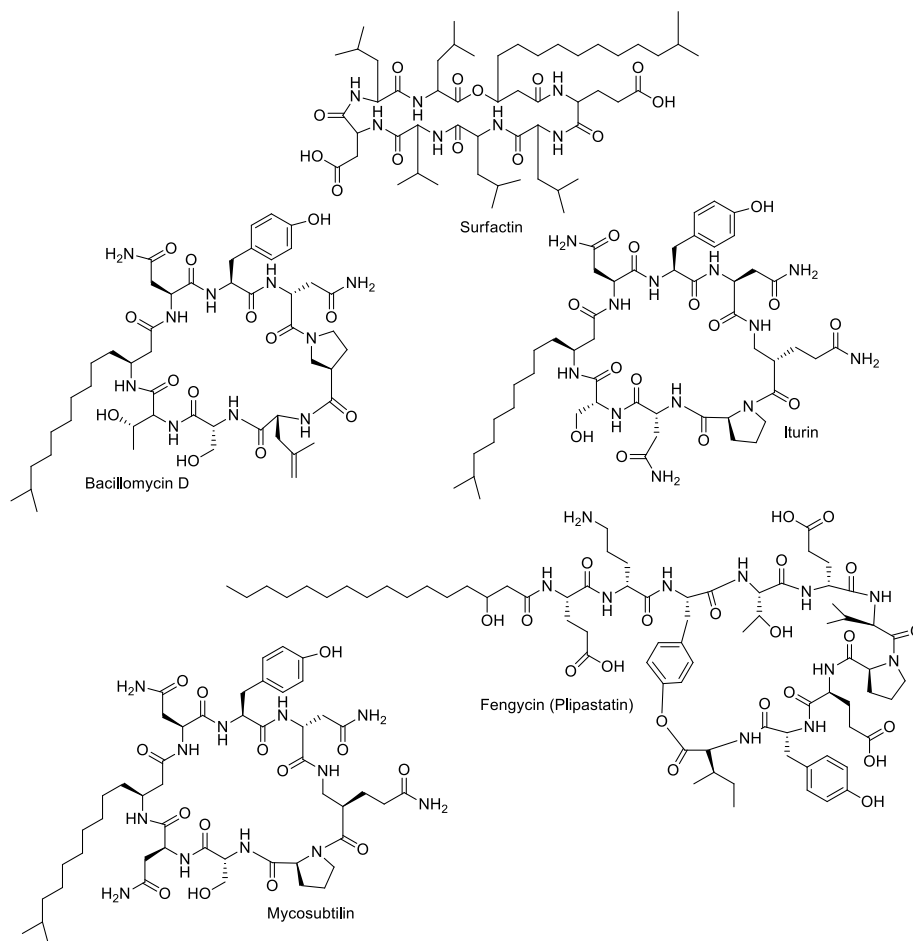


Figura 4. Estructuras de algunos lipopéptidos

La **surfactina** es un poderoso surfactante con una cadena de siete aminoácidos de secuencia (L)-Glu-(L)-Leu-(D)-Leu-(L)-Val-(L)-Asp-(D)-Leu-(L)-Leu. El péptido está unido a una cadena de β -ácidos grasos mediante un enlace de lactona. Los diferentes homólogos de surfactina varían en la identidad de los aminoácidos que se encuentran en la segunda, cuarta y séptima posición, puede ser que cambien incluso el número de átomos de la cadena de ácidos grasos o incluso la conformación estructural. Al ser biosurfactante se inserta entre las capas lipídicas, solubiliza los fosfolípidos, quelata los cationes y modifica la permeabilidad de la membrana por formación de canales causando disrupción de la membrana y solubilización de la membrana por un mecanismo similar a los detergentes. [18]

La **iturina** también tiene una cadena de siete aminoácidos con la secuencia de (L)-Asn-(D)-Tyr-(D)-Asn-(L)-Gln-(L)-Pro-(D)-Asn-(L)-Ser. Sus compuestos homólogos micosubtilina, bacillomicina y bacillopeptina tienen cambios en diferentes aminoácidos. Los compuestos de esta familia exhiben fuertes actividades antifúngicas y hemolíticas, pero limitada actividad antibacterial. Su actividad biológica se debe a su capacidad de formar poros conductores de iones, provocando lisis osmótica (ruptura de la célula por un desequilibrio iónico). [18]

En el caso de la **fengicina** es una cadena de diez aminoácidos con la secuencia (L)-Glu-(D)-Orn-(L)-Tyr-(D)-Thr-(L)-Glu-(D)-Ala-(Val)-(L)-Pro-(L)-Gln-(D)-Tyr-(L)-Ile y son producidas por varias especies de *Bacillus sp*, como *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, and *B. globigii*. Muestran fuertes actividades antifúngicas porque inducen cambios morfológicos en los hongos como son vaciamiento y enrizamiento de las hifas (estructuras largas clásicas de los hongos). [9, 18]

1.1.4 Policétidos

Además de los compuestos ya mencionados hay otra familia importante de metabolitos de interés que son los policétidos los cuales tienen una actividad relevante y se sintetizan de manera semejante a la ruta biosintética de los ácidos grasos. Por ejemplo: la difficidina que tiene una actividad antibacteriana de amplio espectro. Por otro lado, la macrolactina A es un compuesto con capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias estrechamente relacionadas. [9] (Figura 5)

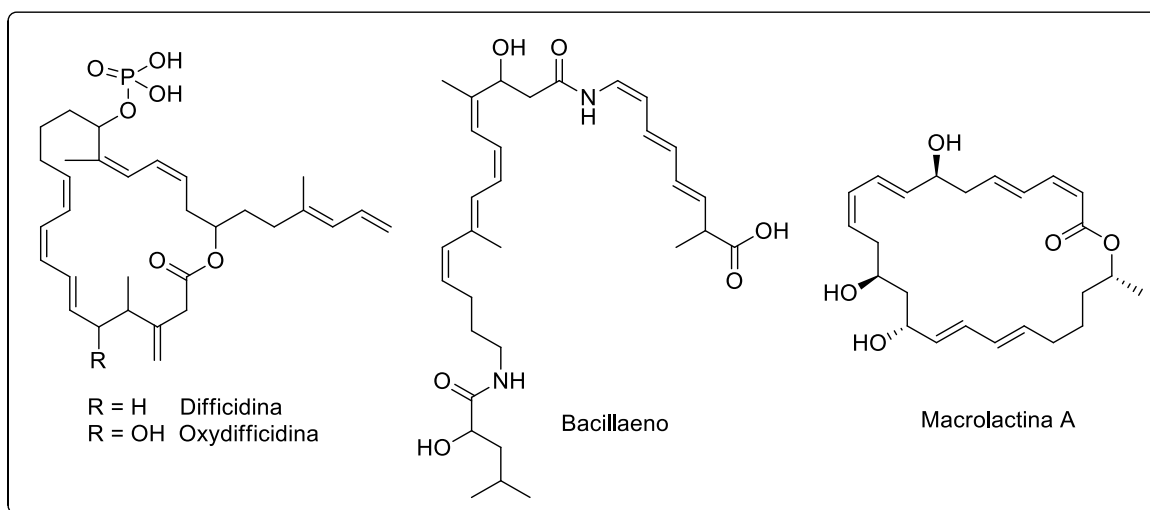


Figura 5. Metabolitos tipo policétidos

La biosíntesis de los policétidos se lleva a cabo por la polimerización de subunidades acetilo y propionilo obtenidas por la descarboxilación de malonil coenzima A o metilmalonil coenzima A, en un proceso similar a la biosíntesis de ácidos grasos (Condensación de Claisen). Las enzimas involucradas en este proceso son consideradas como una variante de las de ácidos grasos llamadas policétido sintasas. Por lo que dependiendo del tipo podrían dar como resultado tres tipos de compuestos: ácidos grasos, compuestos aromáticos y macrólidos. [19] (Figura 6)

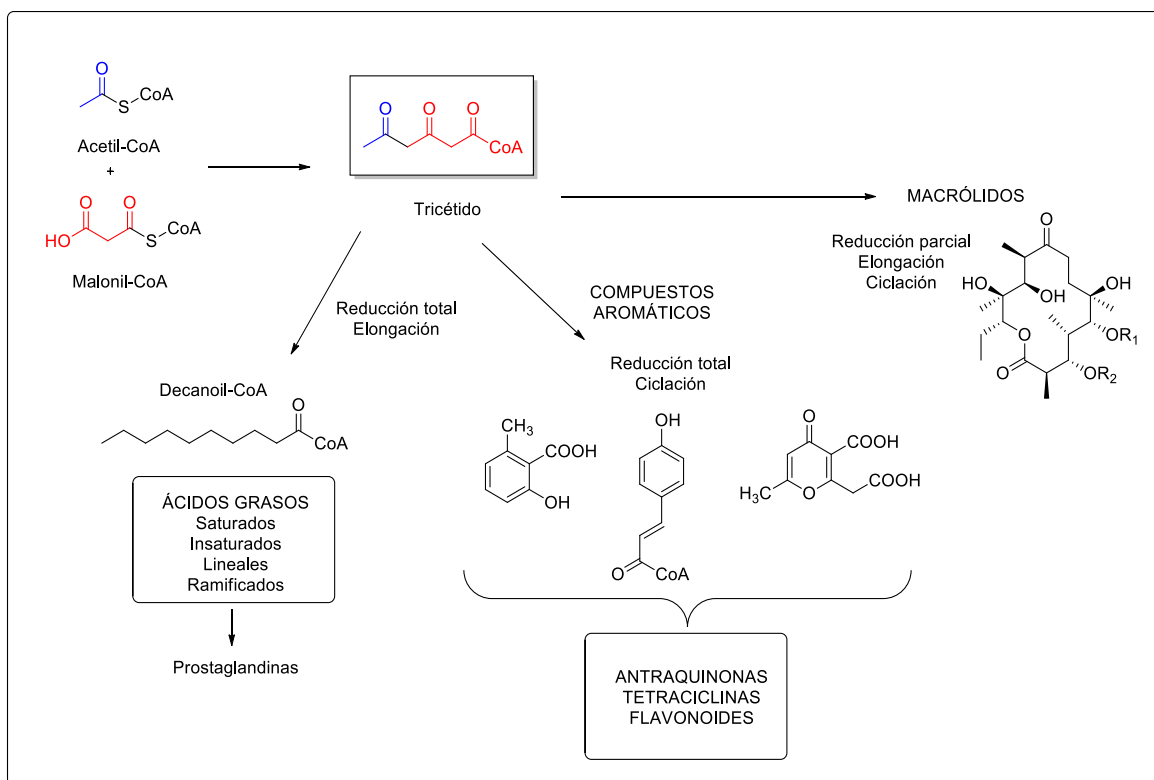


Figura 6. Ruta biosintética de los policétidos

1.1.4.1 Policétidos tipo macrólidos; Macrolactinas

Las macrolactinas son macrólidos que en su estructura química contienen tres unidades de tipo dieno separados en un anillo de lactona de 24 miembros, con potentes actividades antibacterianas u otras. La mayoría de estas macrolactinas se derivan del metabolismo secundario de los microorganismos marinos, mientras que algunas de ellas también fueron producidas por algunos microorganismos del suelo. [20] Las macrolactinas fueron descritas por primera vez por Gustafson en 1989, quien informó que estos compuestos tenían propiedades antivirales. Desde entonces, se han aislado más de veinte derivados. [21]

Originalmente la familia de macrolactinas clasificadas de la "A" a la "F" (Figura 7) fueron aisladas de una bacteria marina que no había sido clasificada. La macrolactina A era de particular interés, debido a que demostró propiedades médicas muy interesantes ya que posee una actividad antibacteriana selectiva. A su vez tenía la capacidad de inhibir células cancerosas de melanoma en ensayos

in vitro, así como a los virus del herpes simple en mamíferos. Además, protege a las células de linfoblastos contra el VIH, al inhibir la replicación del virus.[21]

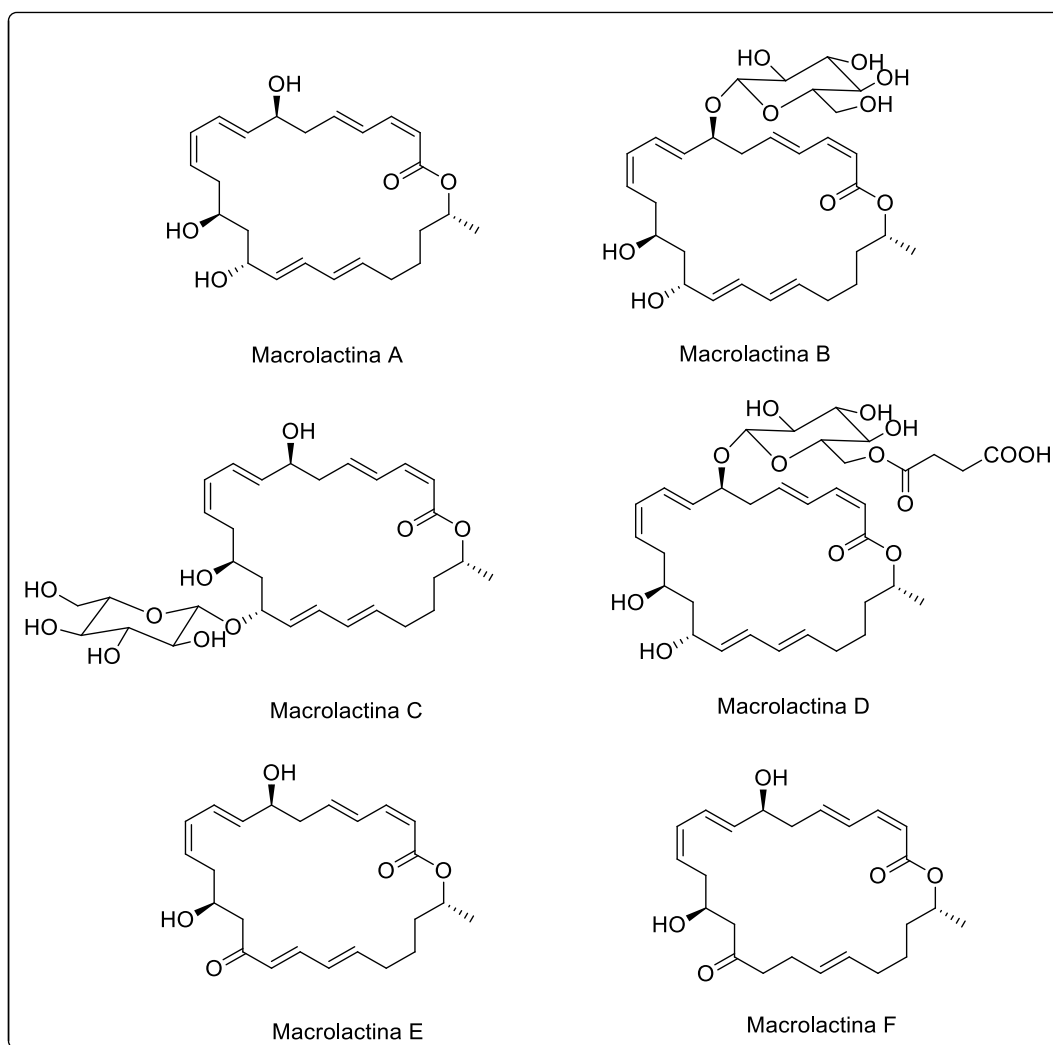


Figura 7. Estructuras químicas de macrolactinas A – F.

Con los años la familia de las macrolactinas ha ido creciendo con el descubrimiento de las macrolactinas de la "G" a la "M", así como también la 7-O-malonil macrolactina A, 7-O-succinil macrolactina A y macrolactina N (Figura 8). [20] Un descubrimiento interesante fue la actividad antibacteriana de 7-O-malonil macrolactina A contra bacterias patógenas de tipo gran-positivas, en particular su acción contra *Staphylococcus aureus* resistente a metilciclina y enterococos resistentes a vancomicina. [22]

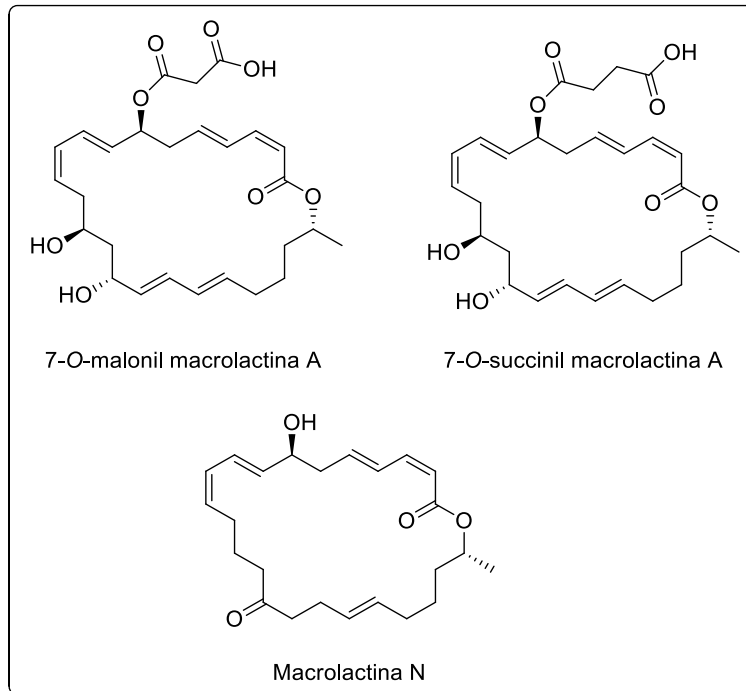


Figura 8. Estructuras químicas de 7-O-malonil, 7-O-succinil macrolactina A y de la macrolactina N

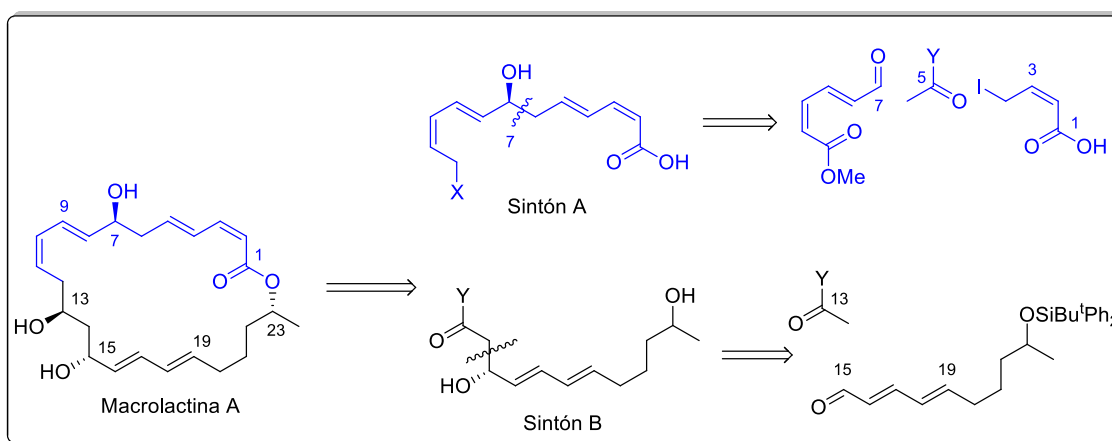
Un estudio en 2007 logró la determinación de macrolactinas como productos naturales en la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 ya que identificaron en su genoma tres operones (grupos de genes completos que operan para una determinada función) pks1, pks2 y pks3 que codifican para la biosíntesis de policétidos. Los operones pks1 y pks3 se le atribuyen a la producción de bacillaeno y difidina/oxidifidina, respectivamente, mientras que el operón pks2 reveló que produce cuatro miembros de la familia de macrolactinas, macrolactina A y D, así como 7-O-malonil macrolactina A y 7-O-succinil macrolactina A. [23]

La biosíntesis de la macrolactina A se investigó utilizando experimentos de adición con ^{13}C -acetato, estos experimentos implican que el acetato/malonato son los únicos bloques de construcción utilizados para este esqueleto policétido. La ruta biosintética comienza a partir del acetato y se logra mediante once condensaciones de Claisen sucesivas que involucran once unidades de malonato. Es muy probable que el acetato no se use directamente como iniciador porque no se ha detectado una acil transferasa específica de acetato en el operón, así que es bastante probable que la ruta biosintética se inicie mediante la carga de un

residuo de malonil catalizado por la enzima MlnA-acil transferasa, seguido de la descarboxilación del malonato que proporciona la molécula iniciadora de acetato en primera instancia. Posteriormente se realiza la elongación hasta llegar a las unidades correspondientes. [23]

1.1.4.2 Síntesis orgánica de Macrolactina A

Debido a las interesantes actividades de la macrolactina A, desde hace años se estudió su síntesis orgánica en el laboratorio. Por lo que, en el año de 1996 un grupo de la Universidad de Barcelona planteó una estrategia en la cual los dobles enlaces conjugados presentes en el esqueleto de la molécula *Z, E* se construyen mediante acoplamientos de átomos de carbono con hibridación sp^2 y el sistema conjugado *E, E* a través de una reacción de Horner-Wadsworth-Emmons (desconexión C18-C9); los centros asimétricos en los C7 y C15 se formarán mediante reacciones aldólicas (Esquema 1). [24]



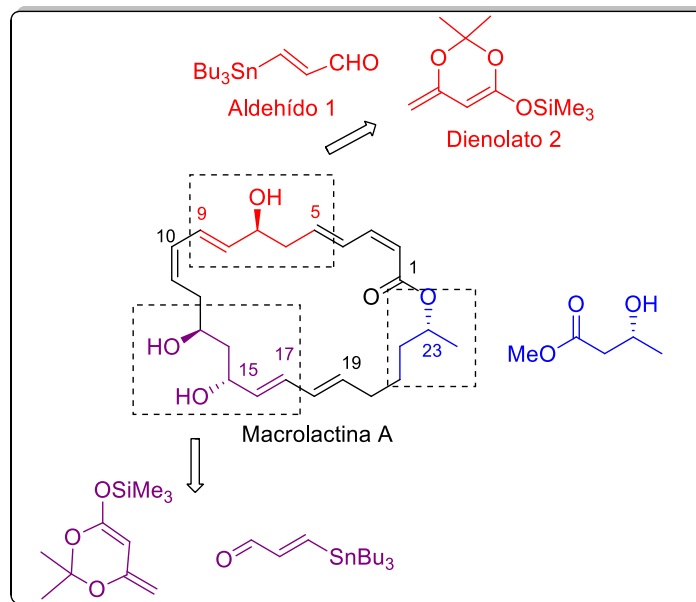
Esquema 1. Esquema retrosintético de la macrolactina A

Se plantea la desconexión de la macrolactina A en dos sintones: A y B, vía la escisión en los enlaces de los carbonos C12-C13 y C23-OC1, respectivamente. Así mismo en el sintón A se propone nuevamente una desconexión en los carbonos C7-C6, C6-C5. Por otro lado, el sintón B se desconecta solo en el C15-C14. Se sabe que el resultado estereoquímico de la reacción de aldehídos con enolatos quirales derivados de etilcetonas, de propionatos, etc. (es decir, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COY}$) [24a] puede

controlarse con gran eficacia. Por el contrario, la estereoselectividad de reacciones análogas con metil cetonas derivados de acetato, (es decir, CH_3COY) es generalmente mucho menos satisfactoria. Por lo que esta macrolactina A es un desafío, ya que los aductos correspondientes pueden ser más propensos a la deshidratación que las simples β -hidroxicetonas o ésteres. [24b]

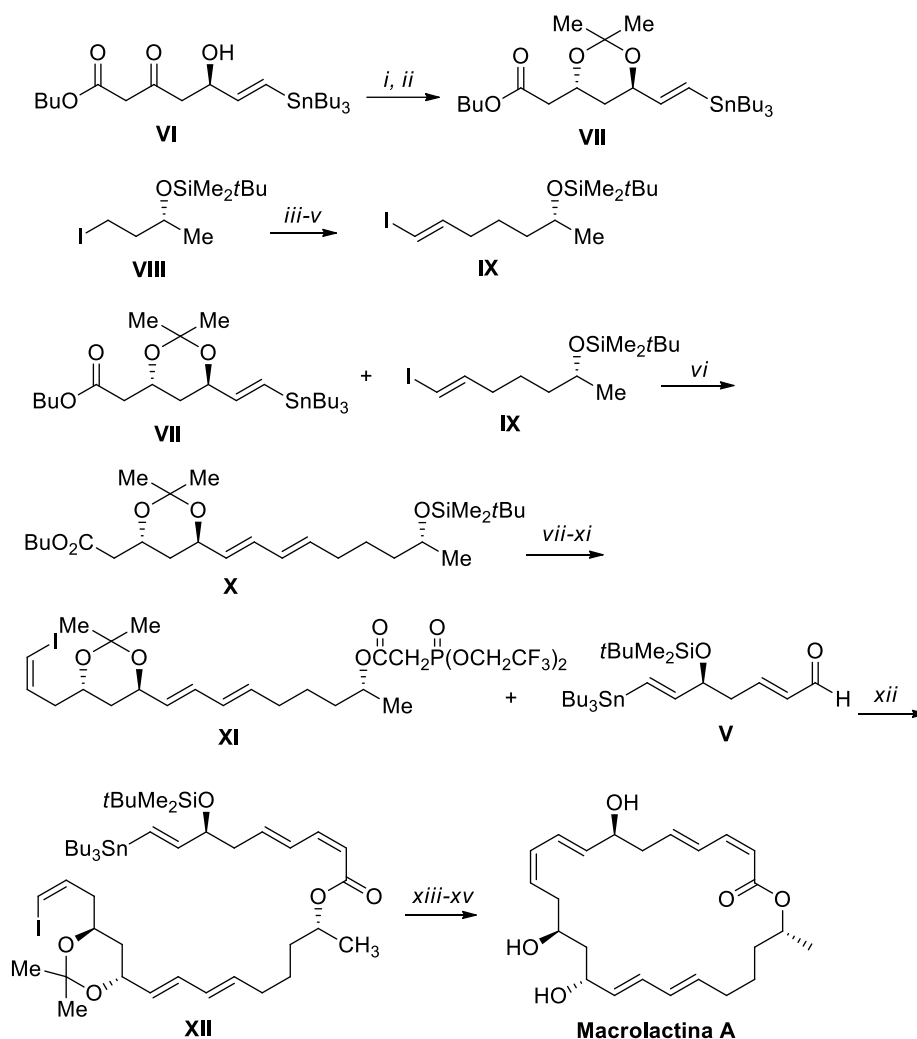
Carreira y colaboradores proponen una síntesis total de la macrolactina A, utilizando métodos de acoplamiento asimétrico catalítico C-C. Para ello emplean reacciones de adición de dienolato catalítico enantioselectivo para sintetizar los dos fragmentos clave que contienen la mayor parte de la complejidad estereoquímica de la molécula. Además, también emplearon el acoplamiento Stille con Pd^0 para ensamblar los fragmentos principales. [25]

Su retrosíntesis se basa en reconocer las tres regiones diferentes que contienen los centros estereogénicos de la macrolactina A (Esquema 2). Analizando su estructura, se encuentra un patrón latente de oxigenación 1,3 del macrociclo acetogénico y esto guía a la desconexión en tres subunidades clave de igual complejidad: los fragmentos C(2)-C(9), C(11)-C(17) y C(18)-C(24). Proponen que los dos primeros sintones de éstos podrían construirse con sus estereocentros hidroxisustituídos mediante una reacción de adición de aldol acetoacetato. Por lo que cada subunidad podría unirse entonces por pares mediante reacciones de acoplamiento sp^2 - sp^2 catalizadas por Pd^0 . [25]



Esquema 2. Análisis retrosintético de la macrolactina A

La síntesis comienza con el aldehído **I** que se hizo reaccionar con una cantidad catalítica de **II** para dar el aducto aldólico acetoacetato protegido **III** el cual fue sometido a una corta secuencia de reacciones para obtener **IV**. Una reducción de **IV** al alcohol primario y la oxidación de Swern generó el aldehído **V**, como se muestra en el esquema 3. [25]



Esquema 4: *i*) $\text{Me}_4\text{NBH}(\text{OAc})_3$, MeCN , $-10\text{ }^\circ\text{C}$, 87%; *ii*) $\text{Me}_2\text{C}(\text{OMe})_2$, PPTS, $23\text{ }^\circ\text{C}$, 89%; *iii*) $\text{MeC}(\text{H})\text{NNMe}_2$, LDA, THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 75%; *iv*) O_3 , CH_2Cl_2 , $-78\text{ }^\circ\text{C}$; *v*) CH_3I , CrCl_2 , THF, 68%; *vi*) $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, CdCl_2 , $i\text{Pr}_2\text{NEt}$, 69%; *vii*) DIBAL, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, THF, 80%; *viii*) Oxidación Swern; *ix*) Ph_3P , CH_2I_2 , KHMDS, THF, $-78\text{ }^\circ\text{C}$, 78%; *x*) HF-py, THF, $23\text{ }^\circ\text{C}$, 80%; *xi*) $(\text{CF}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{POCH}_2\text{COCl}$, DMAP, CH_2Cl_2 , 90%; *xii*) **V**, KHMDS, 18-C-6, THF, 60%; *xiii*) $[\text{Pd}_2(\text{dba})_3]$, N-Me-pirrolidona, 58%; *xiv*) HF-py, THF, $23\text{ }^\circ\text{C}$; *xv*) Dowex-H, $23\text{ }^\circ\text{C}$, MeOH, 60%.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Buscar y caracterizar productos naturales de origen microbiano producidos por la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* ELI-149

1.2.2 Objetivos Particulares

- ⇒ Obtener un extracto metanólico con ayuda de la resina adsorbente Amberlita® XAD-16.
- ⇒ Fraccionar el extracto crudo de la bacteria seleccionada mediante técnica de cromatografía en columna de gel de sílice.
- ⇒ Seleccionar de una manera biodirigida las fracciones para la búsqueda de los compuestos responsables de la actividad biológica contra bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.
- ⇒ Aislar y purificar los compuestos; elucidar estructuralmente mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

1.3 Discusión de Resultados

Para realizar la búsqueda de metabolitos secundarios se seleccionó una cepa identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* ELI-149. En trabajos previos de laboratorio se había observado que esta cepa tiene una alta capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas y hongos de interés agrícola. [26]

Para el crecimiento de esta cepa, primeramente, se inoculó en un medio líquido TSB, incubando por 7 días a 29 °C con agitación constante a 175 rpm y adicionando 0.5 g/100 mL de Amberlita® XAD-16, con el fin de que la bacteria tenga el tiempo suficiente para crecer y enseguida producir los compuestos de interés. Ya con el tiempo adecuado y con los compuestos adsorbidos en la superficie de la resina se procede a decantar el medio cultivo dejando solamente ésta, la cual se trata con lavados de metanol (20 mL) para desorber los compuestos de su superficie (3 veces). Luego se procedió a filtrar con ayuda de membranas de 25 µm para evitar el paso de células vegetativas y esporas. El líquido obtenido se dejó secar hasta obtener un sólido marrón con un rendimiento de 800 mg/L de cultivo.

1.3.1 Fraccionamiento del extracto y selección biodirigida de compuestos antibacterianos

Se propone un primer protocolo para el fraccionamiento, el cual se realizó mediante una cromatografía en columna de gel de sílice, utilizando eluyentes con un gradiente de polaridad. Después de varias pruebas con diferentes disolventes, se encontró el sistema adecuado para obtener una buena separación, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Primer protocolo de eluyentes utilizados para el fraccionamiento del extracto

<i>Sistema</i>	<i>Proporción*</i>
Hexano	100%
Hexano:AcOEt	10%
Hexano:AcOEt	25%
Hexano:AcOEt	50%
AcOEt	100%
AcOEt: MeOH	2%
DCM:MeOH	5%
DCM:MeOH	10%
DCM:MeOH	20%
DCM:MeOH	50%
DCM:MeOH	80%
MeOH	100%

*La proporción es en porcentaje de acuerdo al disolvente de mayor polaridad.

Cada fracción obtenida de la columna se evaporó y se monitoreó por cromatografía en capa fina. Se obtuvieron nueve fracciones y cada fracción fue testada en prueba de antibiograma contra cada bacteria patógena. En la figura 9 y tabla 4 se muestran las pruebas contra bacterias Gram-positivas, resaltando en círculos amarillos el halo de inhibición que produce los compuestos testados.

Tabla 4. Bioensayos de inhibición de crecimiento de bacterias Gram-positivas de interés médico

Fracción	<i>St. aureus</i>	<i>St saprophyticus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>M. luteus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>S. agalactiae</i>
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	7	-
3	-	-	-	-	-	9
4	-	-	-	-	-	9
5	-	-	-	-	-	9
6	-	-	-	-	10	12
7	-	-	-	-	-	12
8	18	9	10	10	-	17
9	-	-	-	-	-	9
Control Positivo	19	17	20	11	10	45

Las medidas aquí presentadas son en milímetros (mm), control positivo: vancomicina

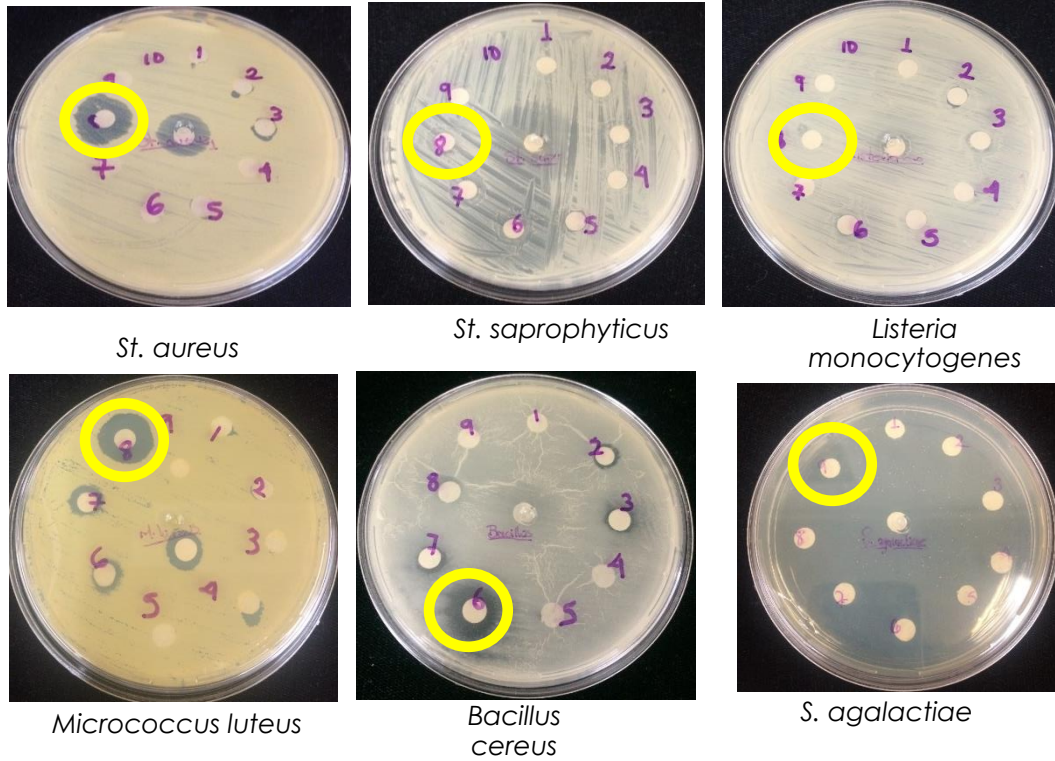


Figura 9. Bioensayos de las fracciones frente a bacterias gram-positivas.

Del mismo modo se realizó el enfrentamiento de las fracciones contra bacterias Gram-negativas obteniendo la tabla 5 y figura 10, de igual manera se

resaltan en círculos amarillos el halo de inhibición que presentan los compuestos testados.

Tabla 5. Bioensayos de inhibición de crecimiento de bacterias de interés médico Gram-negativas

Fracción	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Serratia</i>
1	-	-	8	-	-	-	-	-
2	-	-	9	-	-	-	-	-
3	-	-	10	-	-	-	-	9
4	-	-	10	-	-	-	-	9
5	-	-	9	-	-	-	-	9
6	-	-	8	-	-	-	-	12
7	-	-	8	-	-	-	-	12
8	12	9	13	9	-	10	10	17
9	-	-	-	-	-	-	-	9
Control Positivo	12	10	13	10	-	11	10	45

Las medidas aquí presentadas son en milímetros (mm), control positivo: ampicilina

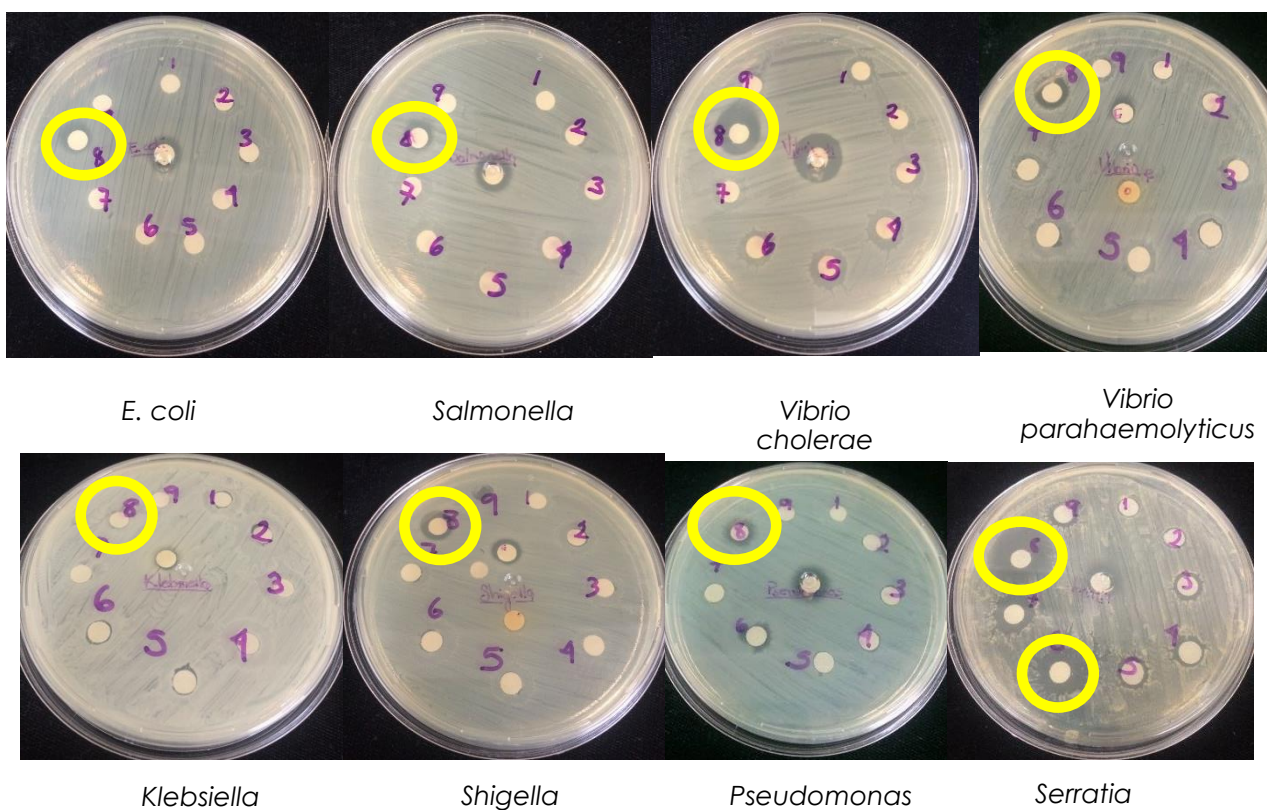


Figura 10. Bioensayos de las fracciones frente a bacterias Gram-negativas.

Analizando las tablas 4 y 5 se observa que la mayor actividad inhibitoria recae en la fracción 8 (figuras 9 y 10 encerrados con un círculo amarillo el halo de inhibición), además de que la cantidad era suficiente para poder analizar sin ningún problema. Por lo cual se decidió estudiar esta fracción.

Debido a que este tipo de compuestos son solubles en agua se procedió a realizar un estudio de RMN ¹H en D₂O. El espectro no reveló ninguna señal interesante. Se utilizaron diferentes disolventes deuterados sin tener éxito. Cuando se utilizó MeOD se observó un sólido precipitado el cual se separó por medio de decantación, obteniendo dos fracciones una sólida y otra líquida en metanol. Ninguna de las fracciones se pudo observar en RMN. Al tener dos fracciones 8A y 8B (sólido y líquido) se volvió a realizar bioensayos contra dos bacterias (Gram-positiva y Gram-negativa) para observar si ambas fracciones tenían actividad biológica diferenciada. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6 y Figura 11.

Tabla 6. Pruebas de inhibición a bacterias seleccionadas frente F8A y F8B.

Sensidisco	<i>Listeria monocytogenes</i> bacteria grampositiva	<i>Vibrio cholerae</i> bacteria gramnegativa
E = Extracto crudo	15	11
II = Fracción 8	19	10
III = F8 A (sólido)	12	-
IV = F8 B (líquido)	10	10

Las medidas aquí presentadas son en milímetros (mm)



Figura 11. Antibiograma con las fracciones F8A y F8B con bacterias

Como se observa en la Tabla 6, la fracción 8 completa prácticamente retiene la actividad bacteriana de todo el extracto crudo. Cuando se observa la actividad de las fracciones 8A y 8B por separado, se observa que la fracción 8A sólo es activa contra la bacteria Gram-positiva (*L. monocytogenes*) mientras que para la bacteria Gram-negativa (*V. cholerae*) es resistente, por el contrario, la fracción 8B es activa para ambos tipos de bacterias. Esto hace pensar que ambas fracciones contienen compuestos diferentes y al realizar una cromatografía en capa fina se observan dos bandas, mostrando lo diferentes que son los compuestos. El hecho de no poder observar las señales bien definidas de los compuestos por RMN nos hace pensar que pueden ser de origen proteico ya que las señales observadas son anchas, poco resueltas; más parecido a curvas y con poca solubilidad debido a las características propias de los péptidos, aunado al alto poder antibacterial que poseen, por lo que se considera que ambas fracciones podrían corresponder a compuestos de origen peptídico de alto peso molecular, estructura compleja y que no se pueden visualizar adecuadamente en RMN, por el tipo de señales poco resueltas ya que este tipo de compuestos al ser unidades repetitivas de aminoácidos se traslapan unas con otras. Es por esta razón que se realiza un estudio de purificación de péptidos por medio de SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio) usando el equipo Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (Bio-Rad Laboratories USA) con una concentración de poliacrilamida al 12% usando como tampón de corrida el Tris-glicina y utilizando un voltaje constante a 90 Voltios. Al preparar este gel siguiendo los protocolos estandarizados y calculando la curva de calibración, con la ayuda de un estándar dentro del gel, se puede obtener la masa molecular de las fracciones: 2.6 KDa para F8A y 4.1 KDa F8B.

Este gel se preparó por duplicado para que una parte se pudiera teñir para revelarlo y otra parte pudiera ser enfrentado a la bacteria *Vibrio cholerae* y que se pudiera observar su actividad bactericida. (Figura 12)

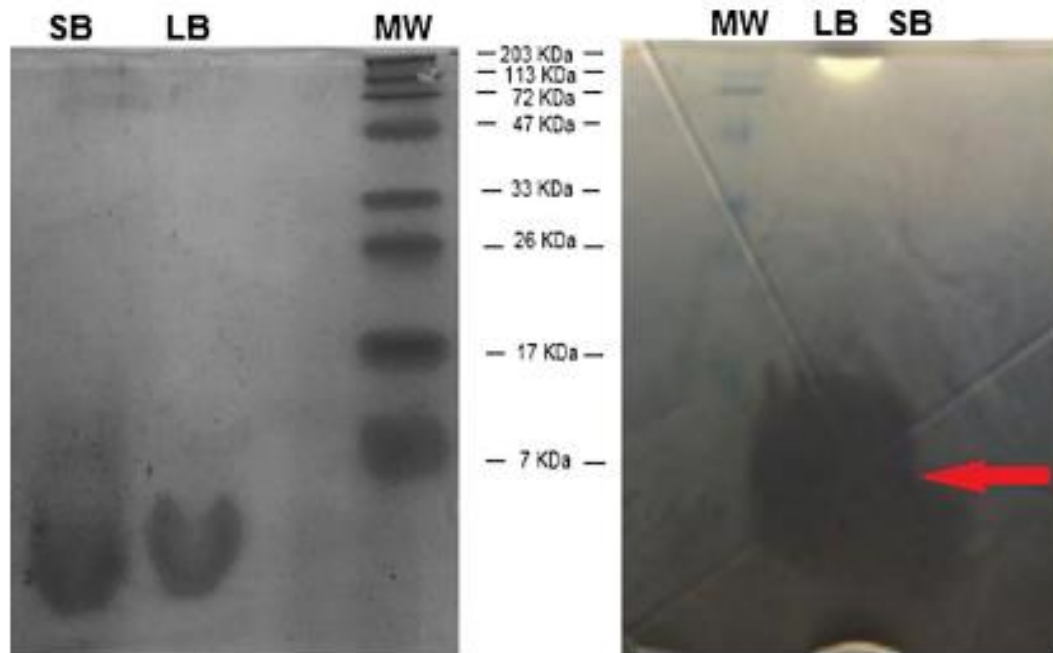


Figura 12. Gel de electroforesis (izquierdo) teñido con azul de coomassie y derecho gel de electroforesis sumergido en placa Petri con la bacteria indicadora *Vibrio cholerae*, se observa un halo claro de inhibición.

La segunda parte del gel reveló que, a pesar de haber tratado a las fracciones líquida y sólida a condiciones de desnaturalización de proteínas para preparar el gel de electroforesis, éstas seguían manteniendo su actividad antibacteriana. Esto demuestra que este tipo de compuestos corresponden a bacteriocinas (antibióticos peptídicos mencionados en los antecedentes) que son extremadamente resistentes a fuertes condiciones. Por ello se trató a estas fracciones a condiciones de diferentes valores de pH y de temperatura para posteriormente probar la efectividad de su actividad antibacteriana.

1.3.1.1 Evaluación de la estabilidad de las bacteriocinas bajo diferentes pH y temperaturas

Se analizó la estabilidad de las bacteriocinas exponiéndolas en un rango de temperatura desde 60, 70, 80, 90, 100 y 121 °C por 15 minutos y de igual manera se sometieron a diferentes valores de pH que fueron: 2, 6, 8 y 10 con HCl 4M y NaOH 4M siguiendo los procedimientos de Bizani y Brandelli [12], posteriormente al tratar a estos compuestos en estas condiciones se volvían a probar con la cepa indicadora *Vibrio cholerae*. El resultado obtenido fue que en un rango de temperatura de 60 – 90 °C la actividad no se modificó; sin embargo, para 100 °C se reduce únicamente un 10% y en 121 °C se ve afectada completamente la actividad, por otro lado con los diferentes valores de pH no se altera la actividad antimicrobiana.

1.3.1.2 Selección biodirigida de metabolitos con actividad antifúngica

Las mismas fracciones obtenidas del fraccionamiento general se enfrentan a hongos fitopatógenos de interés agrícola: *Fusarium oxysporum*, *Paecilomyces sp* y *Mucor sp*. De entre todas las fracciones, la fracción 7 fue la que tuvo una notoria actividad inhibiendo el crecimiento de estos hongos como se muestra en la siguiente tabla 7 y figura 13.

Tabla 7. Bioensayos de las fracciones frente a hongos fitopatógenos

Fracción	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Paecilomyces sp</i>	<i>Mucor sp</i>
1	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	-	-
7	10	15	9
8	-	-	-
Control positivo	12	16	10.5

Las medidas aquí presentadas son en milímetros (mm), control positivo: miconazol

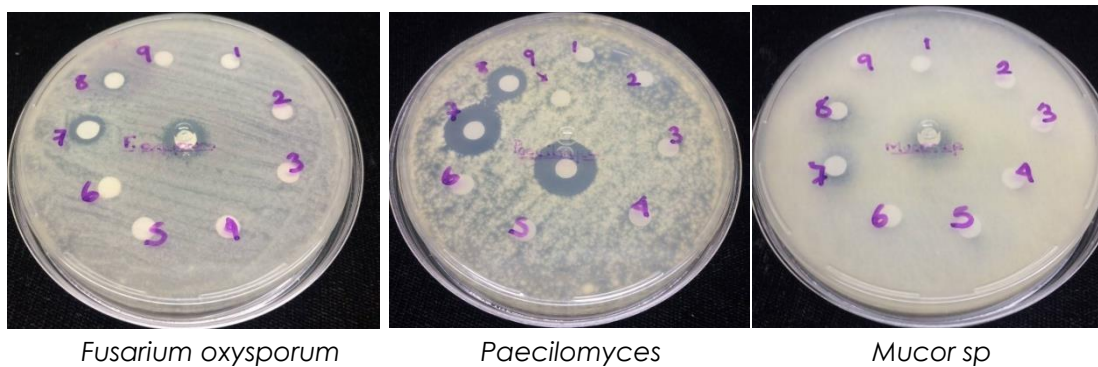


Figura 13. Bioensayos de inhibición de crecimiento de las fracciones frente a hongos

Cabe destacar que la fracción 6, que había sido eluída con dicloro:metanol 70/30, al ser evaporada formó un cristal cuadrado muy definido, pero no tuvo actividad antifúngica. Sin embargo, la fracción 7 eluída con dicloro:metanol 60/40 fue un polvo blanco la cual si presentó actividad antifúngica.

Con la información anterior, donde su aspecto físico es diferente de ambas fracciones y sospechando que pudieran tener compuestos diferentes, se realizaron pruebas hemolíticas que consisten en poner estos dos compuestos de las fracciones 6 y 7 en un medio que contiene sangre (eritrocitos). Esta prueba daría una idea de si los compuestos eran hemolíticos (lisaban los eritrocitos generando halos alrededor de los discos) y se observó que solo la fracción que tenía actividad antifúngica (fracción 7) tenía la capacidad de lisar a los eritrocitos generando un halo de lisis, no así la fracción 6. La fracción 6 (cristalina) fue sometida a difracción de rayos X; sin embargo, el resultado solo pudo arrojar que era una sal binaria.

Por los datos de la literatura, en donde la mayoría de compuestos antifúngicos son de la familia de los lipopéptidos, se propuso que ambas fracciones correspondían a lipopéptidos diferentes. Ambas fracciones fueron sometidas a espectrometría de masas confirmando que la fracción que no tenía actividad (fracción 6) correspondía a la surfactina; un lipopéptido con baja actividad antifúngica por sí solo, pero con sinergismo con otros lipopéptidos. La fracción 7 que sí tenía actividad correspondía a la fengicina; un lipopéptido con fuerte actividad antifúngica.

Respecto al análisis espectrométrico de masas se pudo observar que la fracción 6 mostraba un grupo de picos muy definidos con valores de 994 - 1074 m/z que son valores homólogos a la surfactina. Además, presentaba picos en $[M+H]^+$ de m/z = 994, 1008, 1022 y 1036 revelando diferencias de 14 Da correspondientes a los metilenos (CH_2) de las cadenas alifáticas. Los picos en m/z de 1046 y 1060 podrían ser atribuidos a los aductos de potasio $[M+K]^+$, mientras que los picos en m/z de 1058 y 1074 podrían corresponder a los aductos de sodio $[M+Na]^+$. La fracción 7 mostraba un grupo de picos bien definidos en valores de 1436 y 1493 m/z que son atribuidos a compuestos de tipo fengicina, el cual es el mayor de los lipopéptidos, como ya se ha comentado en los antecedentes (Figura 14). Todos los datos obtenidos fueron comparados con los reportados por la literatura observándose la similitud de datos obtenidos con los ya reportados.

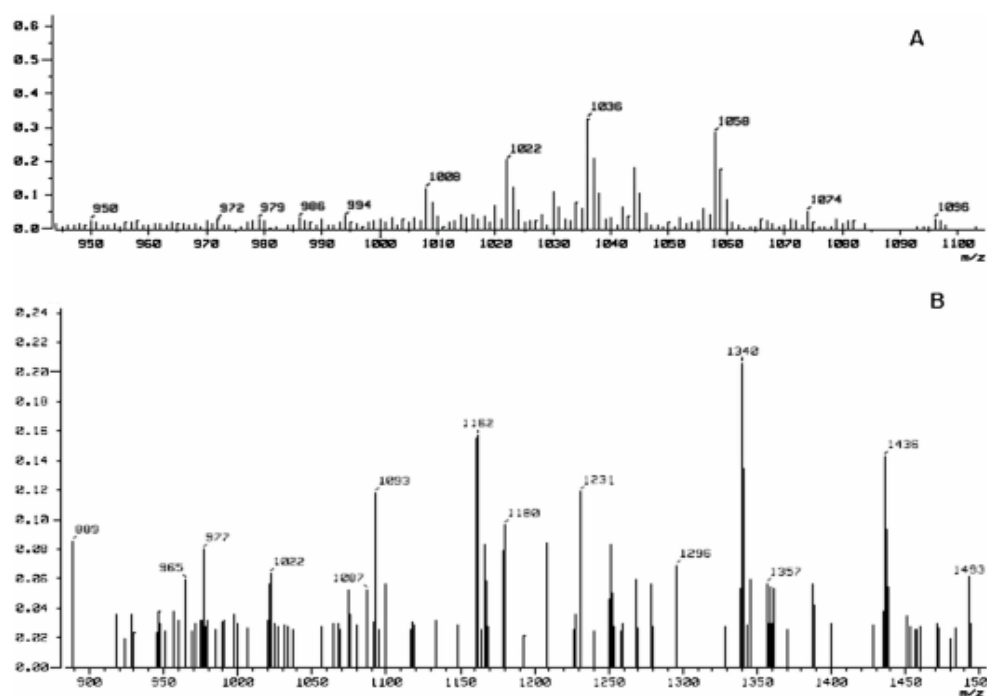


Figura 14. Espectrometría de masas de los compuestos tipo lipopéptidos. (A) Espectro del lipopéptido surfactina obtenido por FAB+MS, picos en un rango de m/z = 994, 1008 y 1036 Da fueron detectados. (B) espectro del lipopéptido fengicina obtenido por EI-MS picos en el rango de m/z = 1436 – 1493 Da.

1.3.1.3 Detección de la actividad antifúngica y daño celular de los lipopéptidos en hongos fitopatógenos

Los compuestos fengicina y surfactina se evaluaron por separado y en conjunto para observar si pudiera haber sinergismo entre ambos compuestos (Figura 15).

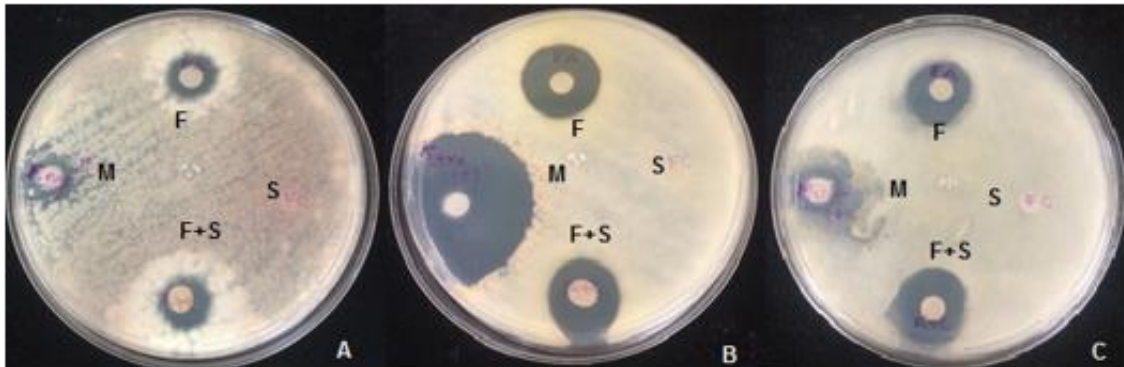


Figura 15. Determinación de la actividad antifúngica de fengicina (F) y surfactina (S) por medio de difusión en agar: (A) *Fusarium oxysporum*, (B) *Fusarium avenaceum*, (C) *Mucor sp* y (M) miconazol como control positivo.

Para evaluar la actividad antifúngica de los compuestos surfactina y fengicina, se tomó una muestra de la orilla del halo de inhibición para su observación a microscopía de contraste de fases. Esto se realizó con la finalidad de observar el daño producido por los lipopéptidos en los hongos probados *Mucor sp*, *F. oxysporum* y *F. avenaceum*, como se observa en la figura 16.

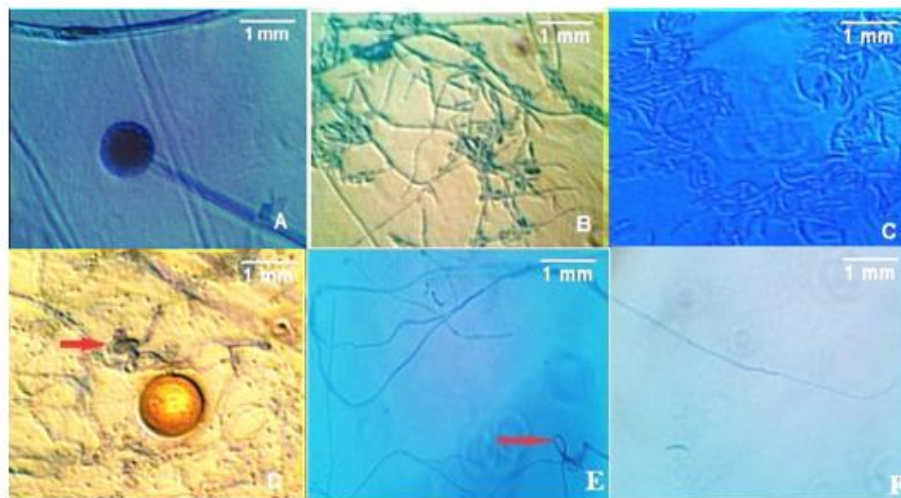


Figura 16. Daño de las estructuras fúngicas por los lipopéptidos por microscopia de contraste de fases; (A y D) *Mucor* sp., (B y E) *F. oxysporum* y (C y F) *F. avenaceum*.

En la imagen anterior se observa el daño provocado por los compuestos. Los controles en donde se encuentran los hongos sin compuestos aparecen en los paneles A, B, C mientras que los hongos tratados con los lipopéptidos aparecen en los paneles D, E y F. En los paneles inferiores se observa una disminución en todas las estructuras fúngicas (micelios y esporas). Además, las hifas (estructuras alargadas y tubulares de los hongos) aparecen curvadas (flecha roja), delgadas y mal teñidas. Este cambio tan drástico pone de manifiesto el daño celular producido por la presencia de los compuestos que le impiden al hongo crecer de manera correcta, provocando la lisis de la hifa y por ende una disminución considerable de las esporas.

1.3.2 Búsqueda de metabolitos de tipo policétido

Del fraccionamiento inicial, como ya se comentó, se obtuvieron nueve fracciones siendo las fracciones 7 y 8, las que tuvieron actividad antifúngica y antibacteriana. Sin embargo, había otras fracciones de interés que se analizaron del mismo extracto que fueron compuestos de tipo “dicetopiperazinas” ya anteriormente analizados y reportados [27]. Sin embargo, una de ellas era la obtenida con acetato de etilo y metanol al 2% (fracción 5) que no parecía ser ningún compuesto anteriormente identificado. Las fracciones analizadas anteriormente (6, 7 y 8) eran las que se obtenían en mayor proporción por lo que la cantidad no era un obstáculo. Lo contrario ocurría con esta nueva fracción 5 la cual se obtenía en cantidad reducida. Por este motivo se realizaron adecuaciones a la columna, tratando de controlar la obtención en mayor proporción de esta fracción de interés. Se utilizaron las polaridades que se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Fraccionamiento en columna de gel de sílice para obtención de la fracción 5.

Fracción	Sistema	Proporción
M1	Hexano	100%
M2	Hexano	100%
1A	AcOEt	100%
1B	AcOEt	100%
1C	AcOEt	100%
2A	AcOEt: MeOH	2%
2B	AcOEt: MeOH	2%
2C	AcOEt: MeOH	2%
3A	DCM:MeOH	5%
3B	DCM:MeOH	5%
3C	DCM:MeOH	5%
4A	MeOH	100%
4B	MeOH	100%
4C	MeOH	100%

Se analizó por medio de RMN de ^1H los extractos y en la fracción de 2B (AcOEt: MeOH 2%) con un peso de 15 mg se observaban señales muy interesantes a lo largo del espectro que iban de 7 ppm a 2 ppm por lo que se denomina como compuesto **1** el cual se procede a purificar.

Para su purificación se utiliza una columna de gel de sílice de aproximadamente 12 cm de largo y un diámetro de 1 cm utilizando sistemas de hexano, acetato de etilo y metanol en diferentes proporciones. El compuesto **1** se observó en el sistema de AcOEt:MeOH 10% y se procedió a su caracterización.

1.3.2.1 Caracterización de 7-O-succinil macrolactina A

Se obtuvo un espectro de infrarrojo (IR) el cual nos muestra información acerca de los posibles grupos funcionales presentes en la estructura química del compuesto **1**, como se muestra en la Figura 17.

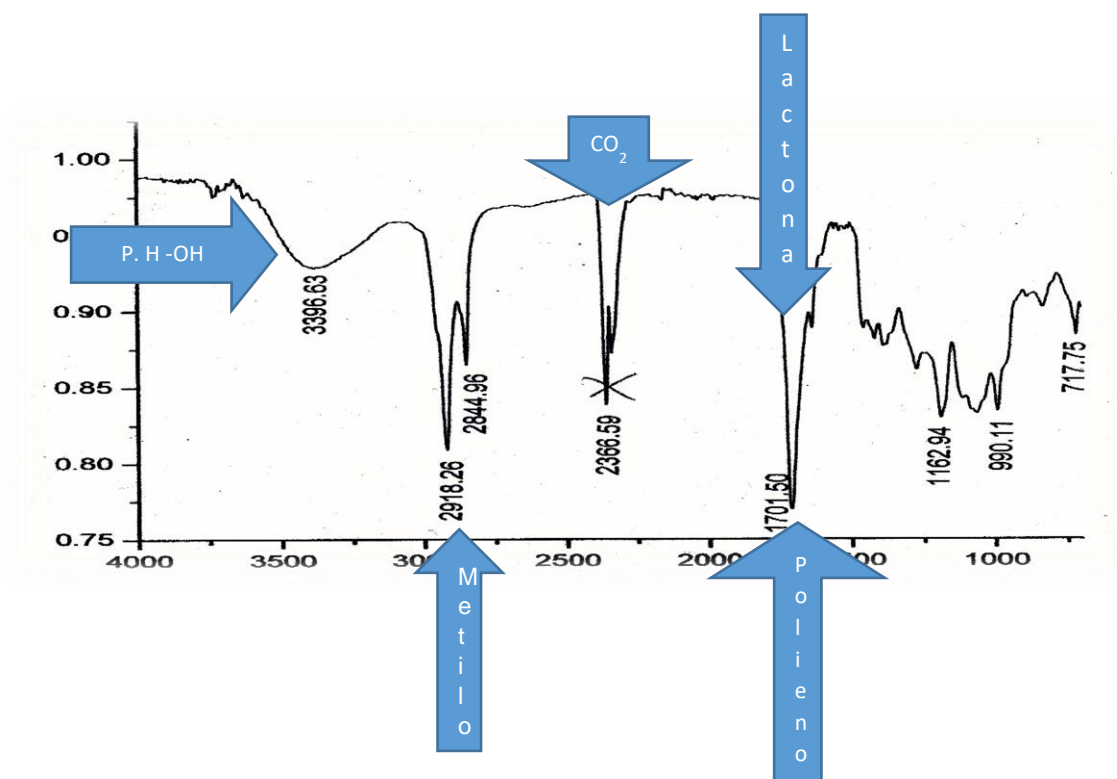


Figura 17. Espectro de IR del compuesto **1**

En la figura 17 se observan bandas en 3300 cm^{-1} que puede corresponder a grupos hidroxilo de ácidos o alcoholes, también se observa otra banda presente en 2900 cm^{-1} correspondiente a enlace C-H de grupos metilo y metileno. En la

región de 1700 cm^{-1} se observa una banda ancha y pronunciada que corresponde a grupos funcionales de tipo lactona y tipo polieno. Cabe mencionar que se observa una banda muy pronunciada en 2300 cm^{-1} que es un remanente de CO_2 por parte del equipo usado.

Se procedió a realizar el análisis de los espectros obtenidos por resonancia magnética nuclear de ^1H de 500 MHz en CDCl_3 , como se observa en la Figura 18.

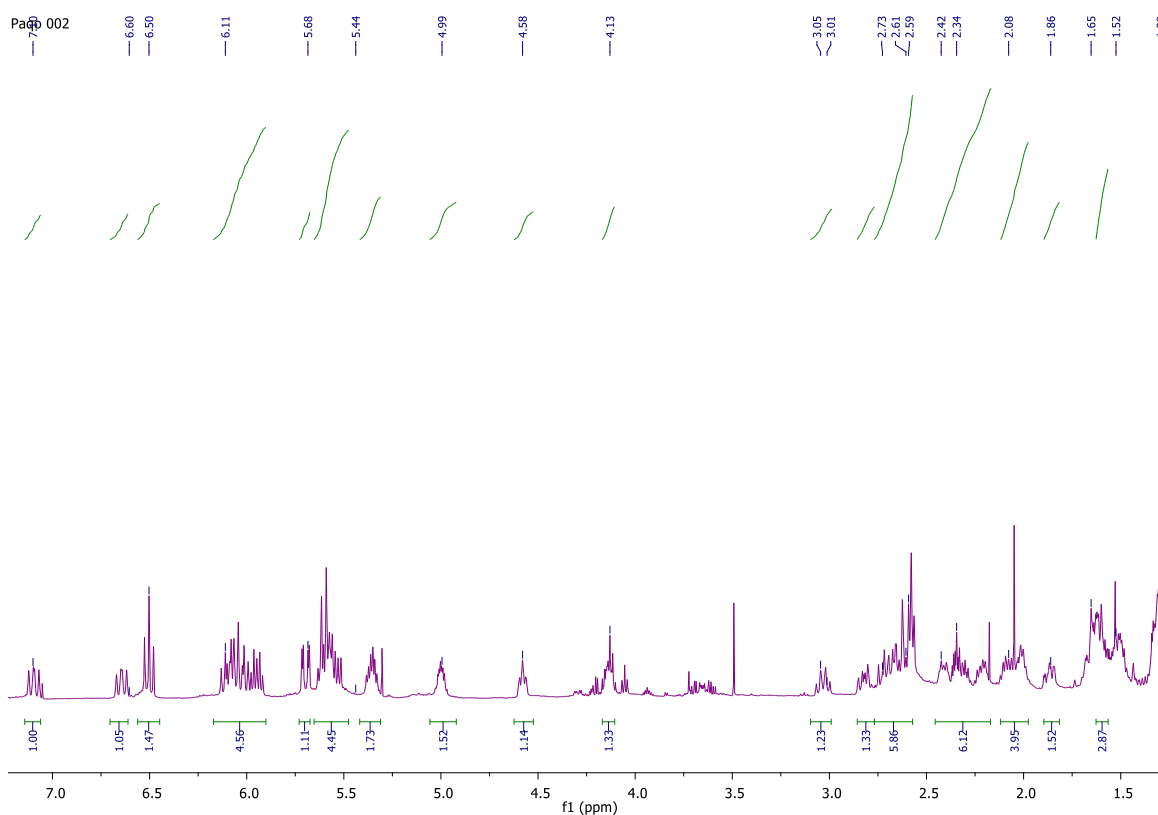


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto **1**

En el espectro de RMN de ^1H se observan diferentes señales con sus diferentes multiplicidades para los diferentes hidrógenos presentes. Haciendo una rápida visualización de las señales se puede observar en la región de 6.5-4.5 ppm señales múltiples que podrían ser asignadas a hidrógenos olefínicos, en la región de 3.0-1.0 ppm podrían ser hidrógenos de carbonos con hibridación sp^3 , vecinos a un átomo más electronegativo.

Dada la complejidad que tiene el espectro de ^1H se tuvo que obtener y analizar de manera exhaustiva y por medio de expansiones el espectro 2D COSY para poder asignar inequívocamente el espectro de ^1H . Primeramente se analiza la expansión del espectro COSY que comprende la región de 7.2 a 4.5 ppm, como se muestra en la figura 19. Se realiza el análisis de los espectros de RMN de ^1H y COSY simultáneamente.

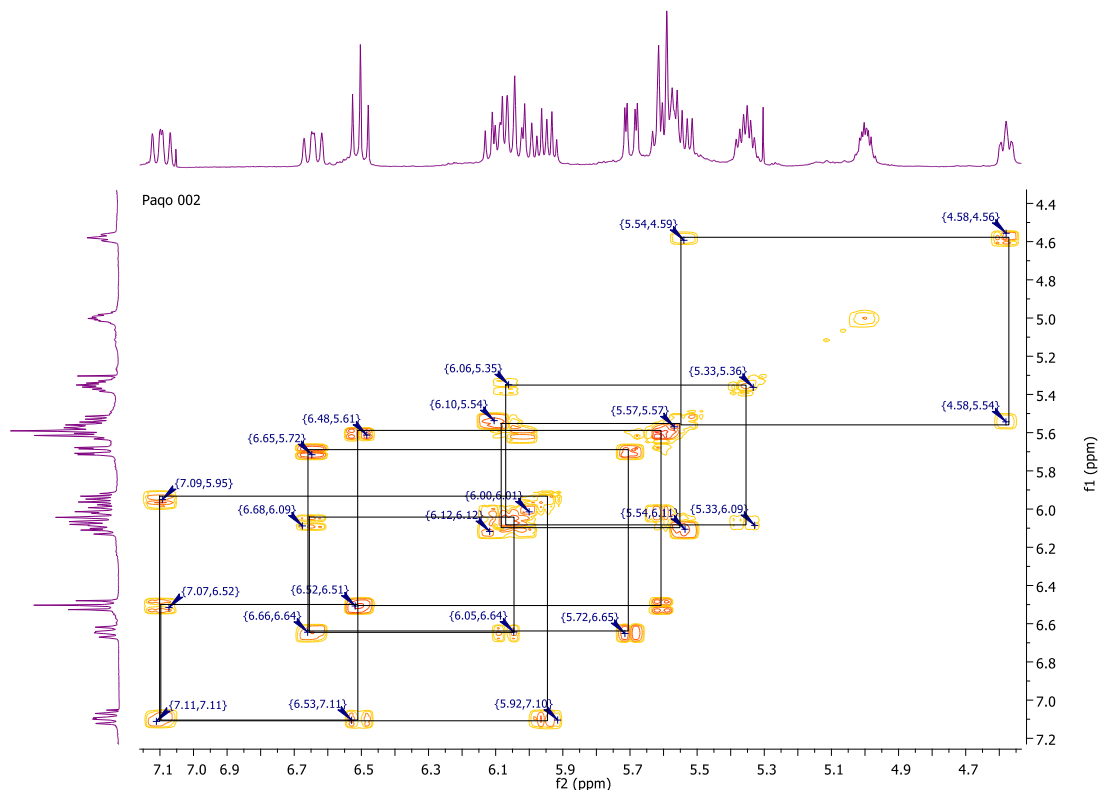


Figura 19. Expansión 7.2 – 4.5 ppm del espectro 2D COSY del compuesto **1**

En el espectro de RMN de ^1H en 7.10 ppm (H4) se observa una señal que integra para 1H, teniendo una multiplicidad de doble de dobles (dd) ($J = 14, 11$ Hz), la cual se observa que en el espectro COSY se correlaciona con otras dos señales; la primera la señal en 6.50 ppm (H3) que es un triple ($J = 11$ Hz) que integra para un hidrógeno y una segunda señal en 5.95 ppm (H5) que es una señal múltiple que integra para cuatro hidrógenos; sin embargo, uno de éstos es con quien se acopla la señal en 7.10 ppm por lo que los otros hidrógenos son de otra señal traslapada en el mismo desplazamiento.

Seguida aparece la señal en 6.64 ppm (H9) la cual es dd ($J = 11, 15$ Hz) que integra para un hidrógeno, la cual correlaciona en el COSY con dos señales; la primera con la señal en 6.04 ppm (H10) la cual se observa como una señal múltiple traslapadas con otras que integran para 4 hidrógenos donde solo uno de ellos se acopla con esta señal; la segunda señal es en 5.68 ppm (H8) la cual es una señal dd ($J = 15, 3.5$ Hz) que integra para un hidrógeno.

En 6.50 ppm se encuentra la señal de H3, descrita anteriormente ya que se acopla con H4, que también tiene un acoplamiento con una señal en 5.59 ppm (H2) que es una señal múltiple donde uno de los hidrógenos presentes en esa señal es con quien se acopla H3. La señal H2 solo tiene un acoplamiento con H3, por lo que se puede inferir que el carbono C2 está unido a un átomo el cual no posee más átomos de hidrógeno.

En 6.11 ppm (H17) se observa una señal la cual está dentro de una señal múltiple traslapada, sin embargo, se logra identificar el tipo de multiplicidad que es dd ($J = 15, 10$ Hz) la cual tiene dos acoplamientos en el espectro 2D COSY: el primero dentro de esa misma región traslapada; 6.06 ppm (H18) la cual se observa como una señal múltiple que integra para un hidrógeno. A su vez esta señal de H18 se encuentra acoplada con 5.63 ppm (H19) el cual es una señal múltiple que integra para un hidrógeno. El segundo acoplamiento es con una señal en 5.53 ppm (H16) la cual integra para un hidrógeno. En esta región también se encuentra H10 el cual se acopla con H9 y con una señal en 5.35 ppm (H11) la cual es una señal múltiple que integra para un hidrógeno.

En 5.68 ppm se observa la señal de H8 que se acopla con H9, sin embargo, presenta otro acoplamiento con la señal en 5.60 ppm (H7) el cual se encuentra en la región de traslapado de señales donde se observa que uno de los cuatro hidrógenos a los cuales integra la señal es con quien se acopla H8.

En 5.53 ppm se observa a H16 quien se acopla con H17, anteriormente mencionado, y también con la señal en 4.58 ppm (H15) el cual denota una multiplicidad triple (t) ($J = 7$ Hz) la cual integra para un hidrógeno.

Con los datos analizados hasta ahora se puede asignar una parte del espectro de RMN ^1H del compuesto **1**, tal y como se muestra en la Figura 20.

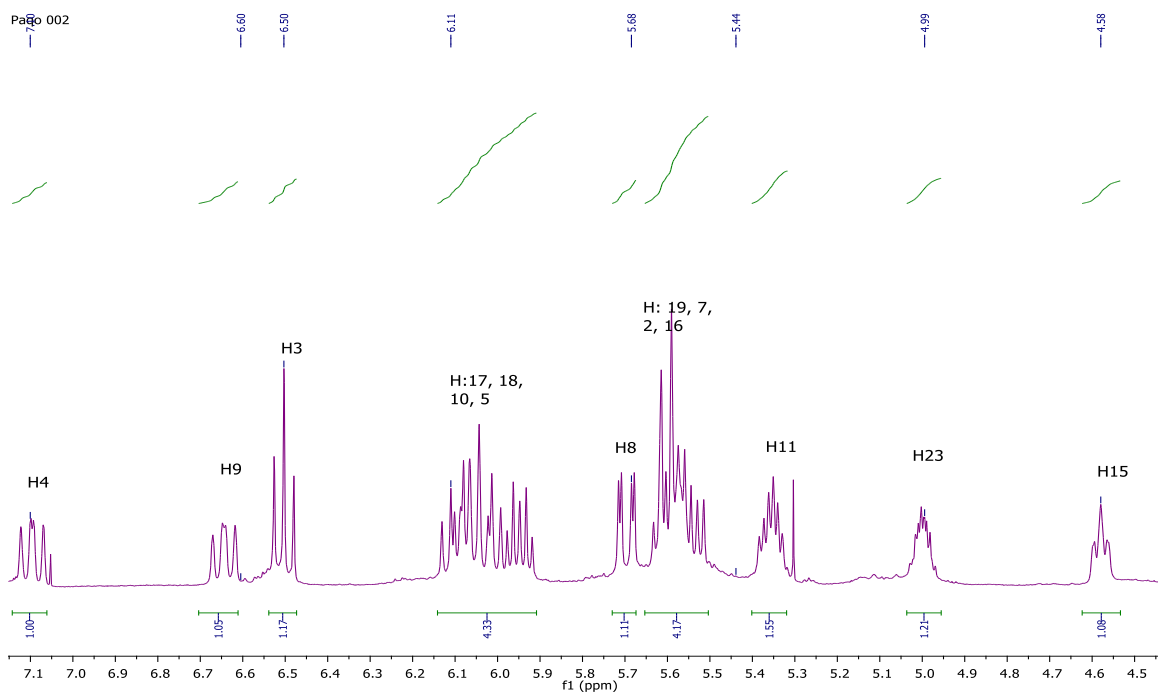


Figura 20. Expansión 7.2-4.5 ppm del espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto **1**.

Siguiendo con el análisis del espectro se realiza la expansión de la región 4.30-1.30 ppm del espectro 2D COSY, tal y como se muestra en la Figura 21.

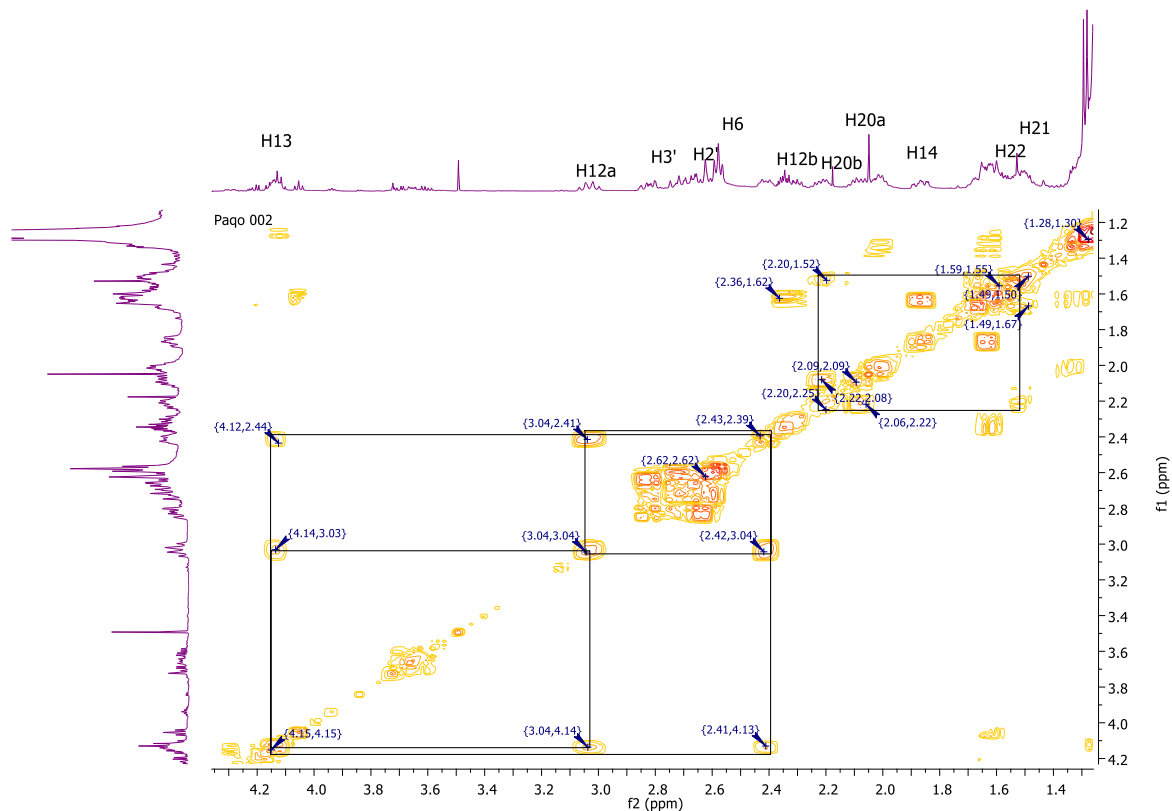


Figura 21. Expansión del espectro COSY compuesto **1** de la región 4.30 – 1.30 ppm

En la región de 4.13 ppm (H13) se observa una señal múltiple que integra para un hidrógeno la cual se acopla con la señal de 3.0 ppm (H12a) que denota una multiplicidad de doble de triples (dt) ($J = 10, 13$ Hz), además tiene un segundo acoplamiento con otra señal en 2.34 ppm (H12b) que es una señal múltiple que integra para un hidrógeno. La señal de H12a se acopla a su vez con H12b por lo que se puede decir que forman parte de un metileno pegado a un centro quiral y por eso los hidrógenos son diastereotópicos. Ambas señales H12a y H12b se acoplan con H11 en 5.35 ppm como ya se mencionó anteriormente.

En 2.68 ppm (H3') y 2.62 ppm (H2') se observan dos señales múltiples que integran ambas para dos hidrógenos y se acoplan únicamente entre ellas. La siguiente señal es en 2.58 ppm (H6) la cual muestra una multiplicidad triple (t, $J = 7$ Hz) que integra para dos hidrógenos, esta señal se acopla con la señal H5 y H7, anteriormente mencionadas.

Las siguientes señales en 2.19 ppm (H20b) y 2.09 ppm (H20a) se observan como señales múltiples que integran para un hidrógeno y se acoplan con la señal en 1.51 ppm (H21) la cual es un múltiple que integra para dos hidrógenos. La siguiente es la señal en 1.86 ppm (H14) que es una señal múltiple que integra para dos hidrógenos y tiene un acoplamiento con H15 y H13. La siguiente señal aparece en 1.57 ppm (H22) como una señal múltiple que integra para dos hidrógenos y que se acopla con H21 y H23 (4.8 ppm, múltiple e integra para un hidrógeno). La siguiente señal aparece en 1.51 ppm (H21) la cual exhibe una multiplicidad múltiple con una integración de 2 hidrógenos y que se acopla con H22 y con H20a y H20b. Por último, se observa una señal doble en 1.29 ppm (H23-Me) (d, $J = 6$ Hz) la cual tiene solo un acoplamiento con H23 (4.98 ppm). Con este análisis se asignan las señales en el espectro 1D de RMN ^1H a 500 MHz, como se observa en la Figura 22.

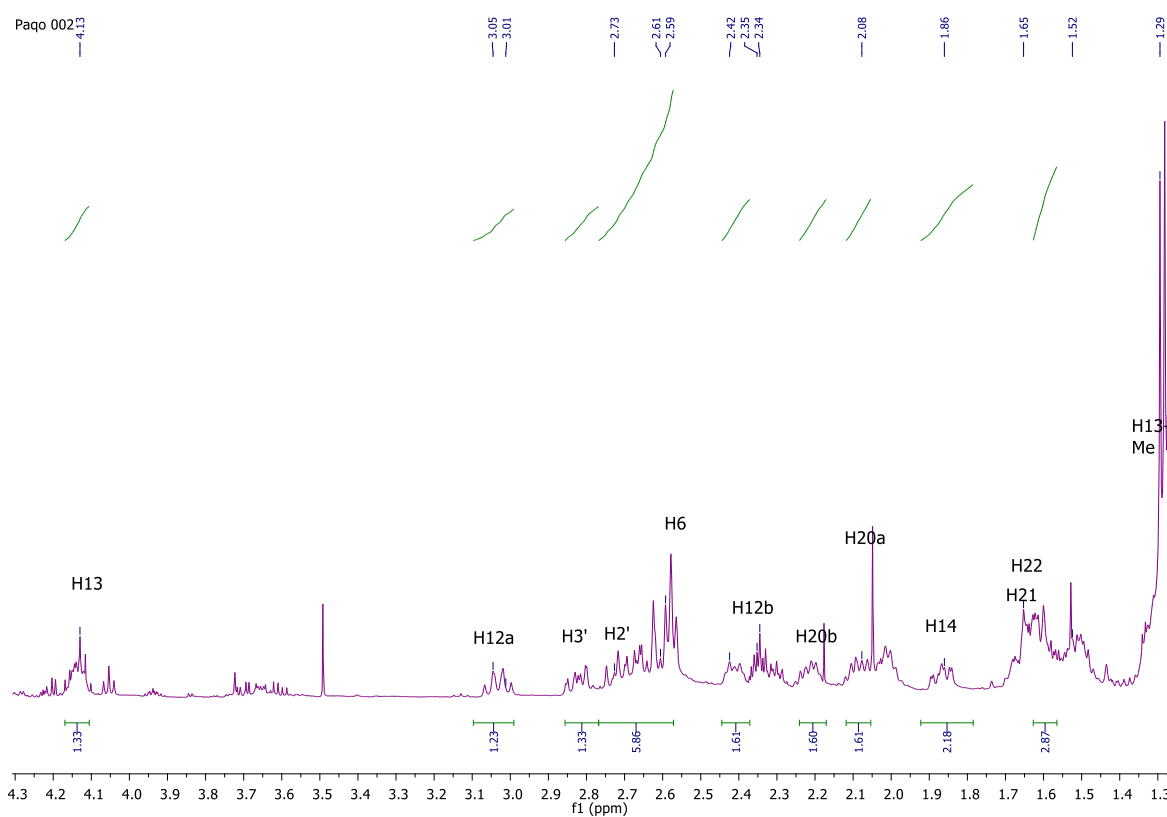


Figura 22. Expansión 4.3 – 1.3 ppm del espectro de RMN de ^1H a 500 MHz del compuesto **1**

También se adquirió el espectro de RMN de ^{13}C y se realizó una asignación primaria, en donde se observaron 28 carbonos presentes en el compuesto **1**, como se observa en la Figura 23.

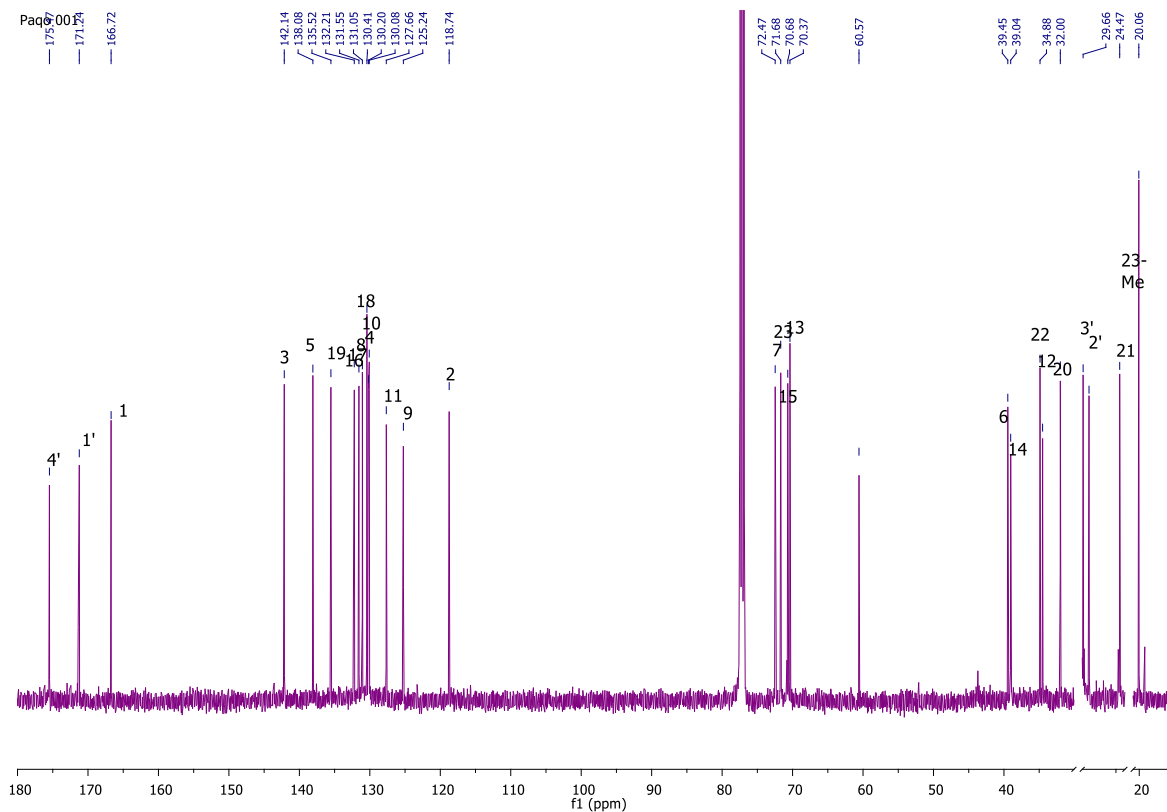


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto **1**.

Se observan entre 180 ppm y 165 ppm tres señales que por la región son de tipo carbonilo. Las señales que aparecen en la región de 145-115 ppm indican que los carbonos son de hibridación sp^2 (dobles enlaces); en la región de 75-70 ppm se muestran los carbonos de hibridación sp^3 , pero con la particularidad de que son terciarios lo que indica que son CH que por el mismo desplazamiento que exhiben denotan que uno de los átomos vecinos es de mayor electronegatividad que el propio átomo de carbono. Por último, en la región de 40-15 ppm se presentan los carbonos de hibridación sp^3 de tipo alcanos. Sin embargo, para una correcta asignación de los carbonos con su correspondiente señal de hidrógeno se procedió a la obtención del espectro 2D HSQC, como se observa en la Figura 24.

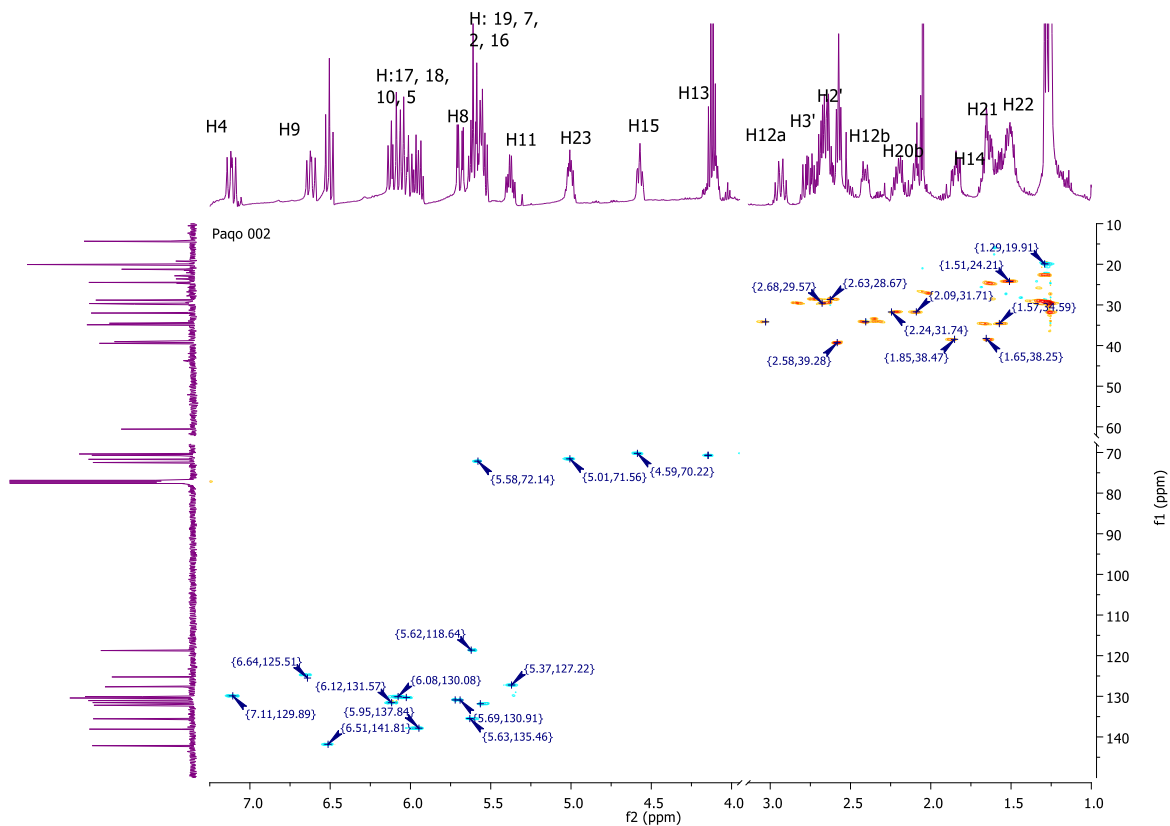


Figura 24. Espectro HSQC del compuesto 1.

Se puede observar que los tres carbonos que aparecen en la región entre 180 ppm y 165 ppm no tienen correlación con ningún hidrógeno por lo que confirma que son carbonilos. Para disipar las dudas entre los grupos CH, CH₂ y CH₃ se realiza un experimento DEPT 135, ya que este experimento establece que las señales pertenecientes a los grupos CH₃ y CH aparecen como señales hacia arriba, en cambio los grupos CH₂ aparecen como señales hacia abajo, como se observa en la Figura 25.

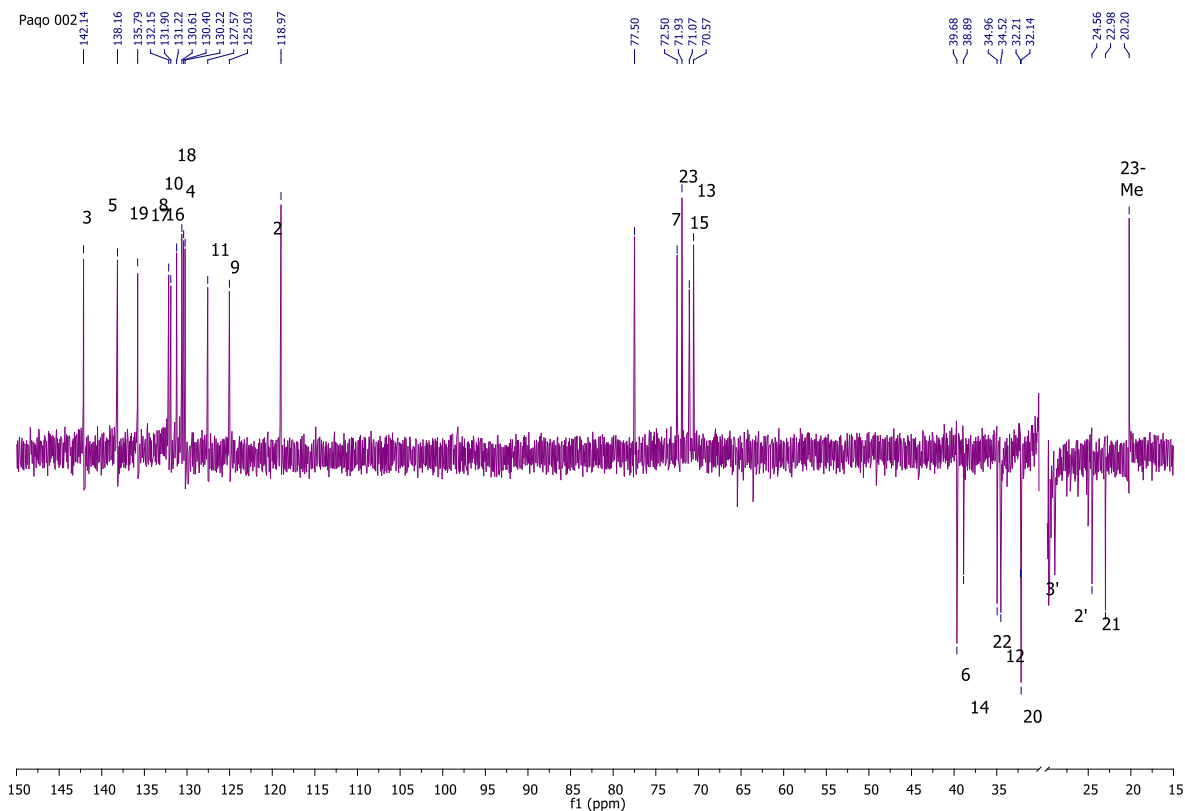


Figura 25. Espectro DEPT 135 del compuesto **1**.

Todo el análisis presentado de los espectros de RMN de ^1H , COSY, RMN de ^{13}C , HSQC y DEPT 135 se resumió en la siguiente tabla 9 para la elucidación del compuesto **1**.

Tabla 9. Resumen de las señales de los espectros.

Correlación		Tipo de carbono
^1H ppm	^{13}C ppm	DEPT 135
-	175.5	-
-	174.2	-
-	166.7	-
6.50	142.1	CH
5.95	138.0	CH
5.63	135.5	CH
5.53	132.2	CH
6.11	131.5	CH
5.68	131.1	CH
6.04	130.4	CH
6.06	130.2	CH
7.10	130.0	CH
5.35	127.6	CH

6.64	125.2	CH
5.59	118.7	CH
5.60	72.4	CH
4.98	71.6	CH
4.13	70.6	CH
4.58	70.3	CH
2.58	39.4	CH ₂
1.86	39.0	CH ₂
1.57	34.8	CH ₂
3.0, 2.34	34.5	CH ₂
2.19, 2.09	32.0	CH ₂
2.68	29.6	CH ₂
2.62	28.8	CH ₂
1.51	24.4	CH ₂
1.29	20.6	CH ₃

Con la información de los espectros de RMN e IR, se propone la estructura química del compuesto 1, que se muestra en la figura 26.

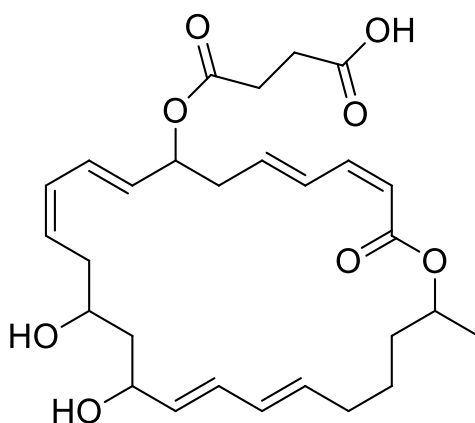


Figura 26. Estructura propuesta para el compuesto **1**.

De los datos que se tienen en la literatura, tal y como ya se describió en los antecedentes, la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* es capaz de producir compuestos del tipo "policétido-macrólidos" que poseen diversas actividades biológicas. Al realizar una comparación de la estructura obtenida se pudo identificar que se trata de la 7-O-succinil macrolactina A. La estructura coincide con la información obtenida; sin embargo, debido a que es una molécula quiral con cuatro carbonos asimétricos, para poderle asignar la estereoquímica se

procedió a obtener su rotación óptica. El dato obtenido mediante el uso del polarímetro fue de:

$$[\alpha]_D^{24} = -46.46 (c = 0.99, \text{ MeOH})$$

Se comparó el resultado obtenido con lo reportado por Romero-Tabarez y colaboradores en 2006 [22] quienes obtuvieron una rotación óptica de $[\alpha]_D^{22} = -19.9 (c = 0.7, \text{ MeOH})$. Se observa que el signo es el mismo y la diferencia puede ser incluso por la cantidad o alguna impureza pequeña que pudiera tener el compuesto. Con los resultados obtenidos se asignó la estereoquímica del compuesto **1** y su nombre, que fue 7-O-succinil macrolactina A, tal y como se muestra en la Figura 27.

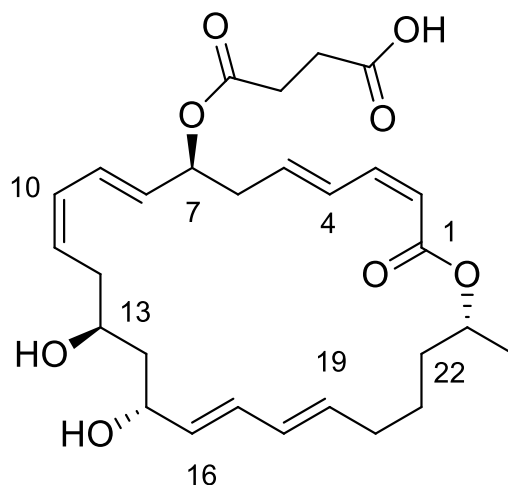


Figura 27. Estructura con estereoquímica del compuesto **1**, 7-O-succinil macrolactina A.

1.3.3 Estudio de medios para posible aislamiento de otras macrolactinas

Revisando la literatura se puede observar que existen reportadas una variada gama de macrolactinas aisladas de diferentes cepas [20]. Con la inquietud de analizar si cambiando el medio de cultivo se podrían obtener otros compuestos de tipo macrolactinas se procedió a cultivar en otros medios de cultivo a la bacteria *B. amyloliquefaciens* EL1149.

Se procedió a seleccionar un medio de cultivo menos nutritivo que el que se había empleado, tripticaseína de soya (TSB), por lo que se seleccionó el medio "Luria Bertani" (LB) el cual contiene menos nutrientes que el (TSB), pero es un medio medianamente rico. Por lo que se procedió a obtener el respectivo extracto de este nuevo medio obteniendo 700 mg de extracto crudo a partir de un litro de cultivo. Éste se sometió a un fraccionamiento general para la búsqueda de macrolactinas. El resultado fue interesante ya que se obtuvo el mismo compuesto. Esto podría ser un indicativo de que el medio no era una condición tan determinante como lo es la propia especie. El medio TSB y LB poseen en su composición peptonas y extracto de levadura por lo que no eran muy diferentes en constitución, pero en cantidades el medio TSB contenía mayor proporción de nutrientes por litro que el medio LB.

Por lo que, se procedió a volver a cambiar el medio de cultivo a uno extremadamente pobre con un mínimo de nutrientes llamado TrisG el cual sólo le aporta una fuente de carbono (glucosa) y el resto sólo son sales (principalmente este medio se utiliza para la inducción del proceso de esporulación). Éste se sometió a un fraccionamiento general para la búsqueda de macrolactinas y se observa que en la fracción 5B el cual fue obtenida de un sistema AcOEt 100%, se obtuvo un espectro de RMN de ^1H con señales muy parecidas a 7-O-succinil macrolactina A, pero con algunas diferencias en la integración de señales, así como algunos desplazamientos, por lo que se procedió a purificar para identificar el compuesto **2**.

Para su purificación se utilizó una columna cromatográfica con soporte de gel de sílice, de 10 cm de largo con un diámetro de 1 cm utilizando sistemas de hexano y acetato de etilo en diferentes proporciones. El compuesto **2** se observó en el sistema Hex:AcOEt 90% y se procedió a su caracterización.

1.3.3.1 Caracterización de macrolactina A

Para la adecuada caracterización del compuesto **2** se obtuvieron los espectros de RMN 1D y 2D. En la siguiente figura 28 se observa el espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 .

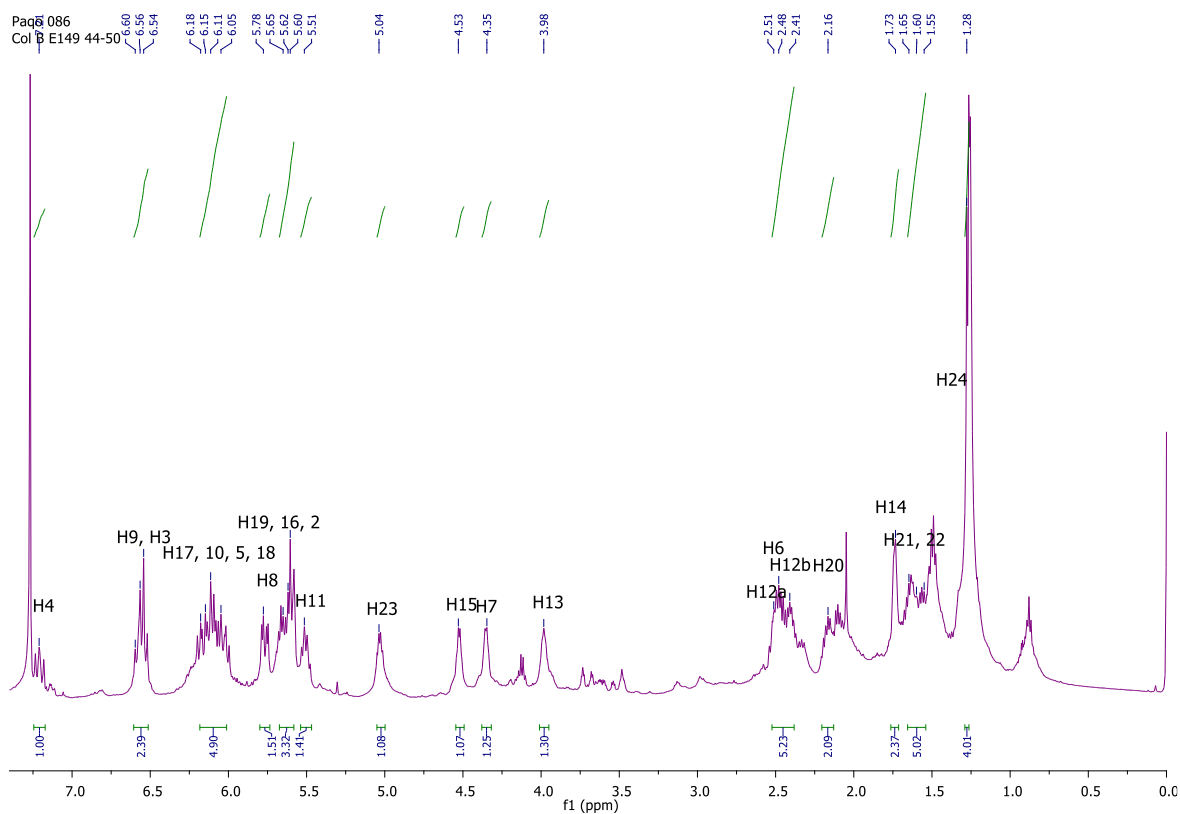


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto **2**.

Cuando se analiza este espectro de ^1H de RMN, se observa que tiene señales muy similares al espectro obtenido de la 7-O-succinil macrolactina A, sin embargo, se notan unas pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos. Hay que tener en cuenta la cantidad de macrolactinas reportadas que tienen el mismo ciclo de 24 átomos de carbono con sustituyentes diferentes. Por lo que se tenía que analizar el espectro cuidadosamente y al igual que para el compuesto anterior se analizará por medio de las expansiones en dos secciones. En la figura 29 se muestra la expansión de la región 7.25–3.5 ppm del espectro de RMN de ^1H .

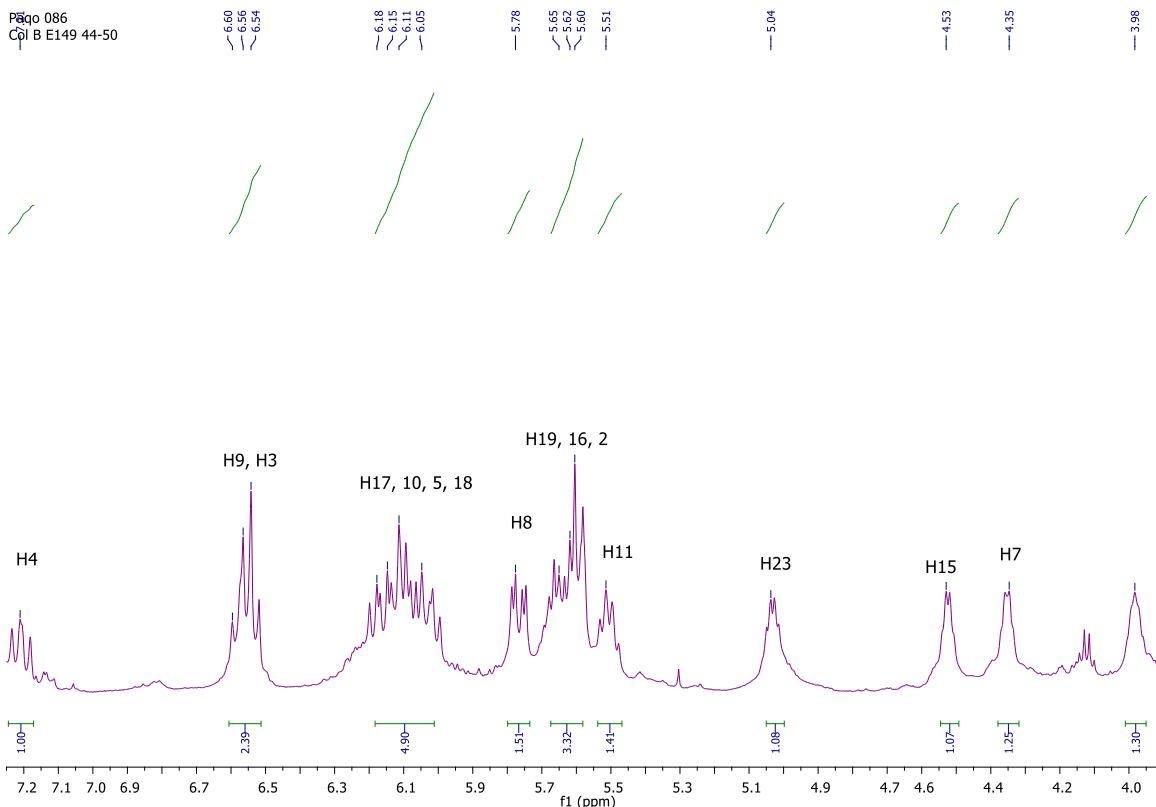


Figura 29. Expansión de 7.25–3.5 ppm del espectro de RMN de ^1H del compuesto **2**

En 7.23 ppm (H4) se observa una señal dd ($J = 11.5, 12$ Hz) que integra para un hidrógeno. En 6.60 ppm (H9) y 6.54 ppm (H3) se observan dos señales traslapadas dando un aspecto de señal cuádruple que integran para dos hidrógenos siendo diferentes cada uno de ellos. Estas dos señales estaban separadas y diferenciadas en el espectro de ^1H del compuesto **1**.

En la región de 6.3-5.9 ppm se observa una señal múltiple con una integración para cuatro hidrógenos que corresponden a los hidrógenos H17, H10, H5 y H18. En 5.78 ppm se observa la señal (H8) con una multiplicidad dd ($J = 5.5, 5.5$ Hz) y que integra para un hidrógeno.

En la región de 5.7-5.55 ppm se observa una señal múltiple que integra para tres hidrógenos y que corresponde a H19, H16 y H2. En el espectro del compuesto **1** en esta región (5.60 ppm) se observaba el hidrógeno H7; sin embargo, en este espectro del compuesto **2** no se observa, esta es una clara diferencia que el compuesto es diferente, pero contiene el núcleo de la macrolactina.

En 5.51 ppm (H11) se observa una señal cuádruple ($J = 9, 9$ Hz) que integra para un hidrógeno. También se observan una señal múltiple en 5.03 ppm (H23) que integra para un hidrógeno y una señal múltiple en 4.53 ppm (H15) que integra para un hidrógeno.

Llama la atención una señal múltiple que se observa en 4.36 ppm y que integra para un hidrógeno, la cual es una señal que no se observaba en el espectro del compuesto **1** y que se sospecha que pudiera ser el hidrógeno H7. Esto debido a que la mayoría de macrolactinas tienen la diferencia en el sustituyente del C7. También se observa en 3.98 ppm (H13) una señal múltiple que integra para un hidrógeno.

En la figura 30 se analizará la expansión del espectro de RMN de ^1H de 2.6-1.20 ppm analizando cada una de las señales presentes. Esta región del espectro se caracteriza por contener los hidrógenos correspondientes a carbonos de hibridación sp^3 unidos a átomos más electronegativos.

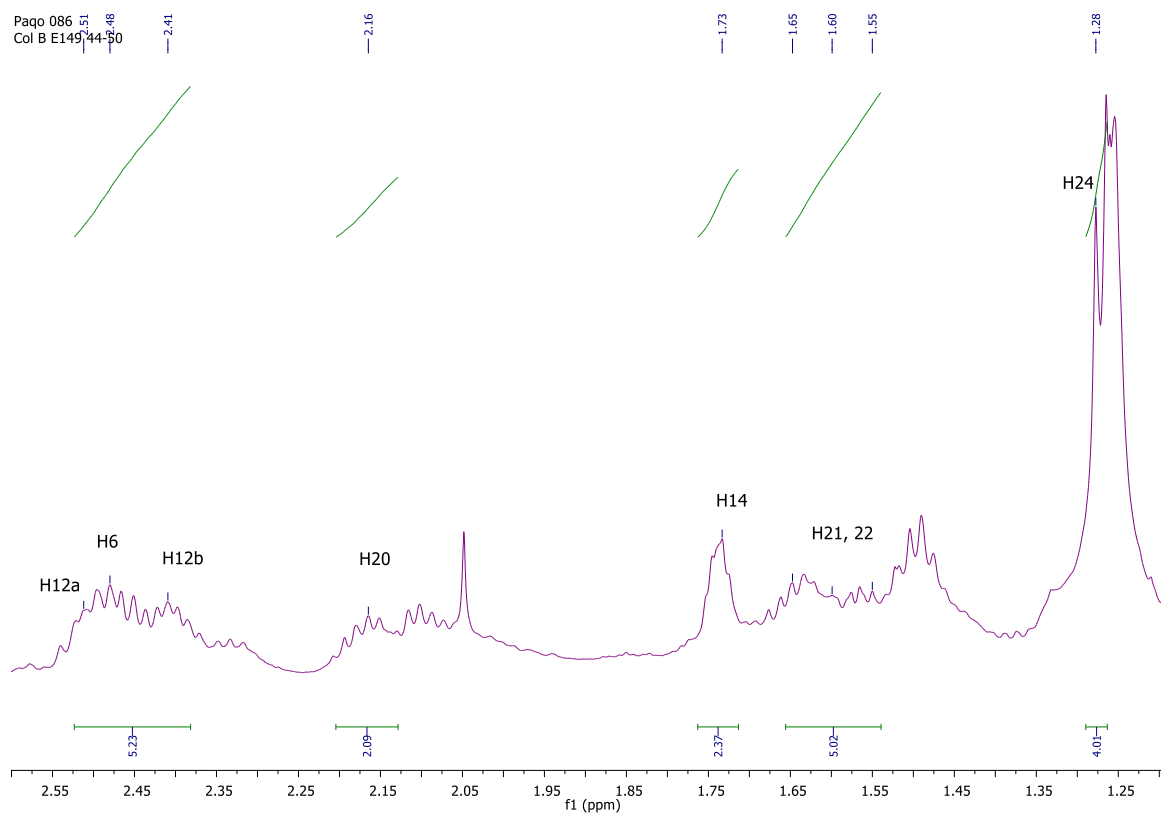


Figura 30. Expansión de 2.6-1.20 ppm del espectro de RMN de ^1H del compuesto **2**

En la región de 2.55 - 2.35 ppm se observa una señal múltiple que integra para cuatro hidrógenos correspondientes a H12a, H12b y 2H6. Se observan en 2.26 ppm (H20), 1.73 ppm (H14), 1.64 ppm (H21) y 1.56 (H22) ppm señales anchas múltiples que integran para dos hidrógenos cada una. Finalmente, en 1.28 ppm se observa una señal doble ($J = 6$ Hz) que integra para tres hidrógenos, lo cual corresponde a un CH_3 .

Este análisis se complementó con el espectro de dos dimensiones COSY con el fin de poder asignar los hidrógenos del compuesto **2** inequívocamente y observar alguna diferencia con el compuesto **1** (Figura 31).

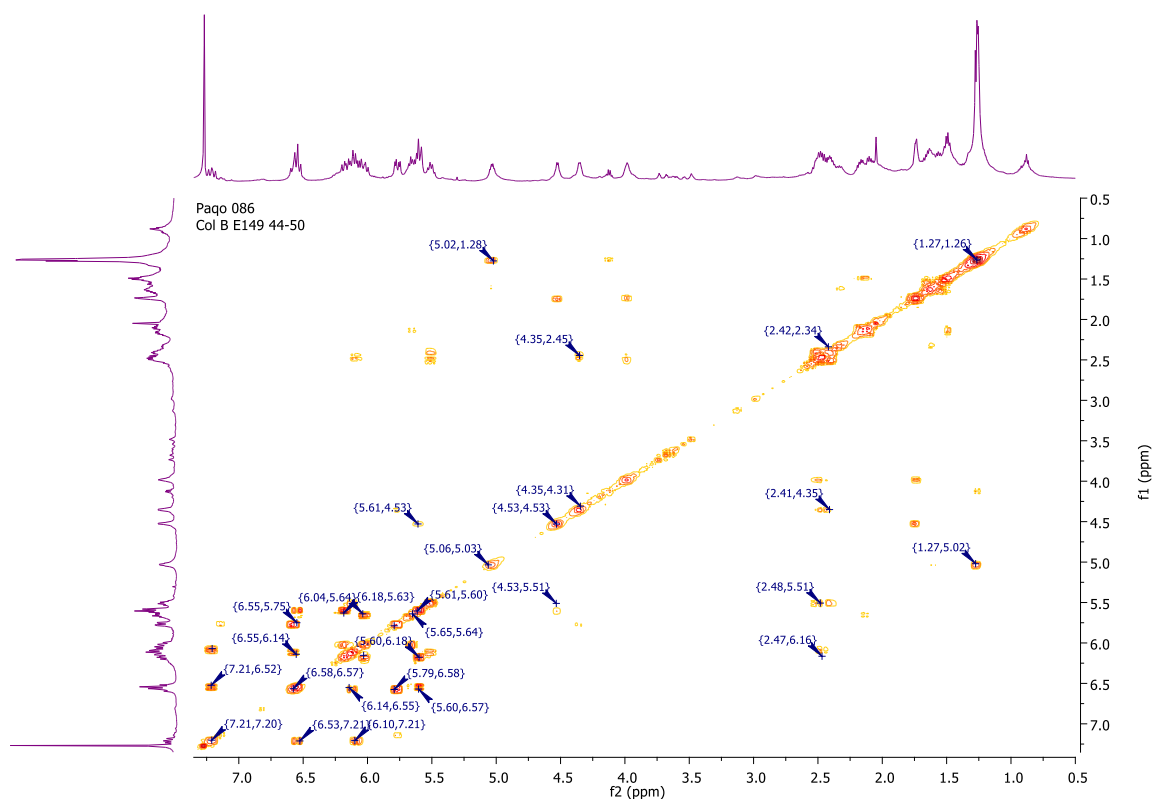


Figura 31. Espectro COSY del compuesto **2**.

La mayoría de señales coincidían con las observadas para el compuesto **1**; sin embargo, para poder confirmar que la señal observada en 4.36 ppm correspondía al H7 se analizó la expansión del COSY, como se muestra en la figura 32.

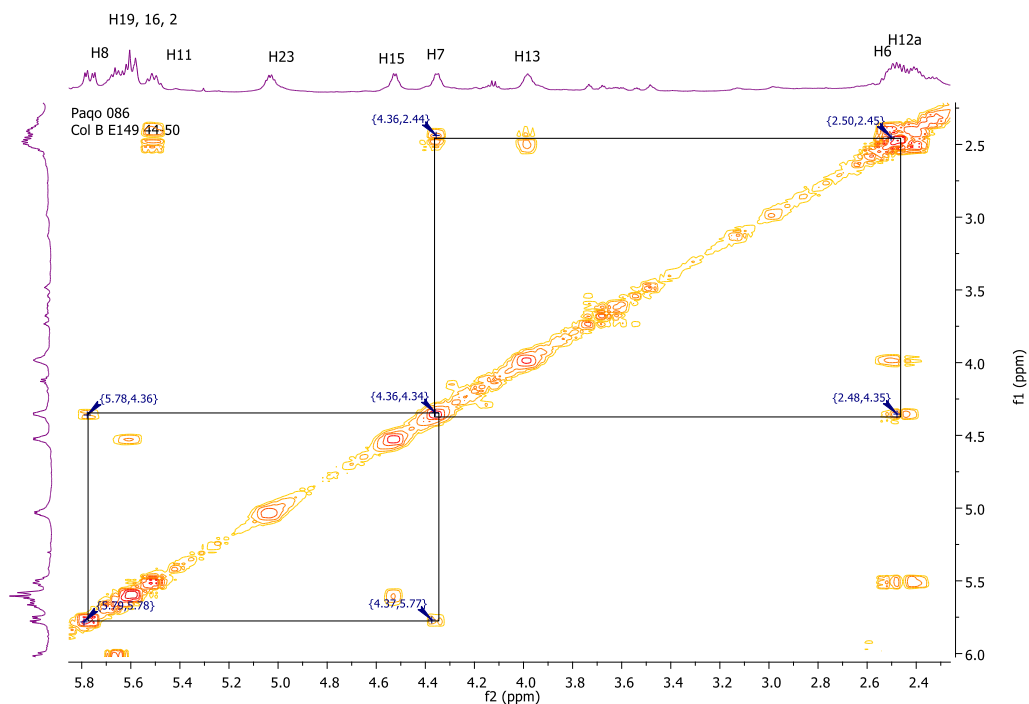


Figura 32. Expansión (5.8 – 2.3 ppm) del espectro COSY del compuesto **2**.

Como se observa en la expansión del espectro COSY, la señal que se observa en 4.36 ppm correlaciona con H6 (2.48 ppm) y con H8 (5.78 ppm) lo cual nos da información clara que corresponde a H7. Por lo tanto, se puede confirmar que este hidrógeno ha cambiado por lo que tenemos un compuesto diferente al 7-O-succinil macrolactina A.

La señal H7 en el compuesto **1** se observaba en un mayor desplazamiento químico (5.60 ppm) y en este compuesto **2** se encuentra a menor desplazamiento químico (4.36 ppm) lo que sugiere que el ambiente químico y la densidad electrónica ha cambiado. Esto da una idea que el sustituyente en el C7 en el compuesto **2** es diferente al del compuesto **1**.

Se procedió a obtener un espectro de RMN de ^{13}C con fin de comparar con el compuesto **1**, 7-O-succinil macrolactina A, tal y como se observa en la figura 33.

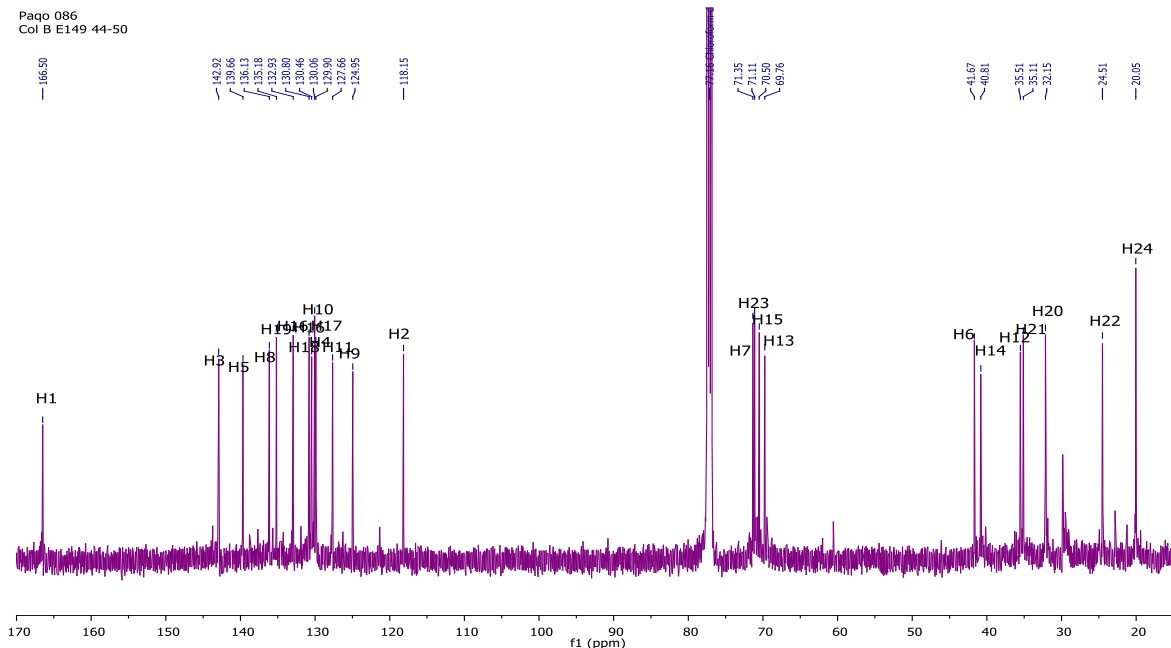


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz del compuesto **2**

En el espectro se observan 24 átomos de carbonos diferentes presentes en la molécula; que son cuatro menos que el compuesto **1**, con una primera diferencia a simple vista y es que en la región de los carbonilos sólo se observa una señal. Con el fin de comparar el espectro de los dos compuestos se realiza una comparación de ambos, como se observa en la Figura 34.

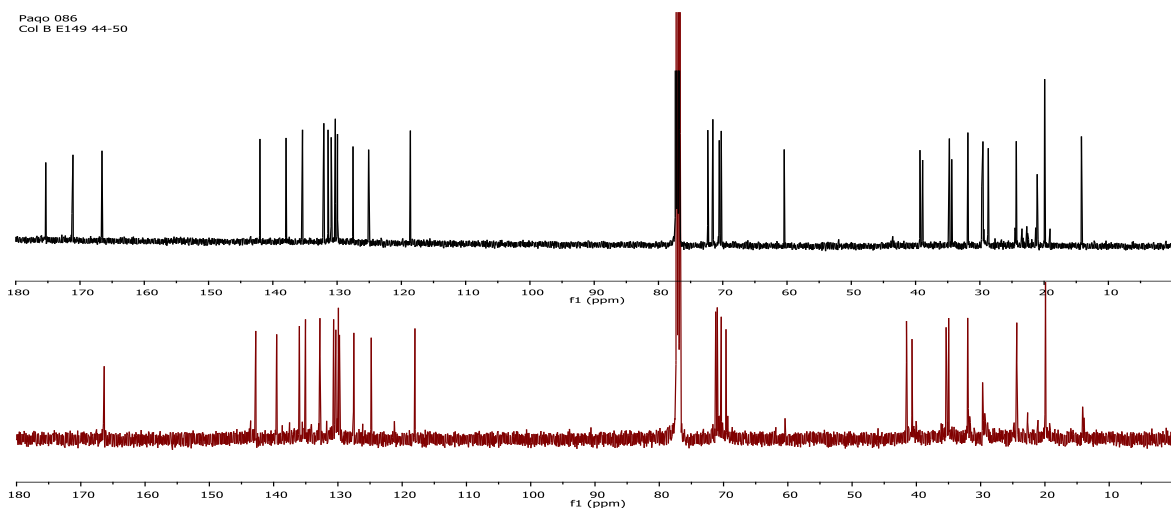


Figura 34. Comparación de espectros de RMN de ^{13}C de los compuestos **1** y **2**.

Comparando las señales de los compuestos **1** (parte superior) y **2** (parte inferior), se observa que para el compuesto **2** desaparecen cuatro señales: C4' (175.5 ppm), C1' (174.2 ppm); que corresponden a los grupos carbonilos del succinil; también las señales C3' (29.6 ppm), C2' (28.8 ppm) que de igual manera corresponden a los -CH₂- del succinil. Las señales restantes permanecen con cambios mínimos.

Para una correcta correlación entre los hidrógenos y los carbonos del compuesto **2** se obtuvo el espectro HSQC, como se observa en la Figura 35.

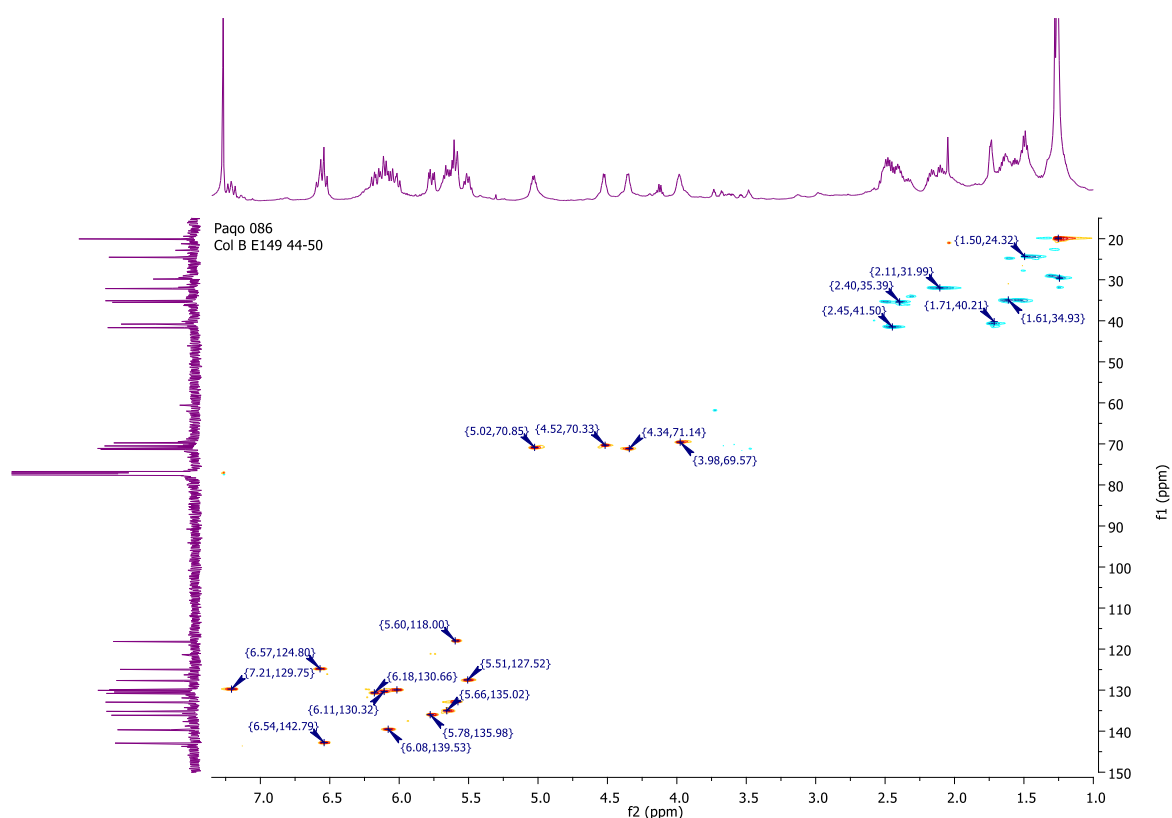


Figura 35. Espectro HSQC del compuesto **2**

Con el espectro HSQC no hay duda del desplazamiento del H7 que se correlaciona con el C7 y de la falta de algunos carbonos del compuesto **1**. Se puede empezar a ver que el compuesto **2** es una macrolactina sin el sustituyente del succinilo en el C7. Para tener toda la caracterización completa se realizó el experimento DEPT 135 del compuesto **2**, como se observa en la Figura 36.

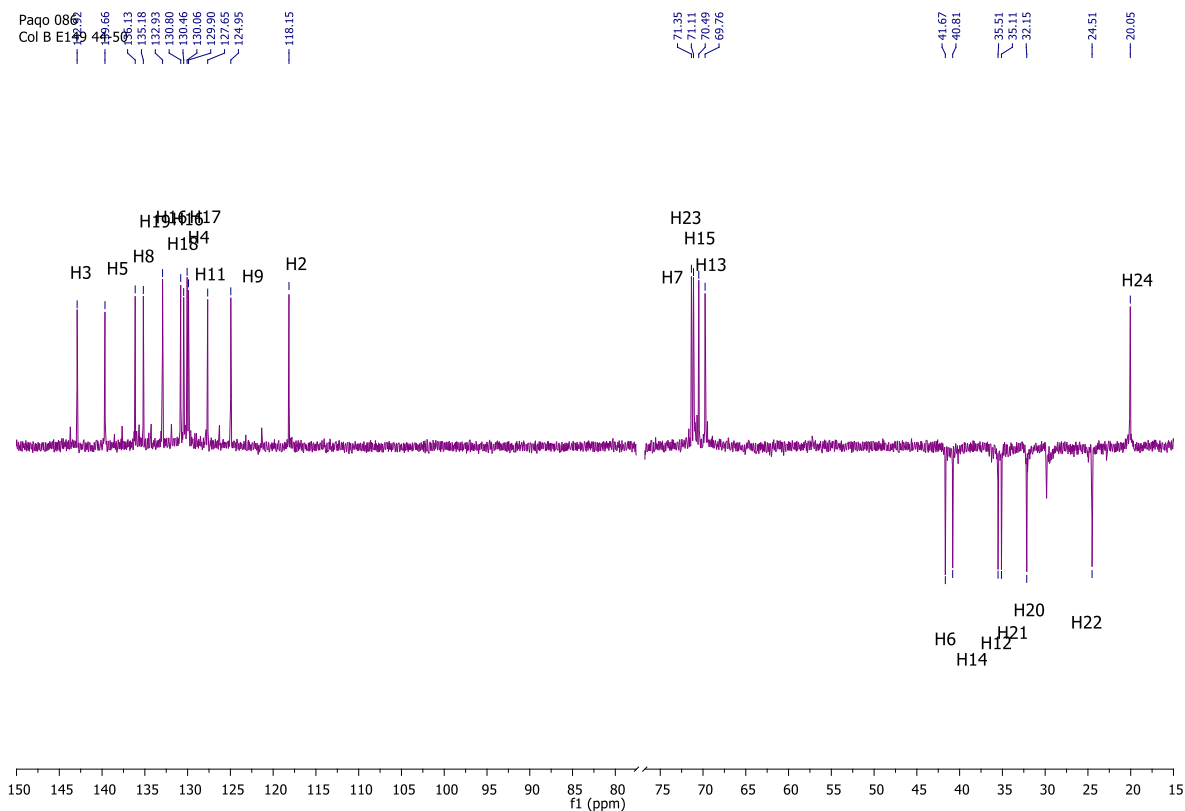


Figura 36. Espectro DEPT 135 del compuesto **2**

En el espectro DEPT 135 señales hacia arriba son CH_3 y CH mientras que para señales hacia abajo son CH_2 y en la siguiente tabla 10 se resumen los datos espectroscópicos de los espectros anteriormente analizados del compuesto **2**.

Tabla 10. Resumen de las señales de los espectros.

Correlación		Tipo de carbono
^1H ppm	^{13}C ppm	DEPT 135
-	166.5	-
6.54	142.9	CH
6.11	139.7	CH
5.78	136.1	CH
5.66	135.1	CH
5.63	132.9	CH
6.04	130.8	CH
6.14	130.5	CH

6.17	130.1	CH
7.23	129.9	CH
5.51	127.7	CH
6.60	124.9	CH
5.60	118.2	CH
4.36	71.4	CH
5.03	71.1	CH
4.53	70.5	CH
3.98	69.8	CH
2.48	41.7	CH ₂
1.73	40.8	CH ₂
2.50, 2.40	35.5	CH ₂
1.64, 1.55	35.1	CH ₂
2.16	32.1	CH ₂
1.56	24.5	CH ₂
1.27	20.0	CH ₃

Con la información y el análisis de los espectros de RMN 1D y 2D se propone una posible estructura para el compuesto **2**, tal y como se muestra en la figura 37.

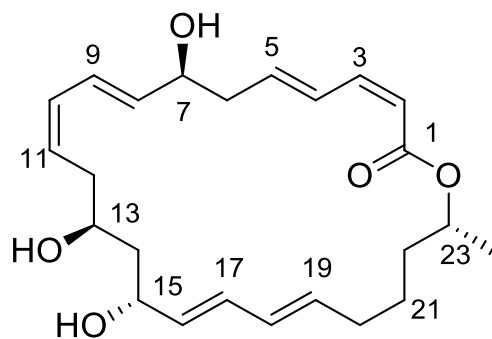


Figura 37. Estructura propuesta para el compuesto **2**, Macrolactina A.

La estructura coincide con la reportada en la literatura la cual es la macrolactina A y se le asigna la misma configuración del 7-O-succinil macrolactina A, ya que en la naturaleza se encuentra siempre el mismo isómero y no mezcla de ellos.

1.3.4 Pruebas biológicas de las dos macrolactinas

Las macrolactinas, entre ellas la 7-O-succinil macrolactina A **1** y macrolactina A **2**, exhiben actividades biológicas importantes y las más destacadas y reportadas son la actividad antibacterial. [20,22] Sin embargo, no hay trabajos reportados acerca de su posible actividad antifúngica.

La agricultura es una de las fuentes más importantes para sostener la economía global y el sistema ambiental y social. Debido al incremento de la población mundial ha ocurrido un incremento en la demanda de los cultivos y por lo tanto el rendimiento de éstos deberían de ser mejorados. Desafortunadamente, las plagas y enfermedades provocan pérdidas mundiales en la agricultura. Esto ha llevado por años al uso de pesticidas químicos para controlar las plagas y aumentar el rendimiento de los cultivos; sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado daños al ambiente y a la salud humana. Por ello hay un deseo mundial para reducir el uso de pesticidas químicos y la investigación ha sido encaminada para tratar los patógenos de las plantas de una manera más natural, por medio de los biopesticidas que son productos naturales aislados de microorganismos que actúan contra las plagas y mejoran el crecimiento y rendimiento de los cultivos. [28]

Los fitopatógenos son hongos que afectan a las plantas provocándoles enfermedades que arruinan cultivos enteros devastándolos y produciendo pérdidas económicas a nivel mundial. Por ello la investigación está siendo enfocada al descubrimiento de nuevos compuestos antifúngicos de origen natural. [29] En este contexto *Bacillus amyloliquefaciens* es una especie que como ya se ha mostrado produce compuestos con importantes actividades biológicas.

Las macrolactinas como ya se ha mencionado han sido reportadas como antibacteriales pero no hay estudios acerca de su actividad antifúngica. Por lo que con la inquietud de estudiar la actividad antifúngica de los dos compuestos se realizó el estudio de actividad de ambos compuestos en diferentes hongos patógenos contra plantas, como son: *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Moniliophthora roreri* y *Rhizoctonia sp.*

Por lo que los compuestos 7-O-succinil macrolactina A **1** y macrolactina A **2** se probaron en una concentración de 1 mg/mL contra los hongos fitopatógenos y se midió el porcentaje de inhibición a las 48 h de crecimiento, como se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentaje de inhibición de los compuestos 7-O-succinil macrolactina A **1** y macrolactina A **2** contra los fitopatógenos

Hongo fitopatógeno	7-O-succinil macrolactina A	Macrolactina A
<i>A. niger</i>	52	0
<i>A. alternata</i>	31	17
<i>Fusarium sp</i>	74	30
<i>F. oxysporum</i>	44	32
<i>F. proliferatum</i>	44	18
<i>M. royeri</i>	40	0
<i>Rhizoctonia sp</i>	75	65

Lo que destaca de estos resultados es que ambos compuestos tienen fuerte actividad contra la mayoría de los hongos probados, siendo *Fusarium sp* y *Rhizoctonia sp.* dos de los hongos más afectados; sin embargo, como se observa en la Tabla 11 el compuesto 7-O-succinil macrolactina A es mucho más activo que la macrolactina A. Es decir, la presencia del grupo succinilo en el C7 parece ser importante para una mayor actividad mostrando por primera vez una relación estructura/actividad.

En la siguiente Figura 38 se muestra la inhibición del compuesto 7-O-succinil macrolactina A contra *Fusarium sp.*

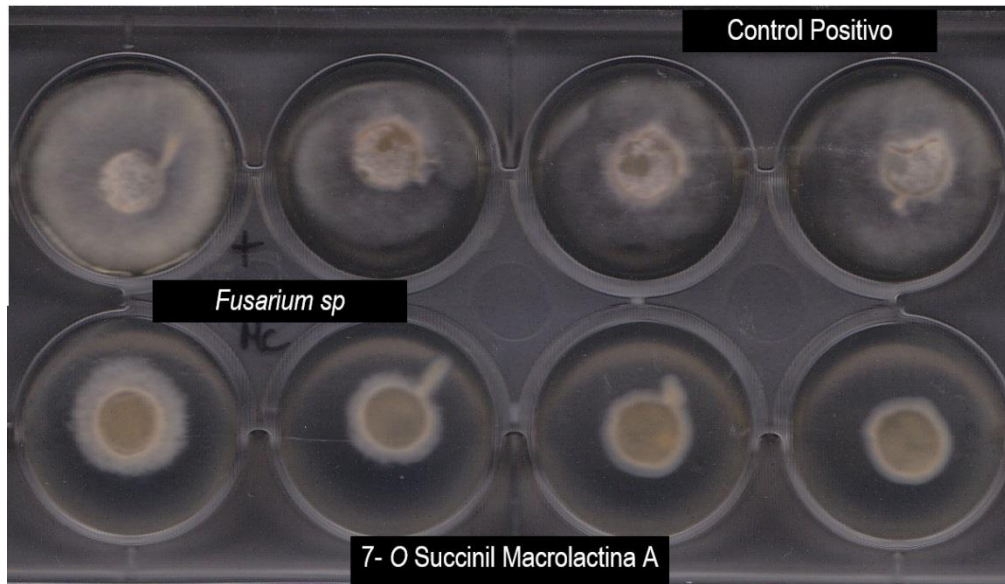


Figura 38. Inhibición de 7-O-succinil macrolactina A frente a *Fusarium sp.*

En la parte superior de la imagen se observa el control positivo el cual es el hongo *Fusarium sp.* libre sin el compuesto, mientras que en la parte inferior de la imagen se encuentra el hongo fitopatógeno en presencia del compuesto 7-O-succinil macrolactina A. Se observa una clara inhibición del hongo en presencia del compuesto mostrado por una disminución del crecimiento del hongo (74% de inhibición) en comparación con el hongo libre de compuesto.

En la siguiente Figura 39 se muestra la inhibición del compuesto 7-O-succinil macrolactina A contra *Rhizoctonia sp.*

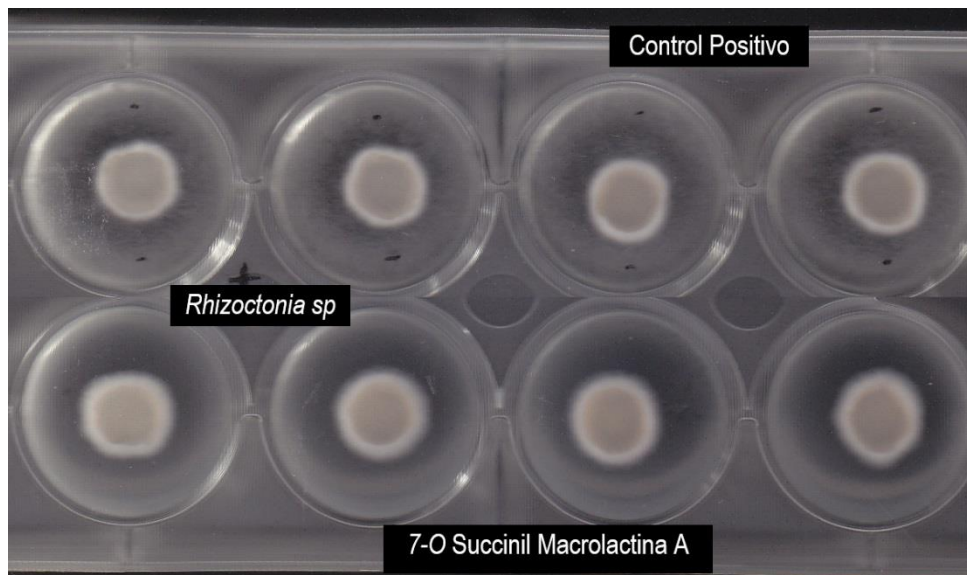


Figura 39. Inhibición de 7-O-succinil macrolactina A frente a *Rhizoctonia sp.*

Al igual que en el caso anterior el compuesto 7-O-succinil macrolactina A logró inhibir el crecimiento de *Rhizoctonia sp* en un 75% puesto que en el control positivo hay un crecimiento claro con el micelio extendido hasta los puntos marcados en negro mientras que donde se encuentra el compuesto hay un escaso crecimiento.

En la siguiente Figura 39 se muestra la inhibición (40%) que provoca el compuesto 7-O-succinil macrolactina A sobre el crecimiento de *M. royeri*.

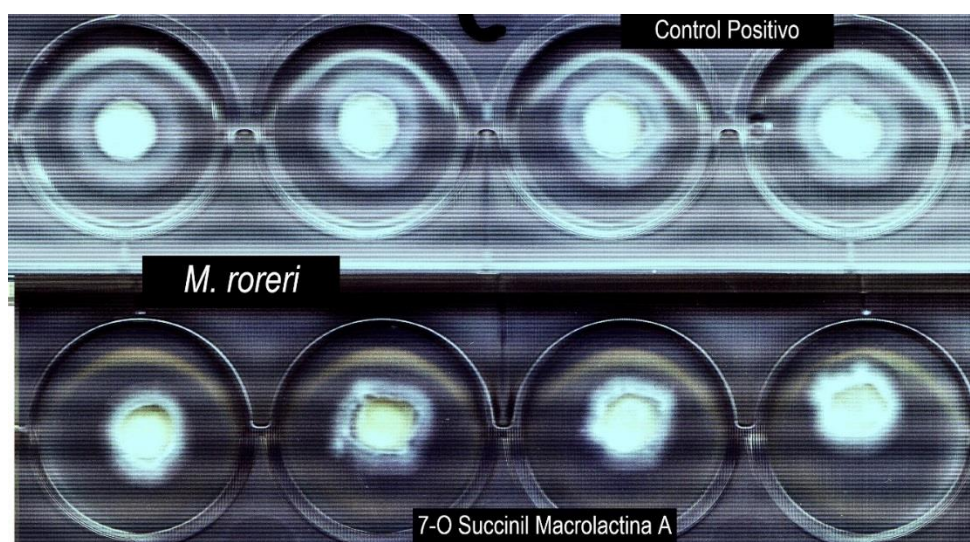


Figura 40. Inhibición de 7-O-succinil macrolactina A frente a *M. royeri*.

Respecto al compuesto Macrolactina A, como se mostró anteriormente en la Tabla 11, tuvo una inhibición del crecimiento en todos los hongos fitopatógenos menor; sin embargo, el porcentaje de inhibición contra el hongo fitopatógeno *Rhizoctonia* fue bastante significativo (65%), como se muestra en la Figura 41. Se observa el crecimiento del fitopatógeno en el control positivo en donde el micelio es de tipo blanco-transparente (marcado con dos puntos negros) mientras que para el fitopatógeno con el compuesto macrolactina A se observa claramente el crecimiento delimitado del hongo.

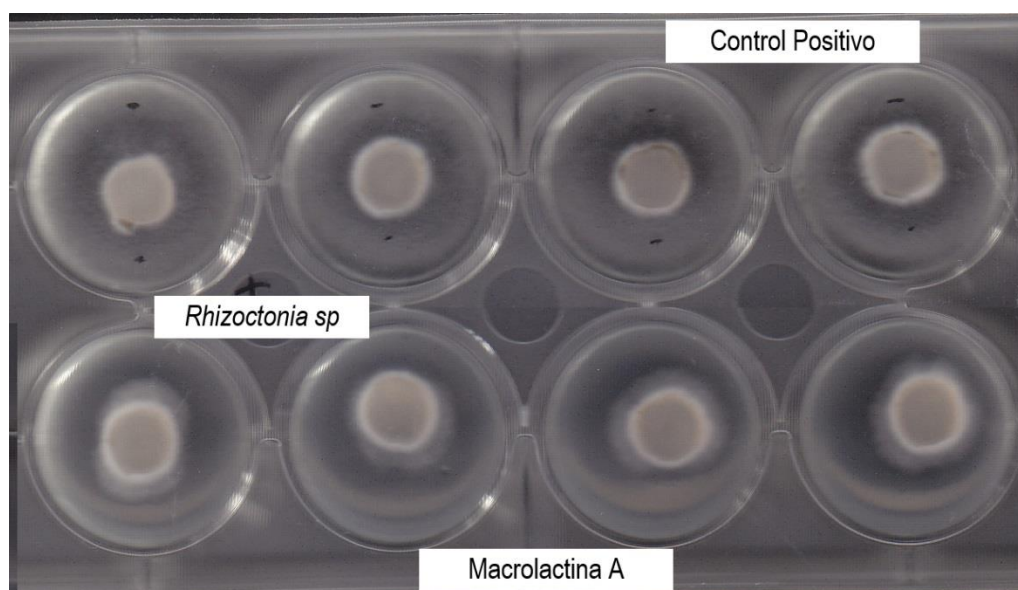


Figura 41. Inhibición de macrolactina A frente a *Rhizoctonia* sp.

Los resultados obtenidos son prometedores, ya que es la primera vez que se observa una inhibición tan significativa de los compuestos de macrolactina contra hongos fitopatógenos tan importantes que causan daños severos en cultivos de gran importancia agrícola.

Es por ello, que se decidió complementar estos resultados con un estudio bajo microscopía del daño celular causado en los hongos fitopatógenos por el compuesto que más inhibición generaba, es decir, 7-O-succinil macrolactina A. Para ello se seleccionaron dos de los hongos que más daño generan a los cultivos agrícolas como son *F. oxysporum* y *M. roleri*.

F. oxysporum es una extensa familia de hongos que se presenta principalmente como saprófitos o patógenos especializados y que atacan todo tipo de cultivos de hortalizas como son tomate, pimientos, coliflor, brócoli, entre otros. Aquí en México un cultivo de gran importancia económica por su exportación a nivel mundial es el cultivo del Agave que se ve dañado seriamente por este hongo. [30]

Por su parte *M. roleri* causa enfermedad en la planta de cacao (*Theobroma cacao*, fuente del chocolate). Síntomas externos como pequeñas partes oscuras en la superficie de las mazorcas pueden ser vistas después de 40 a 80 días de infección. México es gran productor de cacao a nivel Latinoamérica por lo que un daño severo en sus cultivos produce pérdidas económicas muy serias. [31]

En la siguiente Figura 42 se observa el daño celular bajo microscopía causado por el compuesto 7-O-succinil macrolactina A contra el hongo *F. oxysporum*.

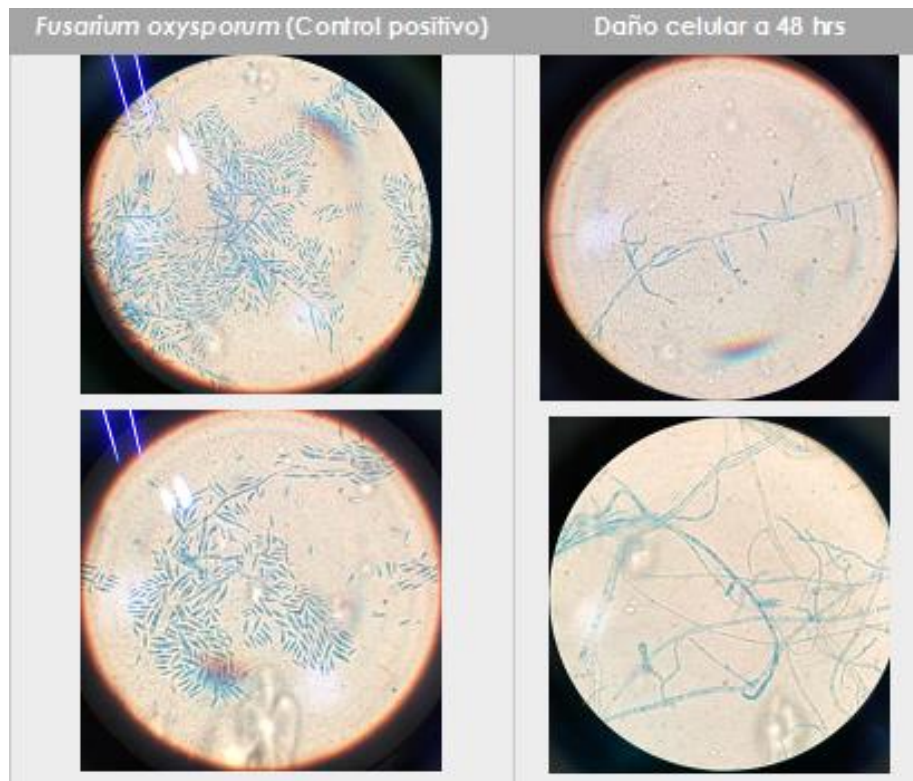


Figura 42. Observación del daño celular a microscopía 100x de *F. oxysporum* frente al compuesto 7-O-succinil macrolactina A.

En la parte izquierda de la imagen se muestra la imagen microscópica del hongo fitopatógeno sin ningún agente que impida su crecimiento. En esta parte se observan las hifas septadas sin ningún tipo de malformación, así como un gran número de esporas pequeñas, uniformes y curvadas. En la parte derecha se muestra el hongo en presencia del compuesto 7-O-succinil macrolactina A, en donde se observa un escaso número de esporas y un notable enrollamiento de las hifas sin septos definidos, lo cual es indicativo de un daño celular que impide un desarrollo del crecimiento puesto que al tener estructuras defectuosas es incapaz de tomar los nutrientes del medio de cultivo y seguir desarrollándose.

En la siguiente Figura 43 se observa el daño celular bajo microscopía causado por el compuesto 7-O-succinil macrolactina A contra el hongo *M. roleri*.

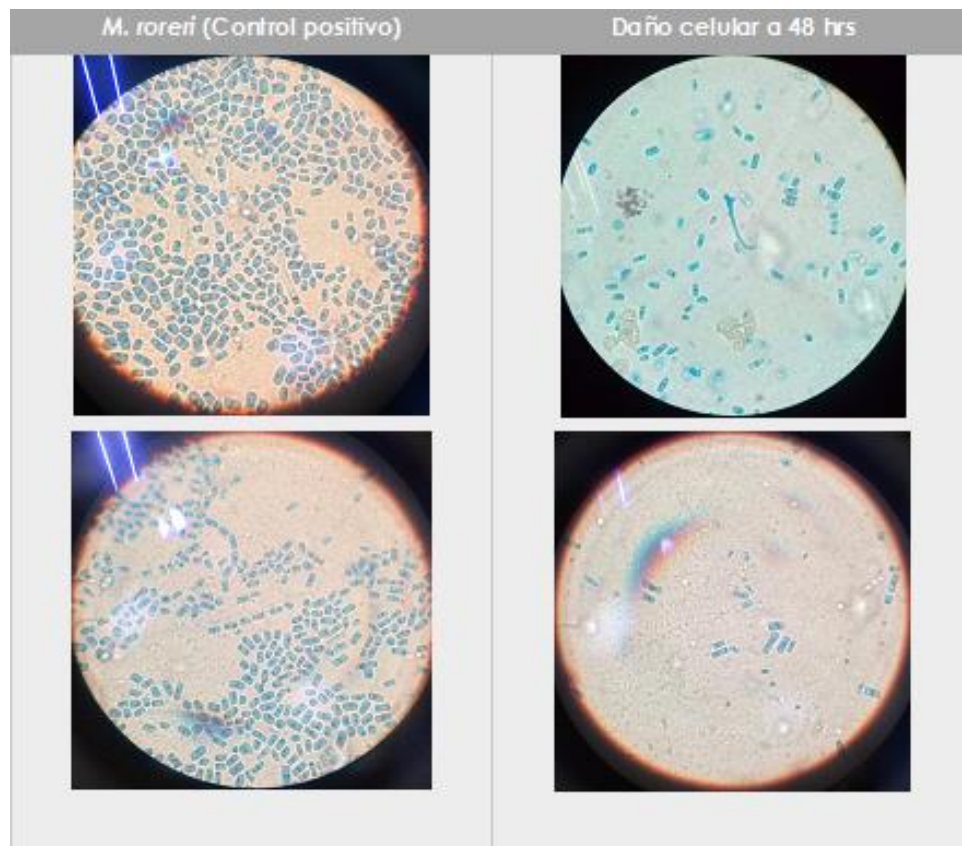
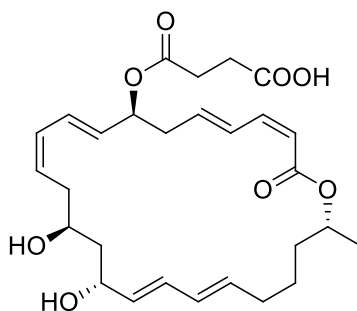


Figura 43. Observación del daño celular a microscopía 100x de *M. roleri* frente al compuesto 7-O-succinil macrolactina A.

En la parte izquierda de la figura 43 se muestra el hongo con las esporas bien diferenciadas en cadena con forma globosa o elipsoide y con hifas septadas. En la parte derecha se muestra el hongo en presencia del compuesto con muy pocas esporas y con hifas delgadas rizoides y mal teñidas. El cambio morfológico es claro en ambos hongos.

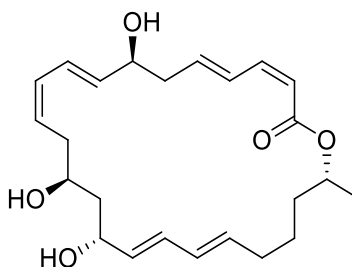
1.4 Conclusiones

- Se obtuvo el extracto crudo (800 mg/L) de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* ELI 149 mediante la matriz amberlita y se le realizó un fraccionamiento general, cuyas fracciones fueron probadas contra bacterias y hongos.
- En la fracción 8, la cual mostraba actividad bactericida, pudieron identificarse dos compuestos de tipo bacteriocinas.
- Las bacteriocinas identificadas tienen una masa molecular de 2.6 KDa y 4.1 KDa y ambas poseen diferente actividad, pero con una alta tolerancia a temperaturas elevadas (60 – 90 °C) y rango de pH (2 – 10).
- En la fracción 7, la cual mostraba actividad antifúngica, se lograron identificar dos compuestos más de tipo lipopéptidos por medio de espectrometría de masas, identificándolos como homólogos de surfactina y fengicina.
- La fengicina mostró la mayor parte de la actividad antifúngica mientras que la surfactina solo cristalizó y aumenta ligeramente la actividad antifúngica en modo sinergismo con la fengicina. Se observó el daño a nivel celular producido por ambos compuestos en los hongos fitopatógenos probados.
- La fracción 6 se sometió a columnas de purificación y se logró identificar un compuesto llamado 7-O-succinil macrolactina A.



7-O-succinil macrolactina A

- Para comprobar si un cambio de medio pudiera tener efecto en la obtención de estas macrolactinas se probaron otros dos medios LB y Tris G. Siendo el segundo medio con el que se logró identificar un segundo compuesto llamado macrolactina A.



Macrolactina A

- Ambos compuestos se probaron contra hongos fitopatógenos el compuesto 7-O-succinil macrolactina A tuvo mayor efecto que la macrolactina A contra la mayoría de los hongos probados, pudiendo suponer que el grupo succinilo en la posición C7 era un grupo importante para aumentar su efecto inhibitorio, probando por primera vez la relación estructura/actividad.
- Además, por primera vez quedó probada la actividad antifúngica de estos compuestos.
- Debido a la importancia de evitar el ataque de los hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas de alto interés económico, se realizó un estudio microscópico del daño celular del compuesto 7-O-succinil macrolactina A ($C_{28}H_{38}O_8$) contra dos hongos fitopatógenos importantísimos como son *Fusarium oxysporum* y *Moniliophthora roreri*.
- Se demostró un importante daño celular ocasionado por el compuesto 7-O-succinil macrolactina A corroborando la importancia que tienen estos compuestos en el ataque de estos hongos.
- Producto de estos trabajos se obtuvieron dos publicaciones.

1.5 Desarrollo Experimental

1.5.1 Materiales y Métodos

De una colección de cepas aisladas previamente en el laboratorio de tierras de diferente estado de la república, se eligió una cepa con capacidad de inhibir bacterias de interés médico (*E. coli*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *St aureus*, etc.) identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* ELI 149.

Los medios de cultivo utilizados fueron:

- TSB (caldo de tripticaseína de soya) el cual está conformado por:

17.0 g Peptona de Caseína

3.0 g Peptona de Soya

2.5 g Dextrosa

5.0 g Cloruro de sodio

2.5 g Fosfato dipotásico

78

Estos ingredientes se disuelven en 1 litro de agua destilada y se coloca en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL depositando en cada uno de ellos 250 mL de caldo de cultivo. Pasado esto se procede a la esterilización en autoclave bajo las condiciones de: 20 min, 15 libras a 120 °C. Concluido este proceso se deja enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 0.5 g de la resina Amberlita® XAD-16 por cada 100 mL de cultivo.

- Medio de cultivo LB

10 g Peptona de caseína

5 g Extracto de levadura

5 g Cloruro de sodio

16 g Agar

Estos ingredientes se disuelven en 1 litro de agua destilada y se coloca en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL depositando en cada uno de ellos 250 mL de caldo

de cultivo. Pasado esto se procedió a la esterilización en autoclave bajo las condiciones de: 20 min, 15 libras a 120 °C. Pasado este proceso se deja enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 0.5g de la resina Amberlita® XAD-16 por cada 100 mL de cultivo.

- Medio de cultivo Tris G

Solución CaCl ₂	0.8%		
Solución (NH ₄) ₂ SO ₄	20%		
Solución Glucosa	20%		
2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol (Tris) 1M pH 7.5			1M
Extracto de levadura	2g		
K ₂ HPO ₄	5%		
Solución sales	10 mL		
Sol. Sales (para 100 mL)		0.025 gr de	FeSO ₄
		0.05 gr de	CuSO ₄
		0.05 gr de	ZnSO ₄
		0.5 gr de	MnSO ₄
		2 gr de	MgSO ₄

Estos ingredientes se disuelven en 1 litro de agua destilada y se coloca en 4 matraces Erlenmeyer de 500 mL depositando en cada uno de ellos 250 mL de caldo de cultivo. Agotado esto se procede a la esterilización en autoclave bajo las condiciones de: 20 min, 15 libras a 120 °C. Terminado este proceso se deja enfriar a temperatura ambiente y se adicionan 0.5g de la resina Amberlita® XAD-16 por cada 100 mL de cultivo.

1.5.2 Crecimiento de la cepa *Bacillus amyloliquefaciens* ELI 149

La cepa se crece primeramente en una placa de medio sólido LB (Luria Bertani), durante 24 horas, se observa su morfología macroscópica y se revisa que permaneciera sin ninguna contaminación por alguna bacteria u hongo con ayuda de un microscopio. Posteriormente se procede a inocularla en el cultivo de TSB en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar y mechero bunsen). Una vez inoculado el cultivo se procede a incubar en una estufa a 29 °C y con una agitación orbital de 175 rpm durante 7 días.

Pasado el tiempo de incubación se procedió a realizar una decantación simple, con el fin de obtener solamente la resina en el fondo del matraz y retirar el sobrenadante.

1.5.3 Extracción de compuestos naturales mediante la resina Amberlita® XAD-16

La resina se coloca en un vaso de precipitados, se adiciona metanol (20 mL) y se deja en agitación por 15 min (este proceso se realiza tres veces) obteniendo un extracto líquido metanólico que posteriormente se procede a centrifugar 10 min a 600 rpm para separar de restos celulares. Una vez centrifugado se filtra con membranas de 25 micras para así retirar esporas y tener un extracto estéril. Por último, se seca a temperatura ambiente hasta obtener un extracto sólido.

1.5.4 Fraccionamiento del extracto crudo de la cepa *B. amyloliquefaciens* ELI 149

Al extracto seco se le realiza una cromatografía en columna usando gel de sílice como soporte y sistemas de elución óptimos para la obtención de los diferentes compuestos de interés, (eluyentes; AcOEt:MeOH 2%, AcOEt 100%, DCM: Acetona y Acetona:Metanol).

1.5.5 Electroforesis en gel SDS-PAGE para proteínas

Las bacteriocinas fueron analizadas por medio de un gel en electroforesis SDS-PAGE. Las muestras de bacteriocinas y los marcadores moleculares se aplicaron por duplicado en geles de poliacrilamida al 12% usando un tampón de Tris-glicina y fueron sometidos a un voltaje de 90V mediante los protocolos establecidos. [32] La mitad del gel fue teñida con azul de coomassie y la otra mitad fue revelada

utilizando las cepas indicadoras de *S. choleraesuis* y *V. cholerae*. Para ello la mitad de gel se fija con una solución acuosa de 40% etanol y 10% de ácido acético durante 30 minutos y posteriormente fue lavado con agua por dos horas. Después el gel fue colocado en una placa de LB y cubierto por una capa de medio de LB suave (0.8% de agar), inoculada con la cepa indicadora y se dejó incubar durante 24 horas a 30 °C.

1.5.6 Evaluación de la estabilidad de las bacteriocinas bajo diferentes pH, temperaturas y compuestos químicos

Para analizar su termoestabilidad, las muestras de bacteriocinas fueron expuestas a diferentes temperaturas en un rango de 60-100 °C durante 15 minutos y a 121 °C con presión de 15 psi durante 15 minutos. La evaluación a diferentes pHs fue realizada de acuerdo con lo reportado en la literatura [12]. Las alícuotas fueron ajustadas a pH de 2, 4, 6, 8 y 10 con HCl 4M o NaOH 4M. Los químicos fueron adicionados a las bacteriocinas y fueron incubados por una hora a temperatura ambiente antes de probar su actividad antimicrobiana. Después de los tratamientos las muestras fueron probadas contra *Vibrio cholerae* como cepa indicadora.

1.5.7 Pruebas Biológicas o Bioensayos

Para realizar este tipo de pruebas se utilizó el método de "antibiograma" que es una prueba microbiológica para determinar la susceptibilidad (sensibilidad o resistencia) de un microorganismo (bacteria u hongo) a un compuesto o grupo de compuestos con actividad antibiótica o antimicrobiana. Se considera antimicrobiano o antibacteriano a cualquier sustancia con capacidad de matar o al menos inhibir el crecimiento de bacterias.

Para el antibiograma con bacterias se prepararon cultivos en tubos cerrados estériles de 15 mL con una suspensión de bacterias a testar, que fueron gram-positivas y gram-negativas (*Staphylococcus aureus*, *Saphylococcus saprophyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *S. agalactiae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Klebsiella* sp, *Shigella*, *E. coli*, *Pseudomonas* sp, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Vibrio cholerae*) con 5 mL de cultivo líquido LB.

Estos se incubaron a 29 °C por 24 h. Posteriormente se tomaron 100 µL de cada tubo con la bacteria en suspensión y se esparcieron en placas de medio de cultivo sólido en condiciones de esterilidad.

En forma paralela se impregnaron discos de papel filtro de aproximadamente 0.5 cm de diámetro previamente esterilizados con los compuestos a probar u extractos que fueron colocados con pinzas estériles en las correspondientes placas del medio de cultivo sólido donde se encontraba esparcida la bacteria a testar. En cada placa también se colocaron dos discos más; control positivo (antibiótico) y negativo (agua estéril). Estas placas se incubaron a 20 °C por 24 h. Transcurrido el tiempo se observó el crecimiento en cada placa y se midió el halo de inhibición provocado por el compuesto impregnado en el disco.

Para el antibiograma con hongos se realizó el siguiente procedimiento: en condiciones de esterilidad (mechero bunsen) se tomó con un asa micológica parte del micelio aéreo del hongo, el cual fue crecido previamente en una placa con medio PDA (agar papa dextrosa) durante 7 días, depositándolo en 1 mL de cultivo líquido LB contenido en un tubo estéril y se procedió a agitar por 1 minuto, en seguida se deja en reposo por 15 min. Se realizó una observación microscópica para observar esporas del hongo. Posteriormente se tomó una alícuota de 100 µL de la parte media con el fin de sólo tomar esporas en suspensión y se colocaron en placas de medio sólido (PDA), se esparcieron y en seguida se realizó el procedimiento de los discos impregnados con los compuestos. Se colocó un control positivo (miconazol) y control negativo (agua estéril), se incubaron por 48 h y pasado el tiempo se midió el halo de inhibición que tuvieron los compuestos impregnados en los discos.

El colocar un control positivo tanto para bacterias y hongos es para tener un punto de referencia de la inhibición que podría tener un compuesto nuevo frente a uno comercial contra un microorganismo de interés médico.

Para los bioensayos de las macrolactinas se utilizaron microplacas de 12 pocillos de poliestireno comercialmente esterilizadas. En las cuales se colocaron 35 µL de una solución stock (1.4 mg en 35 µL de etanol) de los compuestos macrolactinas

disueltos en 1365 μL de PDA para cuatro pocillos a testar (300 μL cada uno para hacerlo por cuatuplicado). Se cortaron discos de 5 mm de diámetro del hongo fitopatígeno fresco de 5 días de incubación. Estas microplacas se incuban en una estufa estacionaria a 29 °C por 48 hrs al cabo de las cuales se realiza un escaneo con ayuda del equipo CanoScan LiDE200 y para el procesamiento de medidas se realiza con el programa ImageJ 1.51k. El porcentaje de inhibición (%) de cada compuesto a las 48 hrs se calcula con la siguiente ecuación.

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left[\left(\frac{D_0 - D_x}{D_0} \right) \times 100 \right]$$

Donde: D_0 = diámetro del hongo control, D_x = diámetro del hongo en presencia del compuesto.

1.5.8 Observación del daño celular

Se tomaron 10 μL de una solución de 1 mg/mL de la 7-O succinil- macrolactina A para depositar en un disco de papel de 5 mm de diámetro, por otro lado, en un tubo Falcón se colocan 6 mL de medio líquido LB y con ayuda de un asa micrológica se colocan las estructuras fúngicas del hongo y se procede a agitar con el fin de obtener únicamente las esporas. Se toman 100 μL de esta suspensión y se depositan en una placa de medio PDA y con ayuda de un hisopo estéril se realiza el esparcimiento masivo en toda la placa. Una vez lista esta placa se coloca el disco impregnado con el compuesto a testar y se incuba durante 48 h a 29 °C en estufa estacionaria. Así mismo se realiza un control positivo en el cual se realiza todo igual, pero en lugar del compuesto a testar se coloca etanol. Al finalizar el tiempo se procede en condiciones de esterilidad a leer la placa incubada. Por otro lado, en un portaobjetos se deposita una gota en colorante azul de lactofenol y con ayuda de una cinta adhesiva nueva y transparente se procede a recortar sólo una sección de aproximadamente 2 cm. Esta sección se coloca con mucho cuidado sobre el halo de inhibición que presente el disco con el compuesto a testar con el fin de adherir a la cinta las estructuras del halo de inhibición. Posteriormente se coloca esta cinta en la gota de lactofenol y se coloca encima el cubreobjetos, para realizar la observación mediante microscopia de contraste de fases. Se enfoca a 40x y posteriormente para una mejor observación del daño se cambia a

100x. El mismo procedimiento se realiza para el control positivo y tener una comparativa del mismo fitopatógeno.

1.5.9 Espectroscopias y parte química

Se utilizaron cromato-placas comerciales del gel de sílice 60, para revelar con una lámpara ultravioleta o cámara con vapores de yodo. La purificación de productos mediante cromatografía en columna se realizó empleando gel de sílice Macherey-Nagel 60 como fase estacionaria y mezclas de disolventes destilados en proporciones adecuadas como eluyentes.

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se determinaron en espectrómetros Varian 300 MHz y Bruker 500 MHz, utilizando agua deuterada (D_2O) y cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de los desplazamientos químicos se encuentran en partes por millón (ppm) respecto al TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

Los espectros de masas se realizaron por impacto electrónico (EI) y por FAB, con ayuda del equipo Jeol JMS-700.

1.6 Referencias

- [1] Handelsman J, Rondon MR, Brady SF, Clardy J, Goodman RM. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology*. **1998**, 5: 245-249.
- [2] Challis GL. Mining microbial genomes for new natural products and biosynthetic pathways. *Microbiology*, **2008**, 154: 1555-1569.
- [3] Hou Y, Braun DR, Michel CR, Klassen JL, Adnani N, Wyche TP, Bugni TS. Microbial Strain Prioritization using metabolomics tools for the discovery of natural products. *Analytical chemistry*. **2012**, 84, 4277-4283.
- [4] Jarvis BB. *Secondary metabolites and their role in evolution*. *An Acad Bras Cienc*. **1995**, 67: 329-345.
- [5] Harvey AL. *Natural products in drug discovery*, *Drug discovery today*, **2018**, 13: 894 – 901.
- [6] Ruiz B, Chávez A, Forero A, García-Huante Y, Romero A, Sánchez M, Rocha D, Sánchez B, Rodríguez-Sanoja R, Sanchez S, Langley E. Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*. **2010**, 36: 146-167.
- [7] Sansinenea E. *Bacillus thuringiensis* biotechnology, Springer Netherlands, **2012**.
- [8] Sansinenea E, Ortiz A. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*. **2011**, 33:1523 – 1538.
- [9] Ortiz A, Sansinenea E. Chemical compounds produced by *Bacillus* sp. Factories and their role in nature. *Mini reviews in medicinal chemistry*, **2019**, 19: 373-380.
- [10] Cotter PD, Ross RP, Hill C. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, **2013**, 11: 95-105.
- [11] Yang S-C, Lin C-H, Sung CT, Fang J-Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in microbiology*, **2014**, 5: 1-10.

- [12] Bizani D, Brandelli A. Characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus* sp. strain 8A. *J Appl Microbiol*, **2002**; 93:512–9.
- [13] Hathout Y, Ho Y-P, Ryzhov V, Demirev P, Fenselau C. Kurstakin: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *J. Nat. Prod.* **2000**, 63:1492–1496.
- [14] Rea MC, Sit CS, Clayton E, O'Connor PM, Whittal RM, Zheng J, Vederas JC, Ross RP, Hill C. Thuricin CD, a post-translationally modified bacteriocin with a narrow spectrum of activity against *Clostridium difficile*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2010**, 107: 9352–9357
- [15] Liu Q, Gao G, Xu H, Qiao M. Identification of the bacteriocin subtilosin A and loss of *purL* results in its high-level production in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Res. Microbiol.*, **2012**, 163: 470-478.
- [16] Halimi B, Dortu C, Arguelles-Arias A, Thonart P, Joris B, Fickers P. Antilisterial Activity on Poultry Meat of Amylolysin, a Bacteriocin from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1. *Probiotics Antimicro*, **2010**, 2:120–125.
- [17] Ayed HB, Maalej H, Hmidet N, Nasri M. Isolation and biochemical characterisation of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *J. Glob. Antimicrob. Resis*, **2015**, 3: 255–261.
- [18] Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Rajoka MSR, Yang H, Jin M. Biological Activity of Lipopeptides From *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2017**, 101: 5551-5960.
- [19] Robinson JA. Polyketide synthase complexes: their structure and function in antibiotic biosynthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **1991**, 332: 107-114.
- [20] Ortiz A, Sansinenea E. Macrolactin antibiotics: amazing natural products. *Mini reviews in Medicinal chemistry*, **2020**, 20: 584-600.
- [21] Gustafson K, Roman M, Fenical W. The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111: 7519–7524.

[22] Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, Lünsdorf H, Häußler S, Santosa DA, Timmis KN, Molinari G. 7-OMalonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis*-active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, 50: 1701–1709.

[23] Schneider K, Chen X, Vater J, Franke P, Nicholson G, Borriss R, Süßmuth R. Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the pks2 cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70: 1417-1423.

[24a] Mukaiyama, T. Kobayashi. S. *Org. React.* **1994**, 1, 46-70

[24b] González Á, Aiguadé J, Urpi F, Vilarrasa J. Asymmetric acetate aldol reactions in connection with an enantioselective total synthesis of macrolactin A. *Tetrahedron Lett*, **1996**, 37: 8949-8952.

[25] Kim Y, Singer RA, Carreira EM. Total Synthesis of Macrolactin A with Versatile Catalytic, Enantioselective Dienolate Aldol Addition Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed*, **1998**, 37: 1261-1263.

[26] Sansinenea E, Vaca J, Rojas NE, Vázquez C. A wide spectrum of antibacterial activity of secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* EL1149. *Bioscience journal*, **2020**, 36: 235-244.

[27] Sansinenea E, Salazar F, Jiménez J, Mendoza Á, Ortiz A. Diketopiperazines derivatives isolated from *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus endophyticus*, establishment of their configuration by X-ray and their synthesis. *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57: 2604-2607.

[28] Sansinenea E. **2019**, *Bacillus* spp.: as plant-growth promoting bacteria, In: Secondary metabolites of plant growth-promoting rhizomicroorganisms (Eds H.B. Singh, C. Keswani, MS. Reddy, E. Sansinenea, C. Garcia-Estrada) Springer-Nature https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_11.

[29] Keswani C, Singh HB, Hermosa R, García-Estrada C, Caradus J, He Y-W, Mezaache-Aichour S, Glare TR, Borriss R, Vinale F, Sansinenea E. Antimicrobial

secondary metabolites from agriculturally important fungi as next biocontrol agents. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2019**,103: 9287-9303.

[30] Ávila-Miranda ME, López-Zazueta JG, Arias-Castro C, Rodríguez-Mendiola MA, Guzmán de Peña DA, Vera-Núñez JA, Peña-Cabriales JJ. Vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* in agave (*Agave tequilana* Weber var. azul). *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, **2010**, 12: 166-180.

[31] Cuervo-Parra JA, Sanchez-Lopez V, Ramirez-Suero M, Ramirez-Lepe M. Morphological and Molecular Characterization of *Moniliophthora roreri* Causal Agent of Frosty Pod Rot of Cocoa Tree in Tabasco, Mexico. *Plant Pathology Journal*, **2011**, 10: 122-127.

[32] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, 227:680–685.

2.1 Antecedentes: Hongo endófito "*Fusarium sp*"

Petrini en 1991 describió el término "Endófito"; mencionando que es un término topográfico que abarca o incluye a todos los organismos que viven en los tejidos vegetales. Estudios extensivos sobre la biología y fisiología de los hongos endófitos del césped han arrojado evidencias acerca de los efectos benéficos del endófito hacia el hospedero, por lo que varios autores consideran al término endófito como un sinónimo de "mutualismo". [33]

En general, este término se aplica a los hongos capaces de ocupar asintomáticamente el tejido vegetal aparentemente saludable, en un sentido más amplio, los hongos endófitos son hongos que colonizan tejidos de plantas sin causar efectos negativos de inmediato. Esta definición incluye un amplio espectro de interacciones simbióticas en las cuales las plantas con hongos participan: parasitismo, comensalismo y mutualismo. La palabra "endófito" ha sido usada para hacer referencia a una simbiosis no patogénica. Algunos de los hongos comúnmente reportados como endófitos son considerados secundariamente como patógenos por algunos daños en el ambiente forestal. Esto debido a que comúnmente se encuentran en los tejidos saludables y enfermos por lo que es difícil separar a los endófitos de los patógenos facultativos y de los patógenos latentes. Durante los últimos 20 años reportes a cerca de los hospederos de los hongos endófitos han demostrado que la colonización endofítica de las plantas terrestres es ubicua. [34] Estos hongos endófitos son microorganismos que colonizan los espacios intercelulares de los tejidos vegetales, (Figura 44) pero que no tienen efectos patógenos sobre su huésped en ningún momento de su desarrollo. En el beneficio de esta asociación la planta protege y proporciona nutrientes al endófito para que éste complete su ciclo de vida y por otro lado el endófito produce fitohormonas que aumentan el desarrollo de la planta huésped y productos naturales que juegan un papel importante en su defensa. [35]



Figura 44. Observación de la colonización de hongos endófitos en estructuras vegetales

Fusarium es un género de hongo muy interesante que comprende muchas especies. La mayoría de las especies son patógenicas para las plantas, es decir causan enfermedades muy importantes en varias cosechas como ya se ha comentado anteriormente. Sin embargo, también existen especies de este hongo que no son patógenicas, las cuales pueden colonizar tejidos de las plantas como un hongo endófito. [36] Los hongos endófitos del género *Fusarium* invaden tejidos internos de la planta sin causar ningún daño y también pueden colonizar las raíces ya que se pueden encontrar en la rizosfera que es la parte del suelo que rodea las raíces de las plantas. [36] Diferentes especies endófitas de *Fusarium* podrían ser eficientemente utilizadas para el manejo de plagas y fitopatógenos reduciendo la infección por nemátodos, bacterias y hongos. [37] Por lo que *Fusarium* se puede usar como agente de biocontrol cuyos productos naturales se utilizan para el control de patógenos y plagas.

2.1.1 Productos naturales de origen fúngico

Como se ha comentado anteriormente los productos naturales microbianos representan un recurso enorme de estructuras químicas únicas y en gran parte sin descubrir, estas estructuras han sido optimizadas por la misma evolución ya que se producen para la comunicación y en respuesta a los cambios en sus hábitats, incluido el estrés ambiental. Por lo tanto, existe el potencial de obtener productos naturales novedosos y/o biológicamente relevantes de organismos que viven en estrecha asociación entre sí, como los microorganismos asociados a plantas como los ya mencionados endófitos. Esto es evidente a partir de la caracterización de más de 400 productos naturales hasta la fecha aislados a partir de 128

microorganismos asociados a plantas, de las cuales la mayoría de estos compuestos tienen estructuras novedosas y/o actividades biológicas útiles. [38] Estos productos naturales se sintetizan a través de diversas vías metabólicas en las cuales se mencionan principalmente las siguientes: ruta de los policétidos, isoprenoide y aminoácidos. Los metabolitos aislados poseen diversas estructuras de tipo, esteroides, xantonas, fenoles, isocumarinas, derivados del perileno, quinonas, furandiones, terpenoides, depsipéptidos (enniáticas) y citocalasinas (Figura 45). [39]

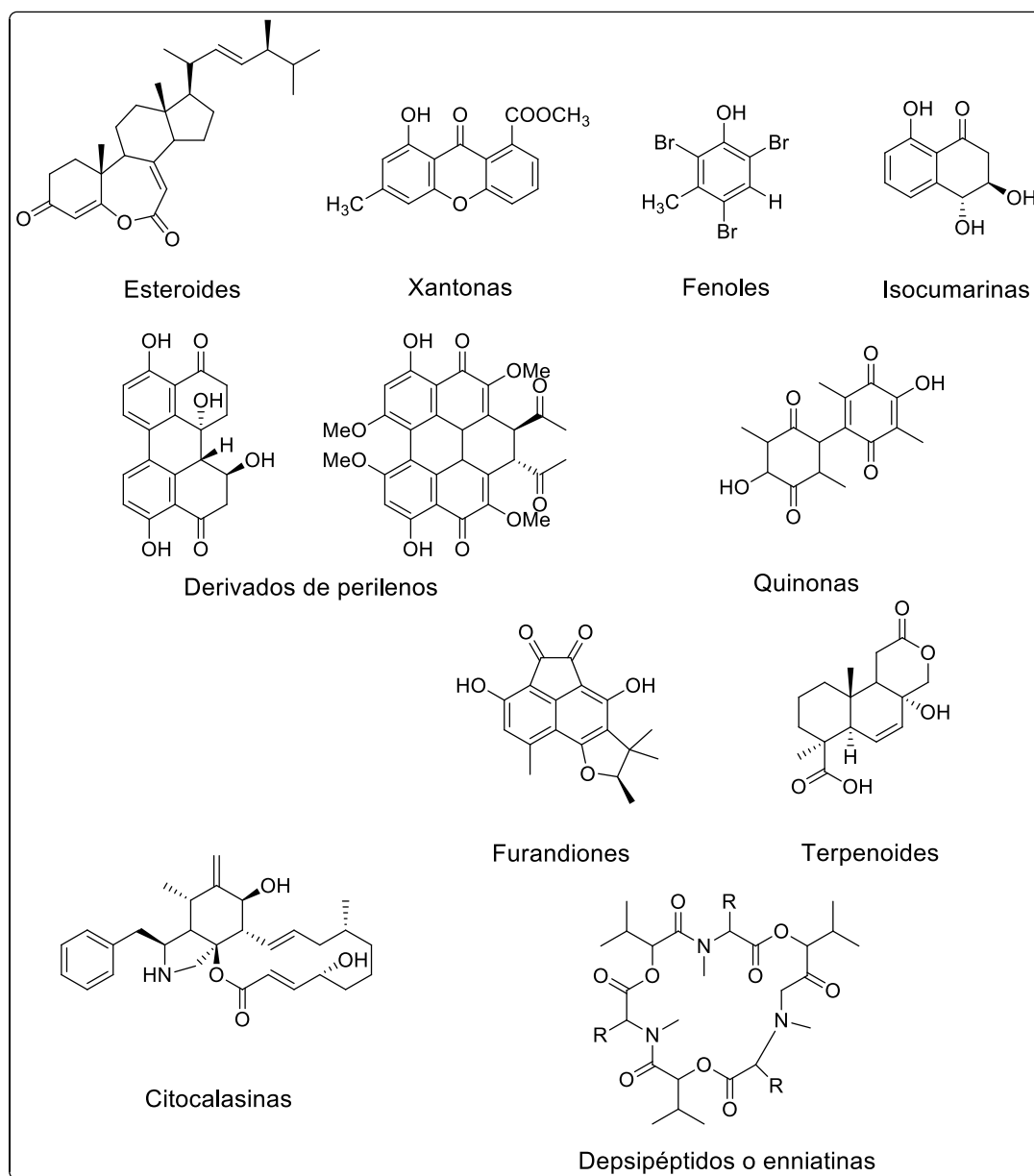


Figura 45. Diversidad estructural de productos naturales aislados de hongos endófitos

Se puede observar de la figura anterior que los hongos endófitos suponen una fuente de productos naturales muy interesante para su aplicación como bio-plaguicidas fúngicos en la agricultura. Varios compuestos que muestran actividad pesticida se han aislado y caracterizado a partir de algunos microorganismos. A continuación, se revisarán algunos ejemplos de compuestos aislados estos hongos.

Dentro de los alcaloides fungicidas aislados de hongos endofíticos, se puede mencionar un ácido tetramérico análogo de la criptocina, aislado del cultivo del hongo endofítico *Cryptosporiopsis quercina*, presente en la corteza interna del tallo de la planta *Tripterygium*. [40] También se han aislado derivados del indol como el ácido 6-isoprenilindol-3-carboxílico, el cual se aisló del endófito *Colletotrichum sp* y que tiene la propiedad de inhibir el crecimiento contra hongos fitopatógenos como *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia cerealis* y *Gaeumannomyces graminis* (Figura 46).

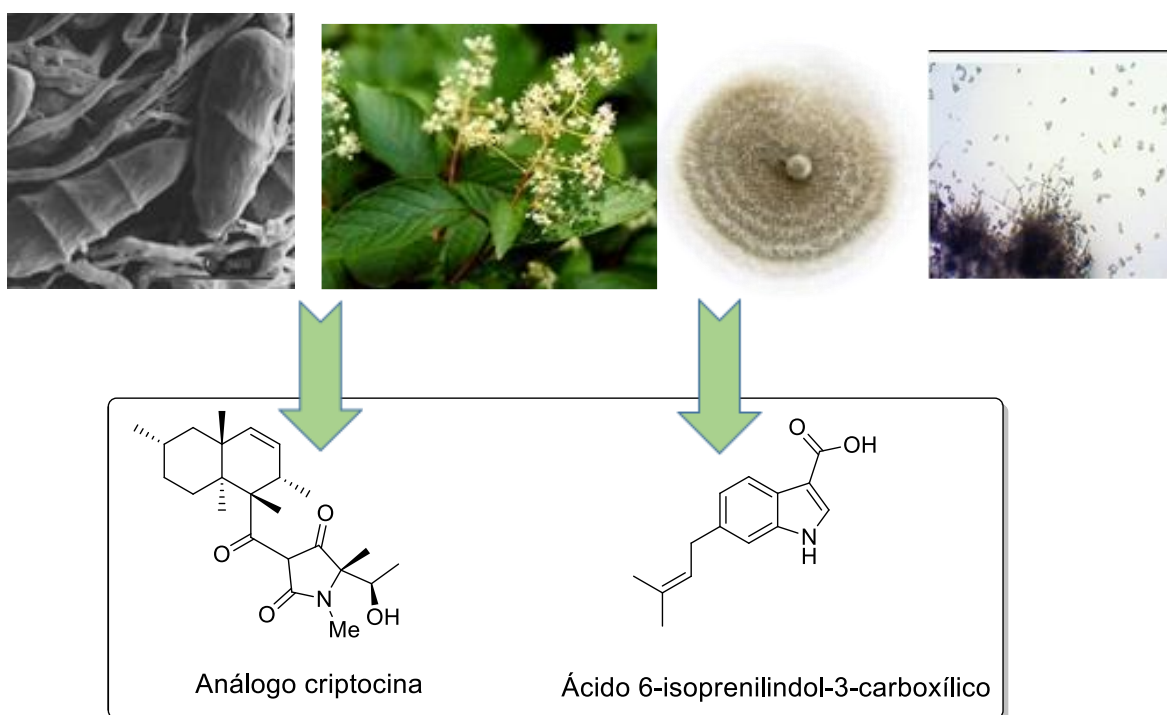


Figura 46. Ejemplos de fungicidas tipo alcaloides de origen fúngico

Entre los terpenoides obtenidos del endófito *Epichloe typhina* aislado de *Phleum pratense* se han encontrado sesquiterpenos que son fungitóxicos para el hongo patógeno *Cladosporium phlei* causante de la mancha foliar (Figura 47). [41]

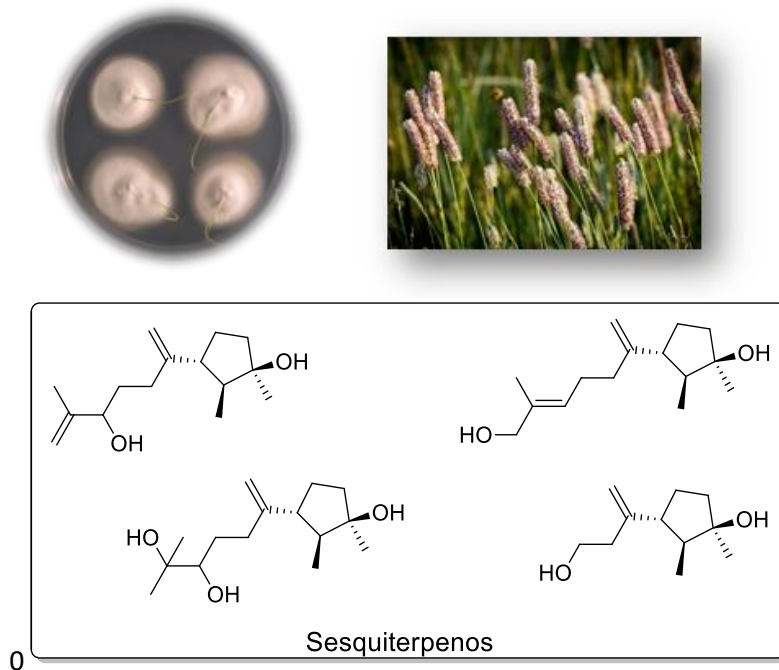


Figura 47. Compuestos tipo sesquiterpenos aislados de *Epichloe typhina*

Los compuestos de tipo esteroide se han aislado también de un cultivo líquido de *Collectotrichum sp*, endófito de la planta *Artemisia annua*. Han mostrado tener actividad antifúngica contra los patógenos *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia cerealis*, *Helminthosporium sativum ativum* y *Gaeumannomyces graminis* (Figura 48). [41]

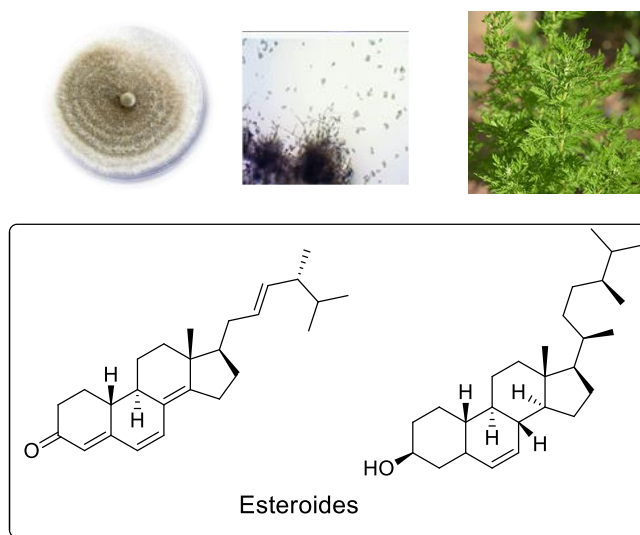


Figura 48. Compuestos de tipo esteroide aislados del endófito *Collectotrichum sp*

Dentro de los compuestos de tipo isocumarinas se encuentra la melleína, que fue aislada del endófito *Pezicula sp.* y que se ha descrito como un potente fungicida, herbicida y algicida. Un análogo la 7-hidroximelleína fue aislado del endófito *Penicillium sp.* de la planta *Alibertia macrophylla*, este metabolito también es activo frente a hongos fitopatógenos (Figura 49). [41]

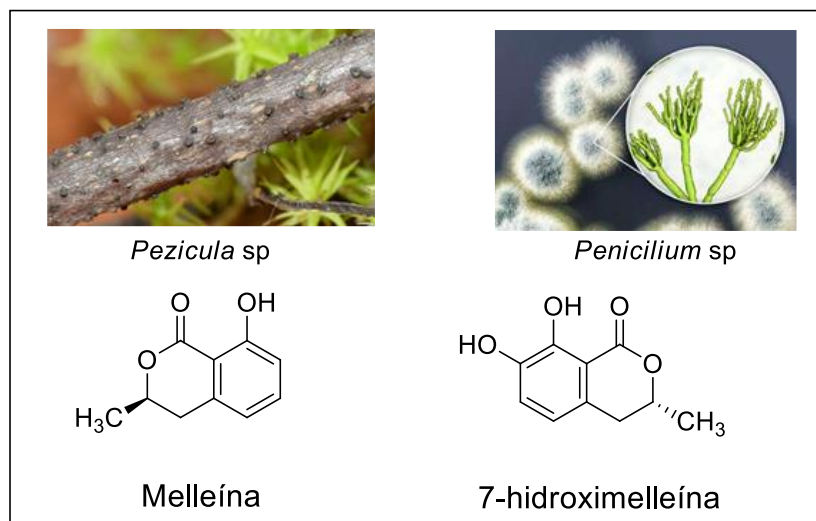


Figura 49. Compuestos de tipo isocumarinas aisladas de endófitos

Un compuesto de tipo cromona es la fonsecinona A que es un metabolito antifúngico aislado del hongo *Aspergillus niger* endófito de la planta *Cynodon dactylon* (Figura 50). [41]

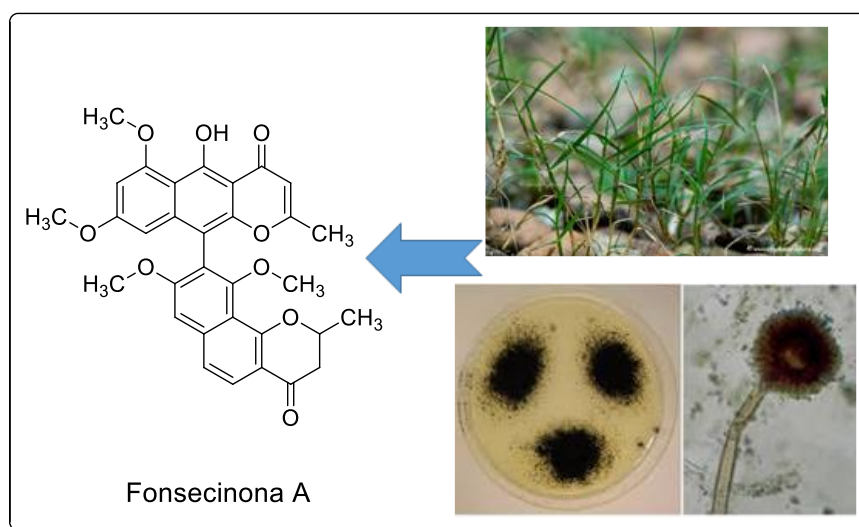


Figura 50. Compuesto tipo cromona "fonsecinona A" aislada de *Aspergillus niger*

De entre los múltiples ejemplos que se pueden encontrar en los compuestos fenólicos antimicóticos aislados de hongos endófitos, uno de ellos es el ácido colletórico, que fue aislado del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, endófito de *Artemisia mongolica* que fue muy activo frente al hongo fitopatógeno *Helminthosporium savitum* (Figura 51). [41]

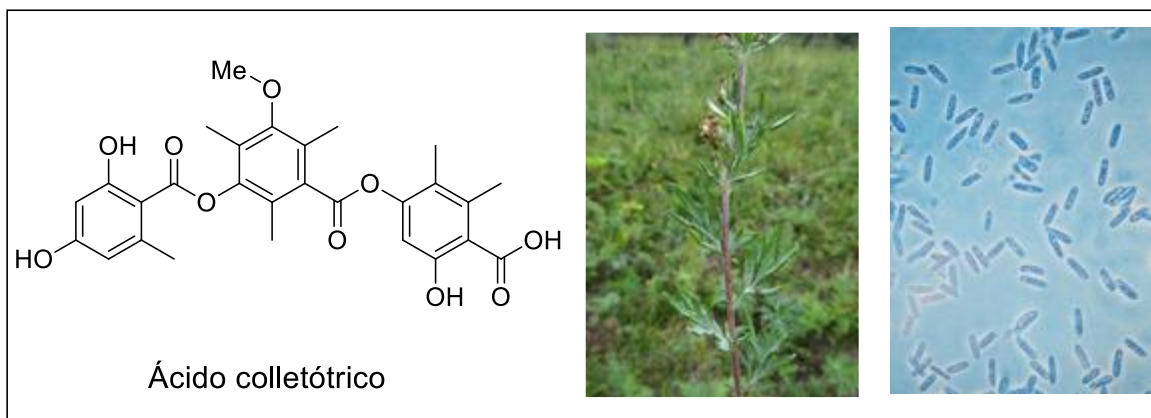


Figura 51. Compuesto tipo éster fenólico Ácido colletórico

Fusarium también produce productos naturales y en las especies no patogénicas produce compuestos que no se encuentran en las cepas patógenas. La especie *F. semitectum* produce dos α -pironas, fusapirona y desoxifusapirona, las cuales inhibieron el crecimiento de muchos hongos filamentosos [42]. También de otras cuatro especies de *Fusarium* como son *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides* se aislaron varios compuestos como son beauvericina, ciclosporinas, enniatinas, equisetina, ácido fusárico, integracida A, y trichosetina, la mayoría actúan como micotoxinas y sólo la última es antibacterial. [43]

Por lo que en este capítulo II se expone la búsqueda de investigar hongos endófitos de la planta *Mentha rotundifolia* con la capacidad de ser potenciales productores de productos naturales con actividad antifúngica, de los cuales sólo una cepa será la elegida para la producción a gran escala y la búsqueda, extracción, purificación y elucidación de los compuestos responsables de la actividad antifúngica.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo General

Estudiar el potencial biotecnológico de 13 cepas de hongos endófitos, aislados de *Mentha rotundifolia* y evaluar su actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos como son, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*.

2.2.2 Objetivos específicos

- Seleccionar de manera biodirigida especies endofíticas productoras de compuestos de interés para el control de hongos fitopatógenos.
- Producir biotecnológicamente su fermentación optimizada en mayor escala de hongos endófitos seleccionados.
- Aislar de manera biodirigida e identificar los compuestos activos por medio de técnicas cromatográficas y espectroscopía de RMN.
- Evaluar la actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos.

2.3 Discusión de Resultados

2.3.1 Obtención de microextractos

Se trabajó con una colección disponible en el grupo de investigación de Bioplaguicidas: Biotecnología y Química de Productos Naturales del Instituto de Productos Naturales y Agrobiología (IPNA-CSIC) la cual fue previamente aislada de la especie vegetal *Mentha rotundifolia*. Esta colección está integrada por trece cepas de hongos endófitos de diferentes estructuras de la planta (raíz, tallo, hojas, etc.). A cada cepa se le asignó la letra "T" junto con un número consecutivo de 1-13 respectivamente.

Los hongos fitopatógenos diana, los cuales son especies plaga de importancia económica que generan enormes pérdidas en la agricultura a nivel mundial, son: *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*. Estas cepas diana son mantenidas en medio de cultivo PDA en un ambiente controlado (27 °C) y oscuridad.

97

De cada cepa de la colección T se obtuvo un microextracto con el disolvente acetato de etilo con un rendimiento variable. (Figura 52) En la siguiente tabla 12 se muestran los pesos de los extractos obtenidos de cada cepa.



Figura 52. Microextractos de la colección T

Tabla 12. Rendimiento de cada cepa de los respectivos microextractos

Clave microextracto	Peso (mg/mL)
T1	181.7
T2	165.2
T3	120.2
T4	233.9
T5	94.9
T6	379.1
T7	170.5
T8	177.8
T9	124.4
T10	116.4
T11	121.3
T12	352.1
T13	490.4

Analizando la tabla anterior se puede observar que el peso de los extractos en cada cepa es diferente indicando que la presencia de productos naturales es variable y depende de género y especie.

2.3.2 Estudio de la actividad antifúngica de los microextractos

Para poder identificar qué cepa es la que tiene mayor actividad antifúngica, y por lo tanto, compuestos químicos que tengan actividad antifúngica, se procede a realizar bioensayos de inhibición de crecimiento fúngico de tres hongos fitopatógenos como son *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*, con cada microextracto utilizando tres concentraciones de 1 mg/mL, 0.5 mg/mL y 0.1 mg/mL de cada microextracto. Al cabo de tres días de incubación se procedió a un escaneo para realizar la medición del diámetro de crecimiento de las colonias y así determinar si los extractos fueron activos contra cada diana (Figura 53).

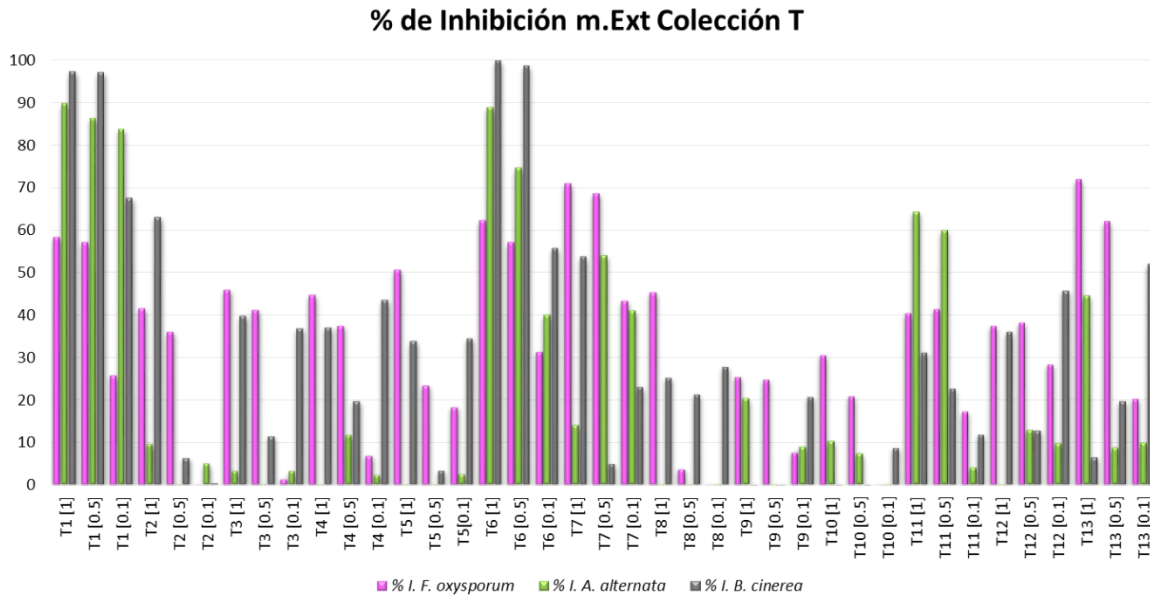


Figura 53. Gráfico del porcentaje de inhibición de las cepas de la colección T

En la figura 53 se observa la evaluación de los diferentes microextractos a las tres concentraciones y contra los tres hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*. El microextracto de la cepa T1 es muy activo frente a *B. cinérea* a las dos primeras concentraciones con un valor de 97 % de inhibición; sin embargo, cuando se evaluó la tercera concentración el valor descendió a 67 %. Por otro lado, en el extracto de T1 probado contra *Alternaria alternata* se observa que a las tres concentraciones mantiene su inhibición en un rango de 83 – 89 % y algo menor frente a *Fusarium oxysporum* con un valor del 60 %. Las dos siguientes cepas candidatas a estudio son T6 y T7, ya que se observa que el extracto T6 puede inhibir a *Botrytis cinerea* y *Alternaria alternata* con valores similares a las de T1. Sin embargo, cuando se evalúa el extracto de T7 en la tercera concentración (0.1 mg/mL) baja drásticamente la actividad antifúngica, aunque tiene la capacidad de inhibir a *Fusarium oxysporum* en porcentajes altos.

Con la inquietud de conocer la complejidad de cada extracto, se realizó una cromatografía en placa fina (TLC) de cada microextracto con una fase móvil de hexano con acetato de etilo 1:1 (Figura 54).

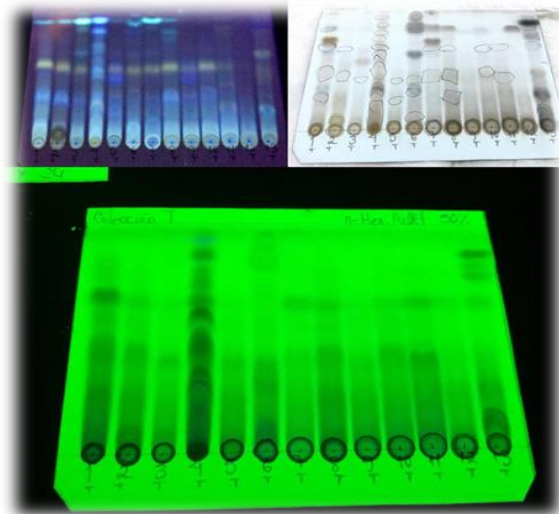


Figura 54. CCF a diferentes longitudes de onda de luz UV (verde 254 nm, azul 354nm) y revelada con óleum

De los resultados de actividad antifúngica de los extractos se decide trabajar con los tres extractos más prometedores como son T1, T6 y T7. Una teoría que se detalla en los productos naturales es que los compuestos químicos pueden secretarse o no, e incluso optimizar su rendimiento dependiendo del medio de cultivo utilizado, por lo cual se diseñó un experimento que consistía en modificar el medio de cultivo con el fin de poder mejorar la producción de metabolitos y en consecuencia la optimización de la actividad antifúngica. El medio de cultivo seleccionado para el crecimiento del hongo era el medio Czapek (detallado en la parte experimental) y se realizaron modificaciones en los componentes de este medio como se detalla en la Tabla 13.

Tabla 13. Modificación del medio de cultivo Czapek en cuatro condiciones diferentes

Reactivos del Medio Czapek	1ª Condición (estándar)	2ª Condición	3ª Condición	4ª Condición
	1 L	1 L	1L	1L
NaNO ₃	2 g	2 g	1 g	1 g
Extracto de Levadura	1 g	--	1 g	--
Glucosa	60 g	60 g	40 g	40 g

Con estas nuevas condiciones se procedió a preparar un volumen de 200 mL de cada condición con las tres cepas anteriormente seleccionadas (T1, T6 y T7) con el fin de obtener nuevamente un microextracto de cada cepa. Los resultados del peso de cada microextracto obtenido con cada condición se muestra en la Tabla 14, en donde 1ª. Condición (1aC) son condiciones estándar, sin modificación; 2ª. Condición (2aC) la cual fue no adicionar el extracto de levadura; 3ª. Condición (3aC) dejar intacto el extracto de levadura, reducir a la mitad la fuente de nitrógeno y disminuir en un 33% la cantidad de glucosa y finalmente 4ª. Condición (4aC) no adicionar extracto de levadura, disminuir a la mitad la fuente de nitrógeno al igual que disminuir en un 33% la cantidad de glucosa.

Tabla 14. Rendimiento de las diferentes condiciones de los microextractos T1, T6 y T7

Microextracto	Condición	Rendimiento mg/L
T 1	1ª (1aC)	181.7
	2ª (2aC)	318
	3ª (3aC)	192.5
	4ª (4aC)	280.5
T 6	1ª (1aC)	379.1
	2ª (2aC)	248.5
	3ª (3aC)	170.5
	4ª (4aC)	280.5
T7	1ª (1aC)	170.5
	2ª (2aC)	181.5
	3ª (3aC)	182
	4ª (4aC)	343.5

Con las nuevas modificaciones además de optimizar el rendimiento, se esperaba observar si se mejoraba la actividad antifúngica y por ello con los microextractos obtenidos de las diferentes condiciones se realizaron nuevamente bioensayos contra los mismos tres hongos fitopatógenos (Figura 55).

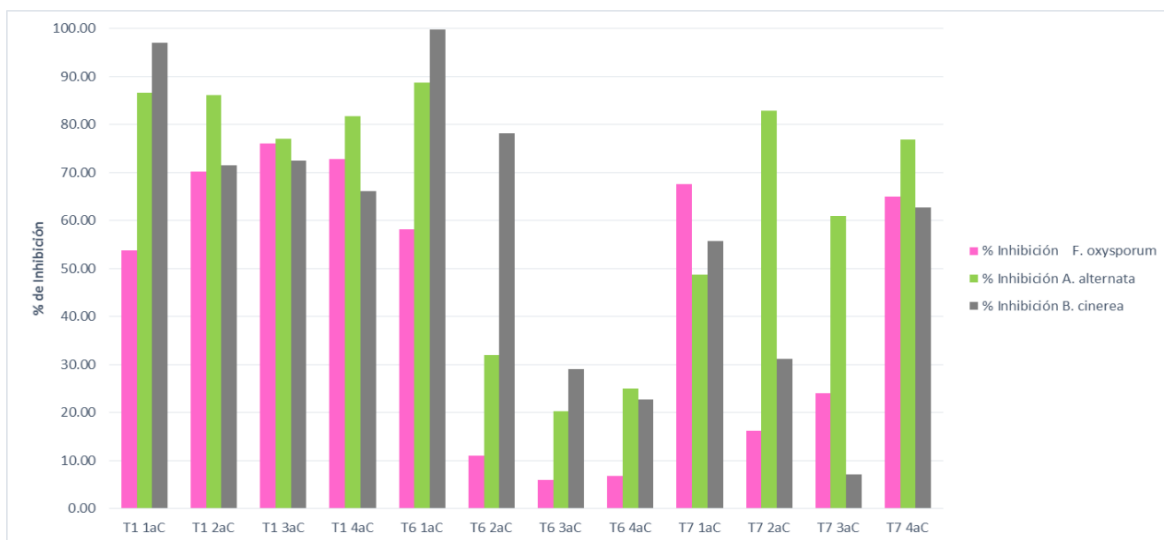


Figura 55. Gráfico del porcentaje de inhibición de las cepas candidatas con las diferentes condiciones de cultivo.

Los resultados que se pueden observar del gráfico anterior son que con la cepa T1 frente a *F. oxysporum*, el disminuir los constituyentes del medio de cultivo tanto la fuente de carbono como la fuente de nitrógeno hacen que se produzcan compuestos los cuales sean más eficaces para la inhibición de este fitopatógeno, mientras que para *A. alternata* no hubo gran diferencia de su actividad puesto que para 1aC y 2aC no variaron los valores, para la 3aC disminuyó ligeramente y 4aC el valor es muy cercano a la condición estándar por lo que se puede mencionar que los compuestos que inhiben el crecimiento de esta diana son productos naturales que se forman de igual forma, aun con la disminución de las fuentes de carbono y nitrógeno. Por otro lado, se observa que para la diana *B. cinerea* si hay una clara diferencia puesto que se observa que la disminución de los componentes de cultivo afecta en la producción de los metabolitos capaces de inhibir a esta diana ya que baja de un 97% a un 72% en porcentaje de inhibición.

Si se observan los datos de la cepa T6, se puede ver que la restricción de los constituyentes en el medio de cultivo disminuye notablemente la producción de los compuestos activos para las tres dianas pudiendo afirmar que la mejor opción es la condición estándar.

Por último, para la cepa T7 se observa que las condiciones en las cuales se suprimió el componente del extracto de levadura (2aC y 4aC) aumentó la actividad antifúngica contra *A. alternata* en un 82% y 76% respectivamente, mientras que para las dianas *B. cinerea* y *F. oxysporum* no hubo resultados prometedores.

Aunado a este estudio, de los extractos obtenidos en las diferentes condiciones, se obtuvieron cromatogramas en los cuales se pueden observar el perfil cromatográfico de cada condición de la cepa T1 (Figura 56).

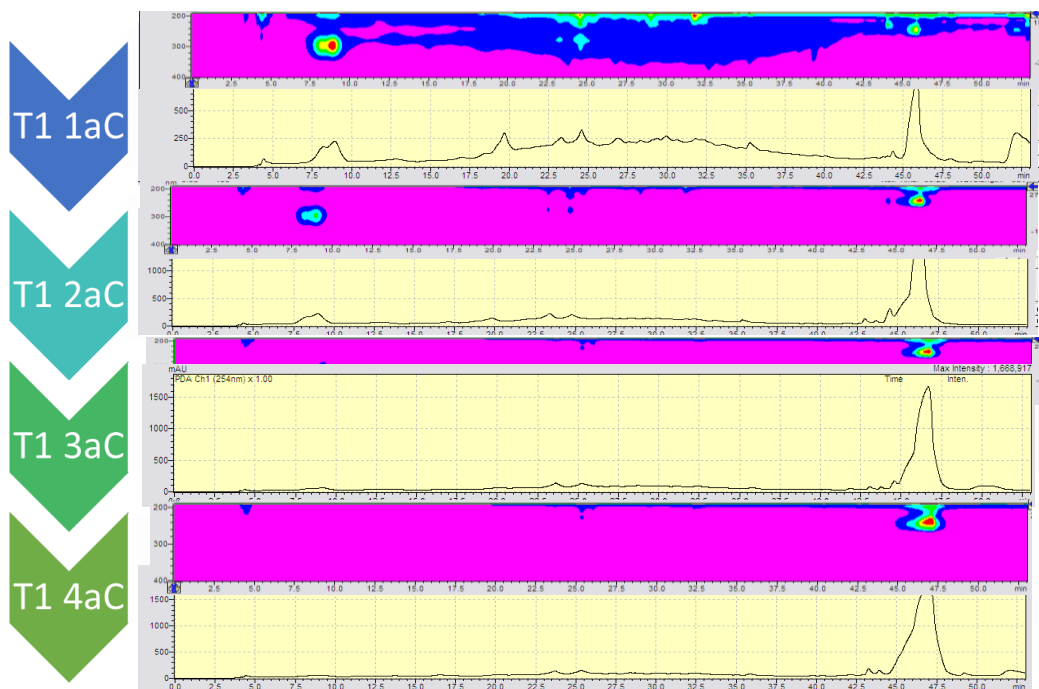


Figura 56. Cromatograma analítico de fase inversa de los microextractos de las diferentes condiciones de cultivo de T1

En la figura 56 se observa que en la condición estándar (T1 1aC) hay una notable presencia de componentes en el extracto respecto a las otras condiciones y podrían explicar las diferencias de actividad observadas entre los extractos, anteriormente analizados en la figura 55.

Así mismo como se realizaron estudios cromatográficos con las condiciones de T1 se realizaron con T6 (Figura 57) y T7 (Figura 58) en el mismo método cromatográfico y equipo.

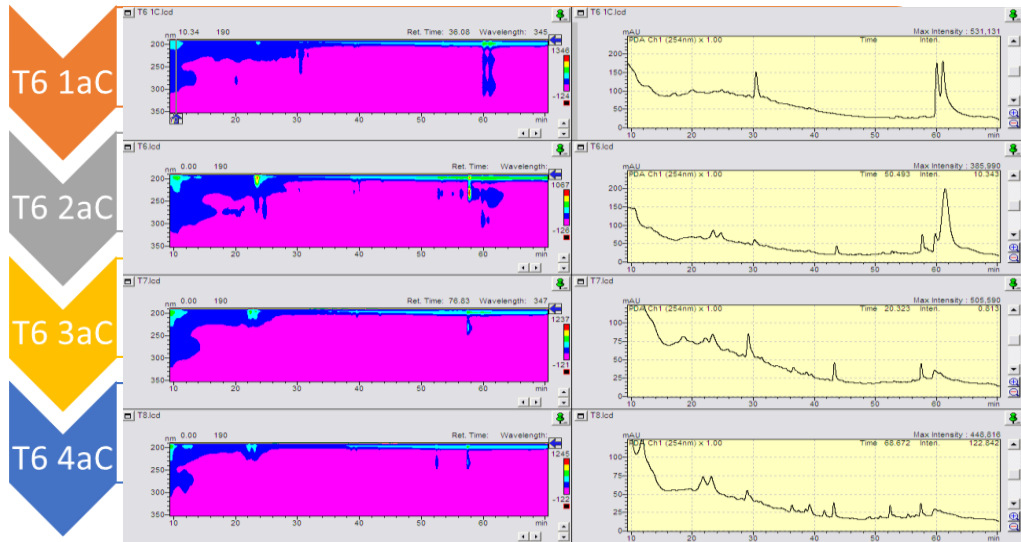


Figura 57. Cromatograma analítico de fase inversa de los microextractos de las diferentes condiciones de T6.

Del análisis de las condiciones de T6 se observa que la condición estándar (T6 1aC) presenta un perfil metabólico diferente en la parte no polar del cromatograma lo cual podría explicar porque es más activa contra *A. alternata* y *B. cinérea* comprobando que el hecho de disminuir los componentes del medio de cultivo afecta notablemente la producción de compuestos con actividad antifúngica.

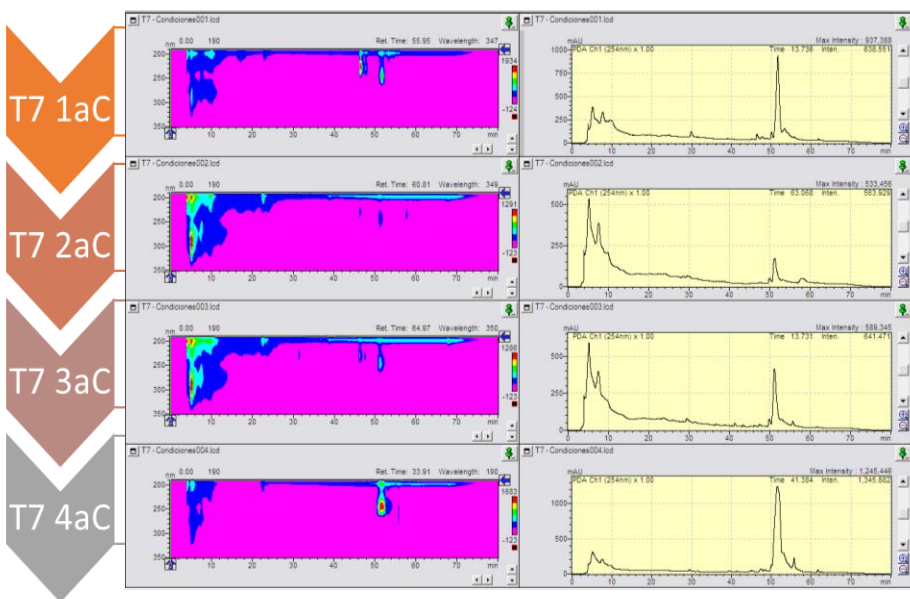


Figura 58. Cromatograma analítico de fase inversa de los microextractos de las diferentes condiciones de T7.

De la figura 58 y uniendo la información del porcentaje de inhibición a las tres dianas se observa que la cuarta condición (T7 4aC) presenta una mayor actividad contra las tres dianas y en el cromatograma se observa una mayor presencia de compuestos poco polares; mientras que las condiciones 2aC y 3aC hay una disminución de estos compuestos y en consecuencia una baja actividad antifúngica.

Con base en estos resultados de las tres cepas candidatas T1, T6 y T7, se seleccionó sólo la cepa T1 en las condiciones estándar de cultivo inicial para llevar a cabo la fermentación a mayor escala e identificar los compuestos responsables de su actividad antifúngica frente a las tres dianas fitopatógenas empleadas en este estudio. Se realizó un estudio preliminar de la cepa T1 y se pudo concluir que se trata del hongo *Fusarium* sp.

2.3.3 Producción biotecnológica del extracto T1 (*Fusarium* sp) a gran escala mediante fermentación

Se procede a realizar la producción optimizada a mayor escala (12 litros de medio de cultivo) de la cepa *Fusarium* sp T1 en el medio estándar realizando la extracción líquido-líquido con acetato de etilo, obteniendo un extracto crudo (2.25 g) con un rendimiento de 0.188 g/L (Figura 59).



Figura 59. Producción a mayor escala del macroextracto de la cepa *Fusarium* sp. T1

2.3.4 Fraccionamiento del extracto de *Fusarium* sp. T1

El extracto crudo se sometió a una cromatografía líquida de vacío (VLC) en columna de gel de sílice, empleando como eluyentes mezclas de polaridad creciente, obteniéndose quince fracciones, como se observa en la Tabla 15, que posteriormente se purificaron mediante distintos tipos de cromatografías, tales como cromatografía líquida de vacío y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Tabla 15. Fraccionamiento principal del extracto de *Fusarium* sp. T1

Fracción	Eluyente	Peso (mg)
1	<i>n</i> -Hexano (100)	21.5
2	<i>n</i> -Hex: AcOEt (90:10)	94.3
3 A	<i>n</i> -Hex: AcOEt (65:25)	8.2
3 B	<i>n</i> -Hex: AcOEt (65:25)	18.1
4 A	<i>n</i> -Hex: AcOEt (50:50)	45
4 B	<i>n</i> -Hex: AcOEt (50:50)	245.7
4 C	<i>n</i> -Hex: AcOEt (50:50)	153.9
5 A	AcOEt (100)	209.3
5 B	AcOEt (100)	248
6	AcOEt: MeOH (98:2)	208.2
7	DCM: MeOH (95:5)	166.7
8	DCM: MeOH (90:10)	46.7
9	DCM: MeOH (80:20)	153.7
10	DCM: MeOH (50:50)	290.3
11	MeOH (100)	85.5

2.3.5 Actividad antifúngica de las fracciones del extracto de *Fusarium* sp. T1

Con el propósito de poder identificar la o las fracciones donde se encuentren los productos naturales responsables de la actividad antifúngica, se procedió a realizar bioensayos con las fracciones en donde hay mayor cantidad de extracto, contra los mismos hongos fitopatógenos probados anteriormente (Figura 60).

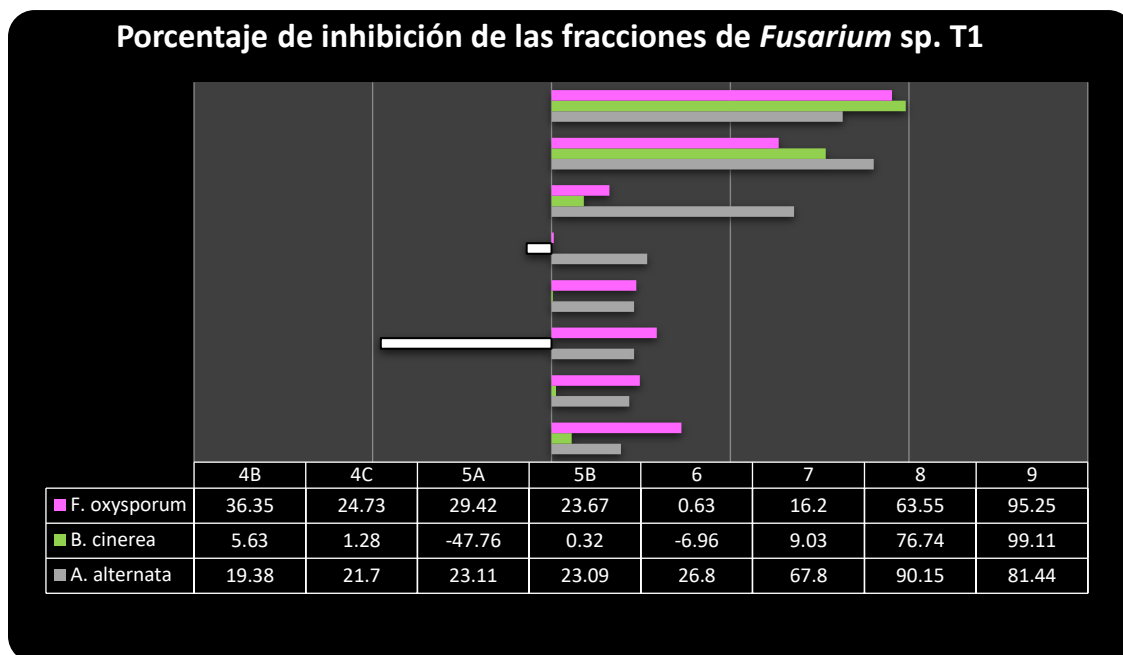


Figura 60. Bioensayos de las fracciones representativas

De este análisis se puede observar que las fracciones menos polares son poco inhibitorias del crecimiento de *F. oxysporum* mientras que la fracción 9 (DCM:MeOH 80:20) es la más activa con un 95 % de inhibición. Algo similar se observa contra el hongo *B. cinerea* en donde las fracciones poco polares carecen de actividad antifúngica contra *B. cinerea*, observándose incluso que la fracción 5A es una fracción estimulante del crecimiento del fitopatógeno, puesto que tiene un porcentaje negativo, mientras que la fracción 9 posee la capacidad de inhibir el crecimiento de esta diana con un 99 % prácticamente anulando completamente el crecimiento de este hongo fitopatógeno. Los resultados contra el hongo *A. alternata* son similares ya que las fracciones poco polares (4B-6) poseen una actividad antifúngica demasiado débil en un rango de 20% pero a medida que se incrementa la polaridad las dos últimas fracciones aumenta notablemente su actividad 8 y 9 con un 90 % y 81 % respectivamente.

Se puede concluir que las fracciones más polares (la 8 y la 9) son las que retienen prácticamente la actividad antifúngica.

2.3.6 Análisis de las fracciones de interés de *Fusarium* sp. T1

De todas las fracciones obtenidas la fracción 9, es biológicamente la más activa, contenía tres compuestos que fueron analizados por RMN; sin embargo, no se completó su estudio y estos compuestos quedaron pendientes de ser analizados y completamente elucidados por el grupo de investigación del centro de Tenerife (España), por lo que no se presentan dichos espectros.

Del resto de fracciones algunas como la 4B y 4C fueron separadas por cromatografías en otras fracciones; sin embargo, el bajo peso obtenido de algunas hizo difícil su purificación y por lo tanto su análisis para elucidar compuestos.

Debido a la similitud por comparación en CCF, las fracciones 3B y 4A se sumaron para tener mayor cantidad y poderla purificar con una mezcla DCM: MeOH [80:20]. Se pudo aislar un compuesto llamado M2 en muy baja concentración (2.1 mg). De este compuesto se pudo obtener el análisis de RMN de 1D y 2D para obtener la cartera de caracterización para su posterior elucidación (Figura 61).

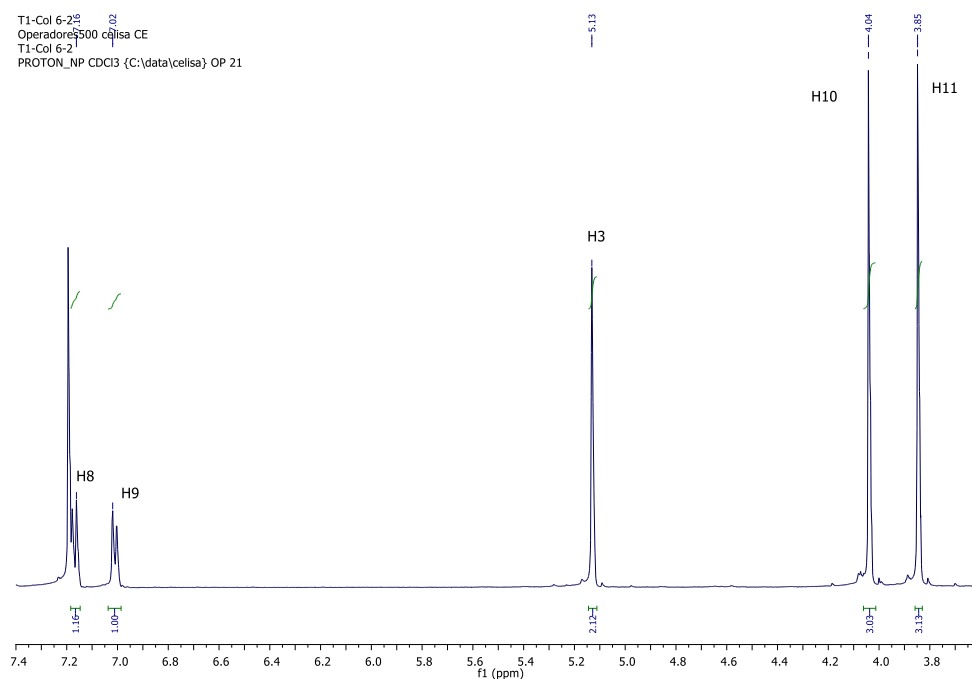


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz en CDCl_3 del compuesto M2.

En el espectro se observan en la región de aromáticos en 7.16 ppm (H8) y en 7.02 ppm (H9) dos señales dobles que integran para un hidrógeno cada una. En 5.13 ppm (H3) se observa una señal simple que integra para dos hidrógenos que está unido a algún átomo más electronegativo, correspondiente a un metileno. Por último, se observan en 4.04 ppm (H10) y 3.84 ppm dos señales simples que integran para tres hidrógenos cada una, correspondientes a grupos metilo y que por el desplazamiento se encuentran unidos a átomos más electronegativos. Con el fin de realizar una adecuada asignación del espectro de RMN de ^1H se obtuvo un espectro COSY (Figura 62).

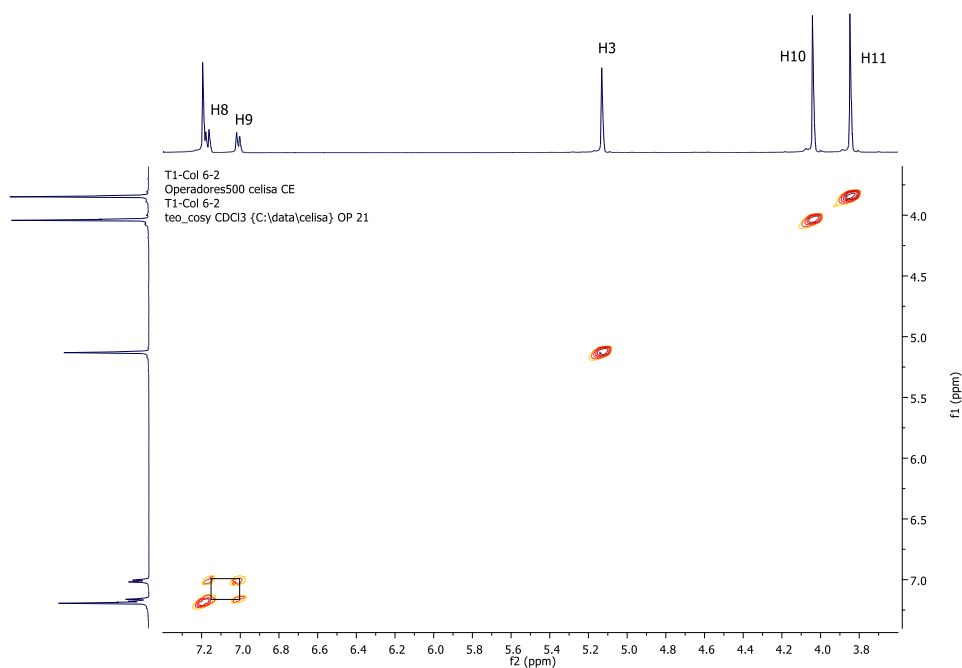


Figura 62. Espectro COSY del compuesto M2

En el espectro 2D COSY se observa que los hidrógenos H8 y H9 se correlacionan entre sí. El resto de los hidrógenos no se acoplan entre sí. Ahora con esta nueva información se procede a analizar el siguiente espectro de RMN de ^{13}C (Figura 63).

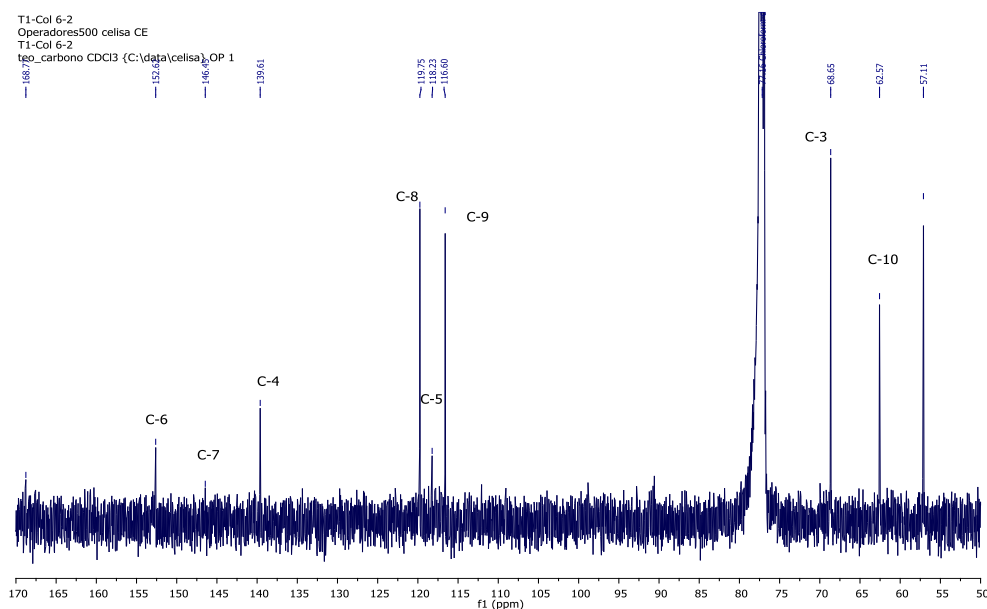


Figura 63. Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz en CDCl_3 del compuesto M2

Se puede apreciar un total de diez carbonos diferentes. Se observa en 168.7 ppm (C-1) un carbono del tipo carbonilo, en 152.6 (C-6), 149.0 (C-7), 139.6 (C-4), 119.7 (C-8), 118.2 (C-5), 116.6 (C-9) ppm, señales típicas de carbonos de anillo aromático. Sin embargo, en el espectro de ^1H de RMN sólo se observan dos señales en la región de hidrógenos aromáticos, por lo tanto, deben de existir varios carbonos cuaternarios. Debido a la intensidad débil de las señales C4, C5, C6 y C7 pudieran ser estos los carbonos cuaternarios, mientras que C8 y C9 pudieran ser los dos átomos de carbono que soportan a los dos hidrógenos observados en el espectro de ^1H . Por último, en 68 (C3), 62 (C10) y 57 (C11) ppm se encuentran los tres carbonos restantes que pudieran ser del metileno y metilos respectivamente. Para una correcta asignación del espectro de RMN de ^{13}C y correlacionar los átomos de carbono con sus respectivos hidrógenos se adquirió un espectro de RMN 2D HSQC (Figura 64).

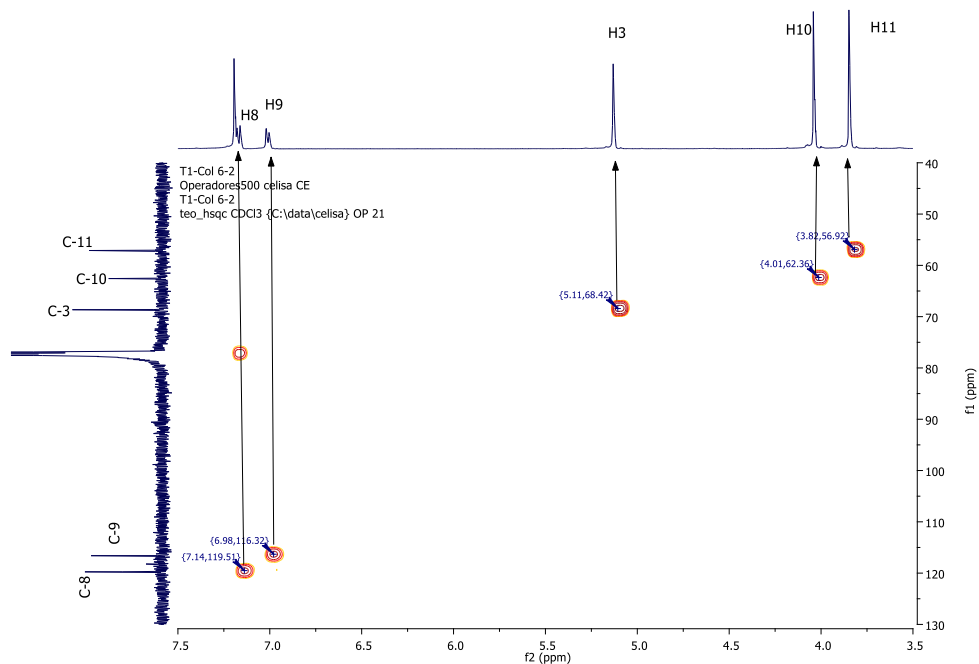


Figura 64. Espectro HSQC del compuesto M2

Las señales que corresponden a C-1, C-6, C-7, C-4 y C-5 no se correlacionan con ningún hidrógeno corroborando que son carbonos cuaternarios. Las demás señales correlacionan con sus respectivos hidrógenos corroborando la presencia de aromáticos, un metileno y dos metilos. También se obtuvo un espectro de ^{13}C DEPT 135 para corroborar el tipo de carbono correspondiente (CH_3 , CH_2 , CH). La información obtenida se resume en la tabla 16.

Tabla 16. Resumen de las señales del compuesto M2

Correlación		DEPT 135
Señal ^1H ppm	Señal ^{13}C ppm	Tipo
-	168.7 (C-1)	-
-	152.6 (C-6)	-
-	149.0 (C-7)	-
-	139.6 (C-4)	-
7.23 (H-8)	119.7 (C-8)	CH
-	118.2 (C-5)	-
7.07 (H-9)	116.6 (C-9)	CH
5.20 (H-3)	68.6 (C-3)	CH_2
4.11 (H-10)	62.5 (C-10)	CH_3
3.91 (H11)	57.1 (C-11)	CH_3

Con la información obtenida de los espectros de RMN 1D y 2D se propone la estructura del compuesto M2 (Figura 65).

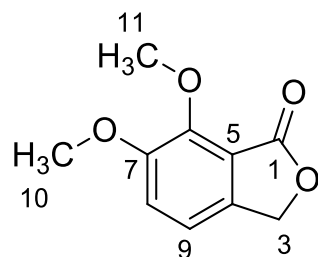


Figura 65. Estructura propuesta para el compuesto M2

El nombre del compuesto es 6,7-dimetoxiisobenzofuranona, este compuesto es de importancia puesto que podría servir como base para la síntesis de otras moléculas más grandes con actividad biológica.

2.4 Conclusiones

- De una colección de trece hongos endofíticos aislados de la planta *Mentha rotundifolia*, se seleccionaron tres cepas (T1, T6, y T7) con una fuerte actividad antifúngica contra los tres hongos fitopatógenos probados, después de realizar un análisis de los extractos de las trece cepas.
- Se realizó un estudio de las tres cepas cultivándolas con variaciones del medio de cultivo para optimizar la producción de productos naturales, en donde la condición estándar resultó ser la más adecuada.
- Se seleccionó la cepa T1, que resultó ser el hongo *Fusarium* sp. del cual se obtuvo un extracto crudo a gran escala y se sometió a un fraccionamiento mediante cromatografía para la búsqueda de productos naturales con actividad antifúngica.
- De la fracción 9 se aislaron tres productos responsables de la actividad antifúngica, que se siguen trabajando para su elucidación completa.
- De las fracciones 3B y 4A se logró aislar, purificar y elucidar un compuesto llamado 6,7-dimetoxiisobenzofuranona, el cual puede ser utilizado como precursor para la síntesis de otros compuestos con actividad biológica (Noscapina).
- Se sigue con el trabajo de elucidación y bioensayos para las diferentes fracciones del extracto de *Fusarium* sp. T1.

2.5 Desarrollo Experimental

2.5.1 Producción de microextractos

A cada cepa de la colección T se le realizó un estudio microscópico y macroscópico para determinar si cada cepa estaba en óptimas condiciones y sin contaminaciones, así como para recabar la información estructural de importancia. Posteriormente se procedió a replicar cada cepa en placas PDA nuevas para continuar con la siguiente etapa.

Al obtener una "cepa fresca" (8 días de incubación) en medio sólido se procedió a realizar un "preinóculo" con el fin de adaptar al hongo al nuevo medio y que se encuentre en óptimas condiciones para un traspaso de medio líquido a líquido, teniendo así un mejor crecimiento y una mejor producción de compuestos de interés.

El medio de cultivo líquido a utilizar es Czapek contiene:

- **Medio Czapek (1 litro de Cultivo)**

NaNO₃	2 g
KH₂PO₄	5 g
MgSO₄	0.5 g
FeSO₄	10 mg
ZnSO₄	3 mg
Extracto de Levadura	1 g
Glucosa	60 g

Se prepararon 13 soluciones en matraces de 250 mL con un volumen de 50 mL de medio de cultivo. Teniendo las cepas en medio sólido frescas y el medio listo se procedió a inocular cada matraz con la cepa correspondiente, en condiciones de esterilidad (campana de flujo laminar).

Primeramente, se colocó todo el material en la zona de esterilidad, con una capa debajo de papel filtro y con ayuda de la pipeta se adicionaron 10 mL de agua destilada estéril a la placa donde se encontraba el hongo. Luego con ayuda de una espátula se comenzó a raspar con mucha delicadeza tratando sólo de raspar el micelio aéreo. Posteriormente se procedió a pasar ese micelio raspado a un vial con tapa disgregándolo con ayuda de un vórtex y luego se inoculó al matraz con el medio de cultivo líquido. Este procedimiento se realizó con cada cepa teniendo las precauciones adecuadas para la manipulación de las trece cepas diferentes minimizando posibles contaminaciones cruzadas. Teniendo ya inoculadas todas las cepas se procedió a la incubación en una cámara en condiciones de 27 °C a una agitación de 120 rpm mediante 7 días.

Pasados los 7 días de incubación se procedió a inocular 5 mL del preinóculo a 1 litro de cultivo de medio líquido Czapek que estaba distribuido en cinco matraces Erlenmeyer de 500 mL con 200 mL del medio Czapek en condiciones de esterilidad. Enseguida se volvió a colocar en la cámara de incubación con las mismas condiciones por 10 días más, excepto las cepas T4 y T8 que fueron incubadas por 17 días. Pasado los 10 días de incubación se procedió a una filtración con vacío con un embudo tipo büchner, papel filtro, malla y matraz kitasato. Posteriormente se centrifugó el medio para eliminar cualquier resto. Luego se procedió a una extracción líquido-líquido con disolvente orgánico (acetato de etilo). La fase orgánica de las extracciones líquido-líquido de cada una de las cepas de la colección T se concentraron a presión reducida con ayuda de un rotavapor obteniendo así sus microextractos.

2.5.2 Bioensayos

Con los microextractos obtenidos se realizaron los bioensayos de inhibición de crecimiento fúngico, el cual inició con la preparación de la dosis adecuada para su aplicación. Para ello se preparó una "solución stock" (S.S) de 12 mg/300 µL EtOH de cada microextracto, dando así una concentración final de 1 mg/ mL conservándolo en refrigeración con el fin de que no se evapore el etanol.

En condiciones de esterilidad se añadieron en los tubos eppendorf, 10 µL de la solución de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, 5 mg/mL agua destilada), 35 µL de la solución del microextracto anteriormente preparada y 1365 µL de medio PDA un poco caliente a modo de que no se solidifique y se disuelva. Enseguida se añadió a cada pocillo de la microplaca un volumen de 300 µL de extracto (repetiendo este procedimiento cuatro veces para cada extracto, teniendo así 4 réplicas del mismo extracto) esto se realizó también para el control positivo el cual es solo etanol. Luego cada microplaca se vuelve a cerrar y se deja solidificar.

Posteriormente se inoculó la cepa diana (hongo fitopatígeno). Para ello con ayuda de un transfer (sacabocado) estéril se corta la placa con la cepa diana fresca tantos discos como sean necesarios de diámetro aproximado de 5 mm y se depositan dentro de cada pocillo de la microplaca.

Al finalizar la inoculación de la cepa diana se realizó un primer escaneo teniendo los datos iniciales del diámetro del fitopatígeno y enseguida se incubó en una estufa estacional a temperatura de 27 °C con oscuridad por 3 días, al cabo del tiempo se realizó un escaneo con ayuda del equipo Multifunción Epson ECOTANK ET-2714, 33ppm y para el procesamiento de medidas se realizó con el programa ImageJ 1.51k. El porcentaje de inhibición (%) de cada compuesto a las 48 hrs se calculó con la siguiente ecuación.

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%)} = \left[\left(\frac{D_0 - D_x}{D_0} \right) \times 100 \right]$$

Donde: D_0 = diámetro del hongo control, D_x = diámetro del hongo en presencia del compuesto.

2.5.3 Obtención de cromatogramas

El equipo utilizado para obtener estos cromatogramas era un RP-HPLC Shimadzu con un detector DAD-SPD-H 10A con una fase móvil de MeOH/agua 0.1% de ácido acético con unas condiciones iniciales de 30:70 con un gradiente en 60 minutos hasta llegar a unas condiciones finales de 90:10 con un flujo de 0.5 mL/min.

2.5.4 Producción biotecnológica a mayor escala

Primeramente, se prepararon 12 matraces de 200 mL con 50 mL de medio de cultivo como preinóculo. Posteriormente se prepararon 60 matraces de 500 mL con 200 mL de medio de cultivo teniendo como volumen final 12 L de medio Czapek y se esterilizaron con calor húmedo en autoclave.

2.5.5 Espectroscopias y parte Química

Se utilizaron cromato-placas comerciales del gel de sílice 60, para revelar con una lámpara ultravioleta, una cámara de inmersión de una solución OLEUM, que contiene 16% de agua destilada, 80% ácido acético y 4% de ácido sulfúrico. La purificación de productos mediante cromatografía en columna se realizó empleando gel de sílice Macherey-Nagel 60 como fase estacionaria y mezclas de disolventes en proporciones adecuadas como eluyentes.

Los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C se determinaron en un espectrómetro Bruker 500 MHz, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO), como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los valores de los desplazamientos químicos se encuentran en partes por millón (ppm) respecto al TMS y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz).

2.6 Referencias

- [33] Petrini. O, Sieber. T. N, Toti. L, and Viret. O. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Nat. Toxins*, **1993**, 1:185-1996
- [34] Oses R, Valenzuela S, Freer J, Sanfuentes E, Rodriguez. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. **2008**. *Fungal Diversity*. 1: 77-86
- [35] Calvo-Polanco M, Sánchez-Romera B, Aroca R. Arbuscular Mycorrhizal fungi and the tolerance of plants to drought and salinity. **2013**, *Symbiotic Endophytes*. 37: 271-288.
- [36] Al-Ani, LKT. Secondary metabolites of Non-pathogenic Fusarium: scope in agriculture. In: Singh HB, Keswani C, Reddy MS, Sansinenea E, Garcia-Estrada C (eds) Secondary metabolites of plant growth promoting rhizomicroorganisms. Springer, Singapore, **2019**, pp 59-76.
- [37] Keswani C, Bisen K, Singh V, Sarma BK, Singh HB. Formulation technology of biocontrol agents: present status and future prospects. In: Arora NK, Mehnaz S, Balestrini R (eds) Bioformulations: for sustainable agriculture. Springer, New Delhi, **2016**, pp 35–52.
- [38] Gunatilaka LAA. Natural Products from Plant-Associated Microorganisms: Distribution, Structural Diversity, Bioactivity, and Implications of Their Occurrence. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69: 509-526
- [39] Schultz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AKR. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycol. Res.* **2002**, 9: 996-1004.
- [40] Li JY, Strobel G, Harper J, Lobkovsky E, Clardy J. Cryptocin, a Potent Tetramic Acid Antimycotic from the Endophytic Fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. *Org. Lett.* **2000**, 2: 767–770.
- [41] Selvakumar V, Panneerselvam A. Bioactive Compounds from Endophytic Fungi. In: P. Gehlot, J. Singh (eds.), Fungi and their Role in Sustainable Development: Current Perspectives, Springer Nature Singapore, **2018**, pp 699-717.

[42] Evidente A, Amalfitano C, Pengue R, Altomare C. High performance liquid chromatography for the analysis of Fusapyrone and Deoxyfusapyrone, two antifungal α -Pyrone from *Fusarium semitectum*. *Nat Toxins*, **1999**, 7:133–137.

[43] Ilic J, Cosic J, Vrandecic K, Dugalic K, Pranjic A, Martin J. Influence of endophytic fungi isolated from symptomless weeds on cherry plants. *Mycosphere*, **2017**, 8:18–30.